

17. Febbraio

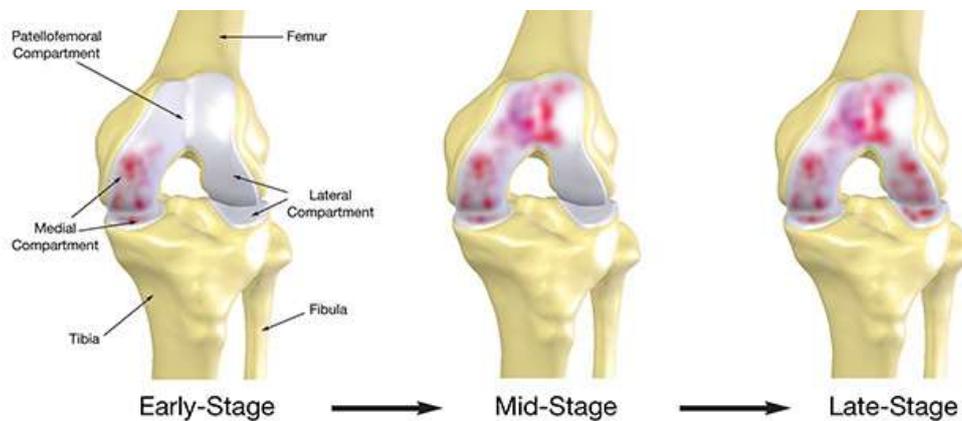
## L'inibizione dei recettori del fattore di crescita endoteliale vascolare allevia il dolore dell'osteartrosi e il danno alla cartilagine

*L'avvenire è sulle ginocchia degli dèi.*

*Omero*

*Iliade, ca. IX sec. a.e.c.*

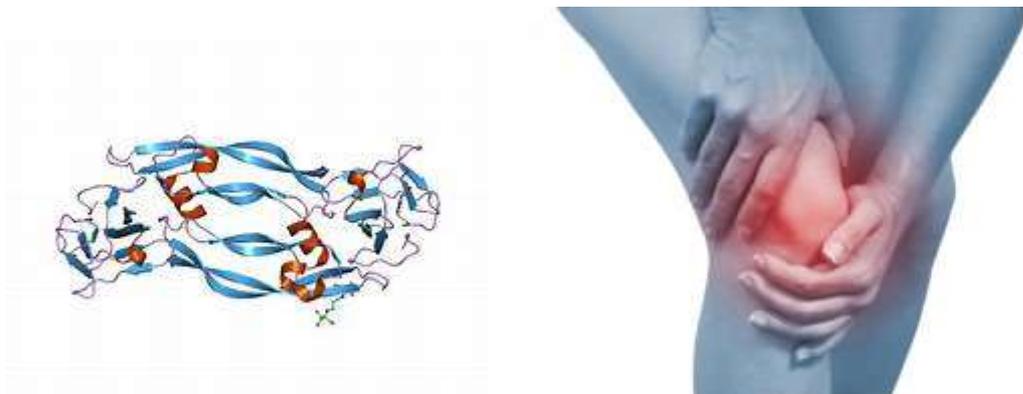
**L'osteoartrite (OA)** e altri disturbi degenerativi della cartilagine sono le principali cause di dolore cronico, derivante da danni alla cartilagine e infiammazione. La prevalenza dell'OA del ginocchio, che colpisce milioni di persone in tutto il mondo, è notevolmente aumentata a causa dell'aumento dell'aspettativa di vita e dell'aumento dei disturbi metabolici (ad esempio, l'obesità) che esacerbano il rischio di OA.



