



Roberto Bovo: grazie per questo invito e della possibilità di parlare di argomenti molto affascinanti anche se complessi. Una premessa. La ricerca attuale sulla sordità è focalizzata molto sulle cellule cigliate, perché sono poche, circa 15.000, e nell'uomo perdono la capacità di rigenerarsi e moltiplicarsi già prima della nascita, durante la vita intrauterina. Queste 15.000 cellule devono durare per tutta la vita. Purtroppo, però, sono cellule delicate, esposte nella vita ad una serie di agenti lesivi.

Pensiamo al rumore, ai traumi, alle infezioni, agli oto-tossici e all'invecchiamento. Oltre a questi agenti vi sono fattori genetici che possono causare una sordità o aumentare la suscettibilità di una persona agli effetti del danno.

Quali sono i quesiti che ci poniamo nella ricerca? È possibile riparare le cellule cigliate, ringiovanirle o addirittura sostituire queste cellule con cellule nuove e funzionanti? Per il momento l'obiettivo più verosimile è quello aiutare la riparazione di queste cellule, questo almeno in un futuro non troppo lontano. In realtà, le cellule cigliate sono già in grado di riparare dei danni lievi, dei danni iniziali. Lo vediamo in queste immagini. Queste sono le ciglia ben ordinate di una cellula normale e qui vediamo che cosa succede dopo un'esposizione a rumore nella cosiddetta "sindrome da concerto rock": parte delle cellule cigliate hanno le ciglia scompagnate, flesse. L'eccessivo rumore ha fatto oscillare le ciglia fino a rompere queste sottili fibrille che le tengono unite. Per fortuna, la rottura di questi filamenti è reversibile. Nell'arco di uno-due giorni, le ciglia riprendono un ordinamento verticale e parallelo ed i ponti tra loro si ricostituiscono. Oggi sappiamo di che cosa sono formati, di una proteina detta otocaderina. Se una persona geneticamente ha una otocaderina anomala queste fibrille sono delicate o non funzionanti ed il soggetto avrà un'estrema suscettibilità al danno da rumore. Tra non molto, nei prossimi anni, probabilmente tutte le persone faranno uno studio completo del genoma e quindi sapremo se ci sono, ad esempio, delle alterazioni di queste proteine: queste persone devono proteggersi in maniera molto attenta dal rumore. Già oggi l'indagine genetico-molecolare sulla sordità prevede un panel di circa 50 geni, ed uno di questi è proprio l'otocaderina. In queste altre immagini si può vedere anche un danno del corpo cellulare. Lo vediamo in questa immagine al microscopio elettronico. Cosa succede? L'esposizione al rumore intenso determina un accumulo di ossidanti, ovvero di prodotti di scarto del metabolismo della cellula. Le cellule cigliate consumano molta energia e quindi hanno bisogno di ossigeno, ma nel produrre energia formano elevate quantità di sostanze ossidanti. L'accumulo eccessivo di ossidanti può portare alla morte di cellule. Qui vediamo nuclei diventati più scuri oppure gonfiati. Questi sono i danni che volgono verso una necrosi cellulare. Sostanze antiossidanti hanno dimostrato di prevenire il danno cellulare nella coclea degli animali di laboratorio, purtroppo non ancora nell'uomo.

Se, invece, vogliamo puntare il nostro obiettivo a ringiovanire o addirittura a sostituire o rigenerare queste cellule, dobbiamo ancora fare un grosso lavoro sulle conoscenze di base, in particolare dobbiamo capire meglio come durante lo sviluppo embrionale, dalle cellule germinali, staminali, si arrivi ad una progressiva maturazione e differenziazione delle cellule cigliate. Questi sono argomenti di studio molto attuali. Quali sono i geni, le proteine, che devono intervenire, attivarsi e disattivarsi durante lo sviluppo embrionale per portare a una maturazione o a una differenziazione di queste cellule? come comunicano tra di loro queste