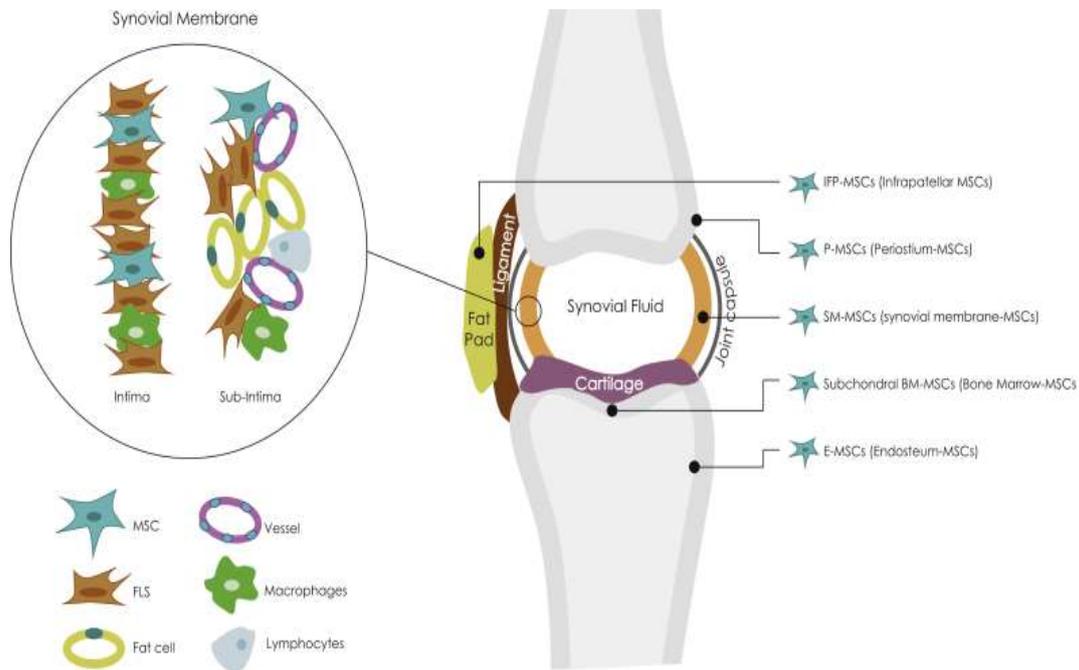
I sintomi del dolore da OA influiscono pesantemente sulla qualità della vita e sull'assistenza sanitaria, tuttavia non esistono strategie di trattamento efficaci o clinicamente approvate che possano mitigare o prevenire la progressione della malattia o gestire il dolore specifico dell'OA.

Pertanto, c'è un urgente bisogno di identificare bersagli terapeutici precedentemente sconosciuti e convalidare **farmaci unici modificanti la malattia per l'osteartrosi (DMOAD)** per inibire sia il dolore articolare cronico che la progressione patologica della degenerazione della cartilagine e delle modificazioni dei nervi.

Livelli elevati del **fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF)** e la formazione di nuovi vasi sanguigni nelle articolazioni sono patologicamente associati al dolore articolare OA



Le popolazioni cellulari del microambiente articolare coinvolti nel dolore articolare:



*Di Nicola V. Degenerative osteoarthritis a reversible chronic disease. Regen Ther. 2020 Aug 15;15:149-160.*

Diversi ligandi del **VEGF** (ad esempio VEGFA, VEGFB e VEGFC) potrebbero svolgere un ruolo durante la progressione dell'OA e il dolore

*Shibuya M et al. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. Genes Cancer. 2011 Dec;2(12):1097-105.*

Prove dirette del ruolo dei **VEGF** suggeriscono che l'iniezione intraarticolare (IA) di **VEGF** nell'articolazione del ginocchio imita una patologia articolare simile all'OA e l'inibizione della segnalazione del **VEGF** ritarda la progressione dell'OA.

Questi ligandi convergono su due recettori affini sulla superficie cellulare (ad esempio, VEGFR1/FLT1 e VEGFR2/FLK1) che hanno ruoli patologici meccanicamente distinti:

**VEGFR1** è principalmente responsabile della trasmissione del dolore articolare,

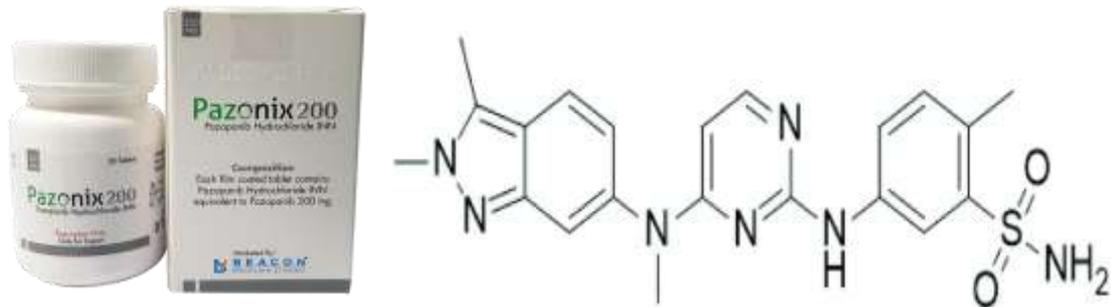
mentre **VEGFR2** è collegato alla degenerazione della cartilagine.

*Ma K et al Targeting Vascular Endothelial Growth Factor Receptors as a Therapeutic Strategy for Osteoarthritis and Associated Pain. Int J Biol Sci. 2023 Jan 1;19(2):675-690.*

Pertanto, l'inibizione simultanea di entrambi i recettori rappresenta una duplice strategia molto interessante per il trattamento dell'OA.

**Pazopanib** ha come bersaglio sia **VEGFR1** che **VEGFR2** e appartiene a una classe più ampia di piccole molecole approvate dalla **Food and Drug Administration (FDA)** statunitense che agiscono come inibitori della tirosina chinasi dei recettori **VEGFR1/2** (ad es., axitinib, cabozantinib, lenvatinib, sorafenib, sunitinib e pazopanib).

Questi agenti rappresentano analoghi dell'adenosina trifosfato che sono inibitori competitivi allo stato stazionario del sito attivo del dominio tirosina chinasi ( 17 ).



Roskoski R Jr. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor inhibitors in the treatment of renal cell carcinomas. *Pharmacol Res.* 2017 Jun;120:116-132. doi: 10.1016/j.phrs.2017.03.010. Epub 2017 Mar 19. PMID: 28330784.

Lo sviluppo di un sistema controllato e a rilascio lento per gli ingredienti farmaceutici attivi (API) conforme agli standard FAD è fondamentale per il successo della somministrazione locale (IA) dei farmaci, in particolare per gli API con emivita breve.

I vantaggi includono:

- iniezioni** di farmaci meno frequenti
- fluttuazioni ridotte** nei livelli di farmaco allo stato stazionario
- migliore gestione** delle condizioni patologiche attraverso il rilascio controllato
- maggiori margini di sicurezza** per i farmaci ad alta potenza a causa sia della somministrazione locale che del lento rilascio del farmaco.

La somministrazione sostenuta basata su nanoparticelle dell'inibitore VEGFR pazopanib (Nano-PAZII) tramite una singola iniezione di IA consente l'inversione dei sintomi dell'OA in diverse fasi dell'OA sperimentale. Questi risultati posizionano **Nano-PAZII** come una strategia farmacologica modificante la malattia praticabile e innovativa per l'OA.