cellule? Come avviene la trasmissione di informazioni? Avviene attraverso segnali che mandano in maniera sequenziale a tempi ben precisi, informazioni alle cellule staminali per farle differenziare. Questa tabella riunisce le nostre conoscenze attuali sulla maturazione. Si parte dalle cellule staminali poi, via via, questi sistemi di segnali mandano delle informazioni, le cellule si differenziano, in senso di cellule di sostegno pure cellule cigliate. Dobbiamo ancora approfondire molto bene questi meccanismi prima di pensare ad una possibile differenziazione indotta delle cellule staminali verso le cellule cigliate. Quali sono le tecnologie che in futuro ci permetteranno probabilmente di arrivare un po' alla volta a riparare il danno o a rigenerare queste cellule? La terapia genica, le cellule staminali, lo sviluppo di nuovi farmaci, ma soprattutto la capacità di somministrare questi farmaci direttamente alla coclea. Tra i sistemi di diffusione del farmaco hanno dato soddisfazione in questi anni le nano-tecnologie. Per terapia genica intendiamo invece la possibilità di riparare o sostituire un gene mancante o alterato con un gene funzionante oppure clonato. Dobbiamo far arrivare questo genere all'interno delle cellule cigliate, per questo si utilizzano dei vettori virali o non. I più efficaci sono della prima categoria. L'ingegneria genetica è in grado di produrre questi vettori e di inserire il gene clonato il gene sano all'interno del DNA del virus che viene guidato verso il tessuto bersaglio proprio grazie alla sua capacità infettante, il virus entra nel nucleo della cellula, libera il DNA contenente il genoma clonato e questo con meccanismi diversi si integra stabilmente all'interno del DNA, del genoma della cellula cigliata. Quali sono i vantaggi di questi virus? Sono quelli di poter integrare stabilmente il gene nella cellula bersaglio. Sono, tuttavia, dei vettori ancora pericolosi. C'è il rischio di infezione. Quando si producono questi virus è vero che viene tolto dal DNA del virus il pezzo del DNA che serve a far moltiplicare il virus. Teoricamente questi virus, una volta entrati nella cellula, non sono più in grado di moltiplicarsi. Vi è inoltre il rischio di indurre mutagenesi. Quando andiamo a manipolare il DNA, c'è un rischio di creare nuove mutazioni. Ad esempio il gene clonato va ad inserirsi nel posto sbagliato oppure determina un danno del DNA. Ed infine il rischio di innescare una risposta immunitaria. Il nostro sistema immunitario vede questi vettori come sostanze potenzialmente dannose e reagisce creando una risposta, un'infiammazione. Sono tutti rischi ancora troppo elevati per l'utilizzo clinico di questi vettori. Molto più sicure sono i vettori non virali che, però, hanno due grossi svantaggi. Sono molto meno efficaci, quindi riescono ad infettare solo una piccola parte delle cellule, sono molto meno aggressivi dei vettori virali e soprattutto non sono in grado di far integrare il gene clonato stabilmente all'interno del gene della cellula cigliata. Quali risultati sono stati ottenuti ad oggi con la terapia genica? I risultati sono solo negli animali di laboratorio. Il risultato forse che ci ha dato più speranza è stata la possibilità di curare un topolino geneticamente modificato con una sordità da mutazione della connessina. Queste mutazioni sono responsabili del 50% circa di tutte le sordità genetiche non sindromiche. In più laboratori si è riusciti a guarire topi con una mutazione della connessina. Un altro gene importante è quello che regola la maturazione delle cellule cigliate; altri geni sono stati inoltre transfettati. Vi cito il gene Atoh 1, che interviene nello sviluppo embrionale, in teoria se noi riusciamo a riattivare questo gene dopo la nascita (perché normalmente si disattiva prima della nascita), forse sarà possibile rigenerare le cellule cigliate e ricreare quella fase di maturazione delle cellule germinali verso le cellule cigliate. Sono esperimenti eseguiti solo nell'animale, nel 1996 e nel 2003. La strada è ancora molto lunga per arrivare ad applicare queste tecnologie sull'uomo. A mano a mano che si va avanti con la ricerca, ci si accorge che la realtà in medicina è molto più complessa. Oggi sappiamo che non è soltanto il gene Atoh 1 implicato nella maturazione delle cellule, ma ci sono anche una serie di altri geni. Vedete questi bei disegni colorati. Inoltre, sappiamo che le cellule generate con questo gene finora nell'animale hanno avuto una vita limitata. Non sappiamo, poi, cosa succede quando abbiamo rigenerato queste cellule. Saranno in grado di ristabilire le connessioni con le fibre nervose, e di ricostruire le sinapsi? I risultati ottenuti nell'animale, non è detto che possano essere sicuramente applicabili anche nell'uomo, occorre cautela.