Il team del **Dipartimento di Ingegneria Biomedica, Università dell'Illinois** ha pubblicato il report:

*Ma K et al*

**Nanoparticle-based inhibition of vascular endothelial growth factor receptors alleviates osteoarthritis pain and cartilage damage.**

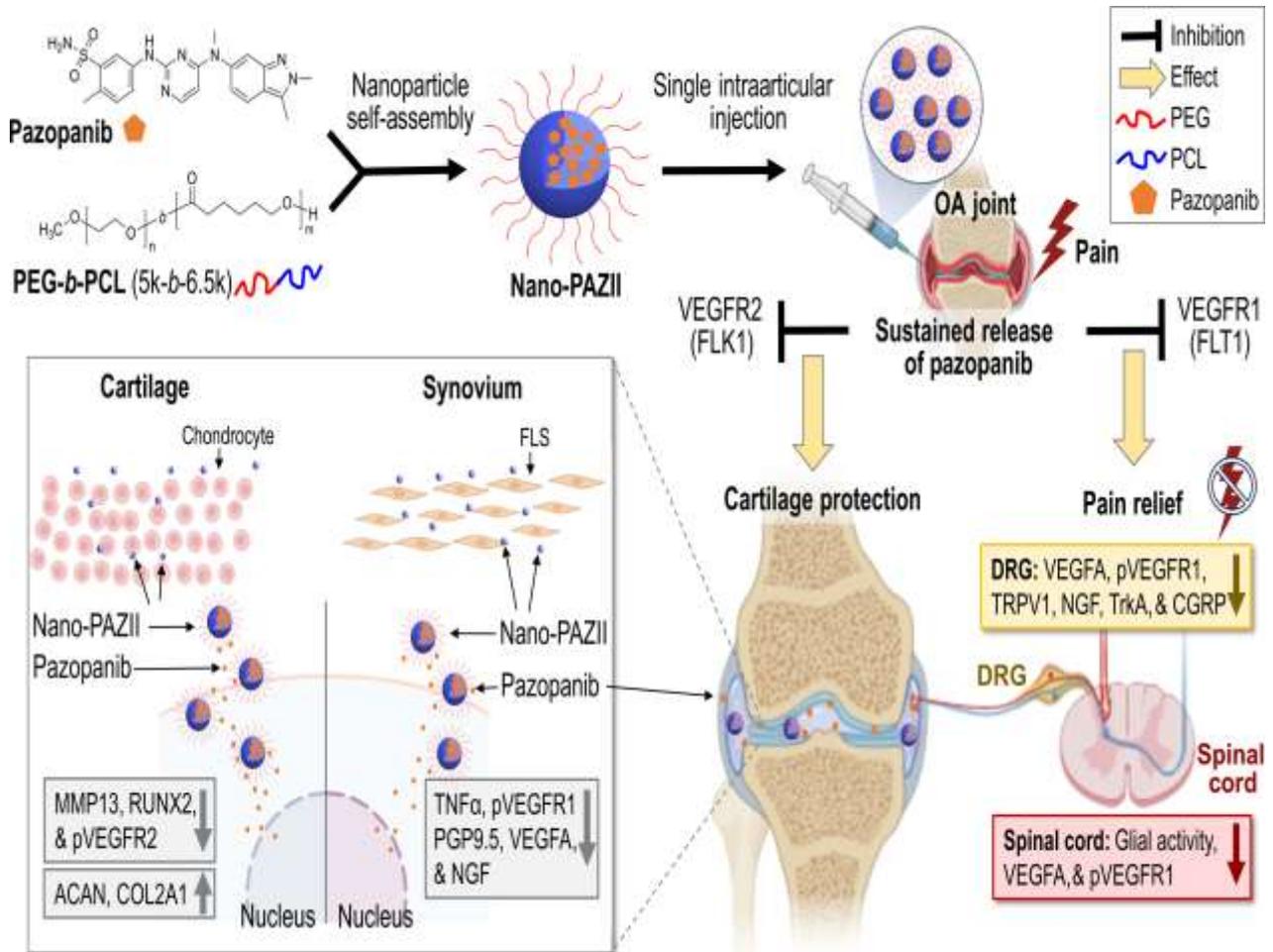
*Sci Adv.* 2024 Feb 16;10(7):eadi5501.

Poiché I recettori del fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGFR) sono stati associati alla gravità dell'OA, ipotizzando che gli inibitori che prendono di mira questi recettori alleviano il dolore (tramite VEGFR1) o la degenerazione della cartilagine (tramite VEGFR2) hanno sviluppato una formulazione basata su **nanoparticelle di pazopanib (Votrient)**, un farmaco antitumorale approvato dalla FDA che prende di mira sia **VEGFR1** che **VEGFR2** (Nano-PAZII).

Hanno così dimostrato che una singola iniezione intraarticolare di **Nano-PAZII** può ridurre efficacemente il dolore articolare per un tempo prolungato senza effetti collaterali sostanziali in due diversi modelli preclinici di roditori con OA che coinvolgono l'induzione chirurgica (dopo meniscectomia mediale parziale) o non chirurgica (con monoiodoacetato).

L'iniezione di **Nano-PAZII** blocca **VEGFR1** e allevia il dolore da OA sopprimendo la crescita neuronale sensoriale nella sinovia del ginocchio e la plasticità neuronale nei gangli della radice dorsale e nel midollo spinale.

Allo stesso tempo, l'inibizione di **VEGFR2** riduce la degenerazione della cartilagine.



### Illustrazione schematica di una singola iniezione IA di nano-formulazione di pazopanib (**Nano-PAZII**) per il trattamento a lungo termine dell'OA.

Il diagramma mostra l'incapsulamento di **pazopanib** (in alto a sinistra) in nanoparticelle polimeriche (PEG-*b*-PCL) mediante nanoprecipitazione flash (FNP) per generare Nano-PAZII (in alto al centro). Una singola iniezione IA di **Nano-PAZII** (in alto a destra) è sufficiente per la riduzione rapida e duratura del dolore all'articolazione del ginocchio.

Gli effetti terapeutici di **Nano-PAZII** sono attribuibili all'inibizione di VEGFR1/FLT1, che allevia il dolore cronico da OA, e all'inibizione di VEGFR2/FLK1, che protegge la cartilagine dalla degradazione correlata all'OA (in basso a destra), in linea con i nostri studi precedenti.

A livello cellulare, pazopanib rilasciato da **Nano-PAZII** nella cartilagine e nella sinovia (in basso a sinistra) riduce i biomarcatori negativi (ad esempio, fattori infiammatori, neurali e catabolici della cartilagine) e aumenta i biomarcatori positivi (ad esempio, proteine della matrice extracellulare della cartilagine).

*PCL, segmento policaprolattone-idrofobo; PEG, segmento idrofilo di polietilenglicole; FLS, sinoviociti simili ai fibroblasti; DRG, gangli della radice dorsale.*

***In sintesi:***

la somministrazione sostenuta basata su nanoparticelle dell'inibitore VEGFR pazopanib (Nano-PAZII) tramite una singola iniezione di IA consente l'inversione dei sintomi dell'OA in diverse fasi dell'OA sperimentale. Questi risultati posizionano **Nano-PAZII** come una strategia farmacologica modificante la malattia praticabile e innovativa per l'OA.

Questi risultati forniscono una nuova strategia farmacologica modificante la malattia basata sul meccanismo che affronta sia i sintomi del dolore che la perdita di cartilagine nell'OA.

# Astrociiti glutammerici

## Una rete neuronale ibrida coinvolta in patologie neurovegetative

Classicamente le cellule cerebrali possono essere in gran parte classificate in due tipi: neuroni e glia. Si ritiene generalmente che i neuroni comunichino tra loro attraverso le sinapsi, o giunzioni, tra di loro, mentre la glia non utilizza questo tipo di segnalazione.

La *trasmissione sinaptica* avviene quando un neurone è eccitato elettricamente e rilascia una sostanza chimica, chiamata neurotrasmettitore, nello spazio tra sé e un altro neurone, che porta all'attivazione del secondo neurone. Si pensava che questa capacità fosse esclusiva dei neuroni.