Per esempio, verso la fine degli anni 80, si scoprì che gli uccelli e alcune specie di pesci hanno la capacità di rigenerare le cellule cigliate. Gli uccelli non vanno incontro ad un peggioramento uditivo con l'invecchiamento. Non esiste la "presbiacusia" negli uccelli. Diversi scienziati dichiararono allora che nell'arco di cinque anni le possibilità di rigenerare le cellule cigliate sarebbero state trasferite anche all'uomo.

Ma questo avvenne trent'anni fa! Oggi scienziati autorevoli ritengono che ci vorranno almeno 10 anni per sviluppare solo un'architettura, un progetto di strategia e poi ancora molti anni per ottenere terapie efficaci. Vediamo le cellule staminali. Anche qui abbiamo dei risultati nell'animale. Questo è un lavoro del nostro gruppo di ricerca condotto presso il Laboratorio di Bioacustica di Padova. Abbiamo condotto degli esperimenti su topolini di laboratorio, le cellule staminali si sono moltiplicate all'interno della coclea e hanno ridotto la perdita uditiva. Preventivamente erano stati resi sordi con esposizione a rumore o a un farmaco ototossico. Sarà possibile trasferire queste tecnologie nell'uomo? Il nostro sogno è poter trapiantare cellule staminali nella coclea oppure risvegliare cellule staminali che sono presenti anche se in fase quiescente sia nella coclea sia nel ganglio spirale. Terza tecnologia, forse più a portata di mano in un futuro prossimo, è la possibilità di far arrivare questi farmaci in concentrazioni elevate all'interno della coclea. Una delle cause fondamentali di morte è l'accumulo di sostanze ossidanti. Dopo 30 minuti di esposizione ad un rumore molto intenso, questi in verde sono gli ossidanti. Vedete che ci mettono diversi giorni prima di smaltirsi, di sparire e di essere metabolizzati. Per tutto questo periodo, la cellula è a rischio di danno anche di morte per necrosi o apoptosi. Conosciamo delle sostanze che hanno effetto antiossidante e vanno a smaltire rapidamente queste sostanze. Abbiamo studiato l'enzima Q10, le vitamine A ed E, che si usano tradizionalmente. Il problema è farle arrivare in dosi elevate nella coclea. Questi farmaci, se somministrati in vena oppure per via ossea, si diluiscono e non raggiungono la concentrazione efficace nella coclea dell'uomo. Esiste, in realtà, un unico esperimento fatto in Cina, su un numero elevato di pazienti trattati con il cisplatino per tumore, è un anti-neoplastico con effetto gravemente ototossico. A questi pazienti sono state date delle dosi massive di acetilcisteina, ma queste dosi elevate avevano causato un grave danno al fegato, tanto che la sopravvivenza è stata inferiore rispetto ai pazienti non trattati. Questo studio ha ricevuto le critiche da parte di tutta la comunità scientifica. Purtroppo non si possono fare esperimenti di questo tipo nell'uomo. Presso il centro di bioacustica facciamo degli esperimenti sui topi. Ci sono degli elettrodi per registrare l'ABR, un altoparlante per esporlo a rumore e vediamo che questi sono i topi sottoposti a rumore, questi sono quelli sottoposti a rumore e trattati con l'enzima Q10; queste colonne sono la perdita uditiva, vedete come la perdita è significativamente maggiore nei topi non trattati rispetto a quelli topi trattati con l'enzima. Questo beneficio si mantiene fino a tre settimane dal trattamento. Lo stesso esperimento è stato condotto anche dopo aver danneggiato le coclee dei topolini con il cisplatino, e si vede che l'effetto protettivo è quello dato dal cortisone e dall'enzima Q10; il cortisone è un farmaco antiossidante molto potente. Oggi nella terapia della sordità improvvisa è l'unico farmaco probabilmente efficace. Questo proprio per il suo effetto antiossidante. È il farmaco che diamo comunemente nella clinica. Molto importanti sono le vie di somministrazione perché quando noi diamo i farmaci per bocca oppure endovena, solo una piccola parte raggiunge la coclea e non in quantità o concentrazione sufficiente. Quindi si cerca di trovare delle nuove vie per far arrivare questi farmaci direttamente alla coclea. La via trans-timpanica prevede l'iniezione del farmaco nell'orecchio medio e da qui attraverso le finestre (sottili membrane tra orecchio medio e coclea) entra nella coclea. Oppure anche per via intra-cocleare. Questa è una cavia. Si fa un foro nella coclea e si somministra il farmaco direttamente nella coclea. Oppure attraverso l'impianto cocleare. Infine, questa è forse la via più promettente per il futuro, il farmaco viene inserito all'interno di nano-particelle. Esistono già prototipi di impianto cocleare che nell'elettrodo hanno un tubicino e questo tubicino presenta dei microscopici fori prodotti dal laser, che servono alla somministrazione di farmaci che si distribuiscono a tutta la scala timpanica. Oppure il silicone che riveste il cavetto porta elettrodi dell'impianto cocleare si impregna di cortisone, che gradualmente si diluisce nel liquido cocleare.