Nel 1998 **Andrea Volterra** nel report

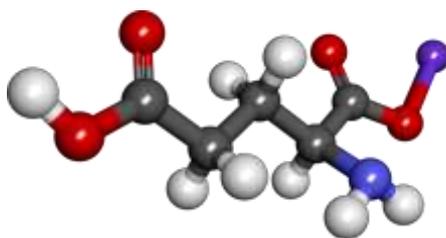
*Bezzi P et al A.*

### **Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes.**

*Nature. 1998 Jan 15;391(6664):281-5.*

Aveva ipotizzato che alcune cellule gliali potevano usare la trasmissione di tipo sinaptico per comunicare con le altre cellule formando una rete intimamente associata ai neuroni.

Queste cellule rispondevano all'attività neuronale e al **glutammato** aumentando a livello sinaptico la concentrazione di calcio intracellulare ( $[Ca^{2+}]_i$ ), con testimonianza di una retrosegnalazione neuronale.



Glutammato

L'inibizione farmacologica della sintesi delle prostaglandine preveniva il rilascio di glutammato, mentre l'applicazione delle prostaglandine (in particolare PGE2) imitava e occludeva l'azione di rilascio degli agonisti GluR.

I risultati rivelavano un *nuovo percorso* di rilascio regolato dei trasmettitori dagli astrociiti e delineano l'esistenza di un **cross-talk glutamatergico** integrato tra neuroni e astrociiti in situ che poteva svolgere un ruolo critico nella plasticità sinaptica e nella neurotossicità.

**In altre parole** Le comunicazioni multimodali astrociiti-neuroni potevano governare (regolare ?) l'assemblaggio e il funzionamento dei circuiti cerebrali **in particolare quelli ippocampali.**

Tuttavia, negli anni successivi, questi risultati si sono rivelati “controversi” poiché altri ricercatori hanno faticato a replicarli.

Nel 2023 **Andrea Volterra** con un nuovo team del *Wyss Center for Bio and Neuro Engineering, Campus di Losanna* nel report

*de Ceglia R et al.*

### **Specialized astrocytes mediate glutamatergic gliotransmission in the CNS.**

*Nature. 2023 Oct;622(7981):120-129.*

ha rivisitato l'ipotesi **dell'esocitosi del glutammato** degli astrociti considerando l'eterogeneità molecolare emergente degli astrociti e utilizzando approcci molecolari, bioinformatici e di imaging, insieme a strumenti genetici specifici delle cellule che interferiscono con l'esocitosi del glutammato in vivo.

Analizzando i database esistenti di **sequenziamento dell'RNA** di singola cellula i dati patch-seq, hanno consentito di identificare **nove cluster molecolarmente distinti di astrociti ippocampali**, tra i quali è stato identificato una sottopopolazione che esprimeva selettivamente **un meccanismo di rilascio del glutammato di tipo sinaptico e localizzato in siti ippocampali discreti**.

*Utilizzando l'imaging del glutammato basato su GluSnFR 22 in situ e in vivo, è stato identificato un sottogruppo di astrociti corrispondente che risponde in modo affidabile alle stimolazioni selettive degli astrociti con eventi di rilascio di glutammato subsecondi in hotspot spazialmente precisi, che sono stati soppressi dalla delezione mirata agli astrociti del trasportatore vescicolare del glutammato 1 (VGLUT1). Inoltre, la delezione di questo trasportatore o della sua isoforma VGLUT2 ha rivelato contributi specifici degli astrociti glutamatergici nei circuiti cortico-ippocampali e nigrostriatali durante il comportamento normale e i processi patologici.*

Scoprendo questa sottopopolazione atipica di **astrociti specializzati** nel cervello adulto, si sono avute informazioni preziose sui complessi ruoli degli astrociti nella fisiologia e nelle malattie del sistema nervoso centrale (SNC) e in particolare alla identificazione di un nuovo potenziale bersaglio terapeutico.

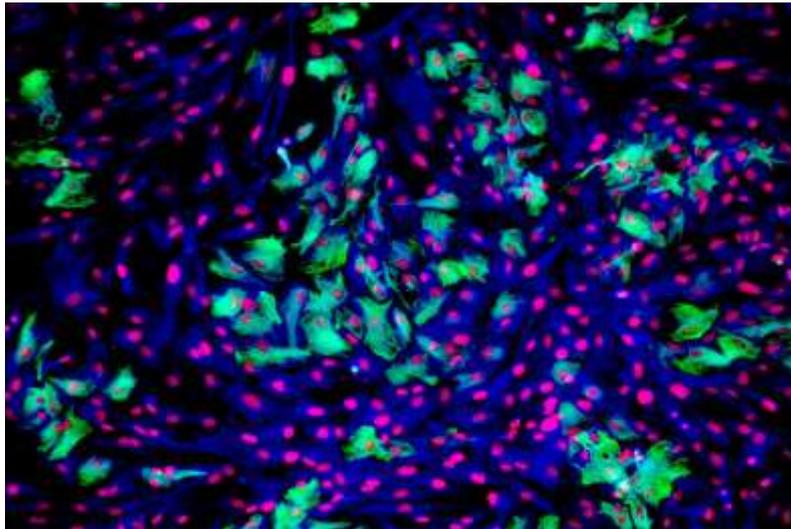
Il team ha analizzato i dati sulla produzione da parte dei geni nelle cellule di tipo di molecole di RNA, che sono intermedi nella produzione di proteine, per identificare i complessi proteici necessari per la trasmissione sinaptica in cellule diverse dai neuroni.

In particolare ha esaminato le cellule nella regione dell'ippocampo, perché è qui che la ricerca precedente affermava di aver individuato la trasmissione sinaptica non neuronale.

L'analisi ha rivelato diversi gruppi di astrociti, un tipo di glia, che sembravano possedere anche la capacità di prendere parte alla trasmissione sinaptica. **Le cellule sembravano rilasciare il neurotrasmettitore glutammato**, che è il neurotrasmettitore più comune nel cervello.

E' stata così confermata la presenza dei geni coinvolti in questo fenomeno studiando sezioni seriate di cervello di topi adulti.

**Queste cellule sono state rubricate come astrociti glutamatergici.**



**Astrociti glutamatergici**

**"Queste cellule sono un po' come gli astrociti e un po' come i neuroni", dice Volterra. "Secernono neurotrasmettitori con un meccanismo e una velocità che di solito sono collegati solo ai neuroni. È per questo che la chiamiamo una sorta di cellula ibrida".**



**Ludovic Telley** un componente del suo team utilizzando la microscopia a fluorescenza a due fotoni ha confermato il rilascio di glutammato da parte di queste cellule nel cervello dei topi. I segnali che vediamo sono in ordine di velocità simili ai neuroni e le firme proteiche simili della trasmissione sinaptica nelle cellule non neuronali degli esseri umani esaminando i set di dati esistenti.

Attualmente I ricercatori non sanno quante di queste cellule si trovano nel cervello o se si trovano principalmente nell'ippocampo.

**Non è chiaro il motivo per cui il cervello ha bisogno di cellule gliali che comunicano tramite trasmissione sinaptica, dice Volterra.** Egli ipotizza che ciò potrebbe portare a un maggiore coordinamento dei segnali. **"Spesso abbiamo informazioni neuronali che devono diffondersi a insiemi più grandi e i neuroni non sono molto bravi per il coordinamento di questo",** dice.

*Nei topi un astrocita può essere in contatto con 100.000 sinapsi, il che potrebbe significare che i segnali vanno oltre in modo più coordinato, dice. Possono raggiungere milioni di sinapsi negli esseri umani.*

*Queste cellule sembrano trovarsi anche **nei circuiti cerebrali coinvolti nel movimento, che degenerano nella malattia di Parkinson**, dice Volterra. **Una migliore comprensione di queste cellule potrebbe darci una visione più approfondita su come affrontare questa condizione.***