Già da anni sono state studiate delle micro-pompe sottocutanee che liberano farmaci attraverso un tubicino che entra nella coclea. Pochi mesi fa è comparso questo diffusore di ultima generazione, con un sistema che permette di controllare dall'esterno esattamente la quantità di farmaco e la durata del farmaco da somministrare. Arriviamo alle nano-tecnologie. Sono delle particelle piccolissime. queste particelle sono 2000 volte più piccole di un globulo rosso. All'interno di queste particelle si possono inserire molecole di non grosse dimensioni. Già oggi hanno un utilizzo estremamente importante nella terapia dei tumori. Sono

ancora in fase di studio per la terapia della sordità nell'uomo. Utilizzando queste particelle, cosa possiamo trasferire all'interno delle cellule dell'orecchio? Farmaci, geni, fattori di crescita. Importantissimo è questo fattore di crescita che stimola il ganglio spirale, micro RNA, porzioni che vanno a modulare l'attività di altri geni.

In questo esperimento vediamo come un farmaco dato in soluzione, non aggregato alle nano particelle, ha raggiunto una concentrazione all'interno della coclea di poco superiore allo zero. All'opposto, legato alle nanoparticelle, dopo mezz'ora aveva raggiunto concentrazioni 200 volte più alte e si sono mantenute anche dopo quattro ore.

Una rapida conclusione. Al momento non esistono vettori virali sicuri per l'uomo. Dall'inizio degli anni 90, il progresso seppur lento con alti e bassi, è andato via via migliorando. Ricordo che c'è stato un momento di interruzione nella ricerca quando nel '99 morì un ragazzo giovane di 18 anni in seguito ad una terapia con vettori virali. Fortunatamente, negli ultimi 5-6 anni siamo riusciti a studiare e sviluppare vettori virali più sicuri e la ricerca sta riprendendo. Le nanotecnologie sono molto recenti, sono nanoparticelle utilizzate nella cura della sordità per la prima volta nel 1994 e sembrano dimostrare grandi prospettive. Le cellule staminali sono un campo di ricerca in cui abbiamo avuto buoni risultati nell'animale. Trasferirle sull'uomo è difficile. Anche se poche cellule staminali sopravvivono nella coclea, potrebbero essere sufficienti per permettere una rigenerazione delle cellule cigliate e la dimostrazione di cellule staminali nell'orecchio umano apre nuove prospettive.

Grazie per l'attenzione