

Xenotransplant

Modelli Animali di Terapie Cellulari

Dott. Massimo Dominici

Malvina Prapa, PhD student

Filippo Rossignoli, PhD student

Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Materno-infantili e dell'Adulto
Scuola di Dottorato in Medicina Molecolare e Rigenerativa
Università di Modena e Reggio Emilia – Azienda Policlinico di Modena

XENOTRAPIANTO

Trapianto di cellule, tessuti od organi da una specie ad un'altra.

In particolare dagli animali all'uomo o viceversa.

COS'È?



DALL'ANIMALE ALL'UOMO...

Necessità di ripristinare organi, tessuti o funzioni, mancanti o deficitari.

QUANDO?

Metà 1600: Primi tentativi con cellule e tessuti (trasfusioni di sangue, innesti di pelle e parti di osso)

A partire dal 1900: anche interi organi



APPLICAZIONI

Attualmente:

- Dispositivi artificiali contenenti componenti animali (fegato bio-artificiale)
- Pelle di maiale per ferite da ustione
- Valvole cardiache biologiche
- Tessuti scheletrici



In studio:

- Trapianto di isole pancreatiche di origine animale.
- Trapianto di cellule nervose fetali di suino per malattie del SNC.

In futuro:

- Tessuti compatibili ottenuti da animali geneticamente modificati

...DALL'UOMO ALL'ANIMALE

Necessità sperimentale di un sistema quanto più simile all'uomo (con dei limiti)

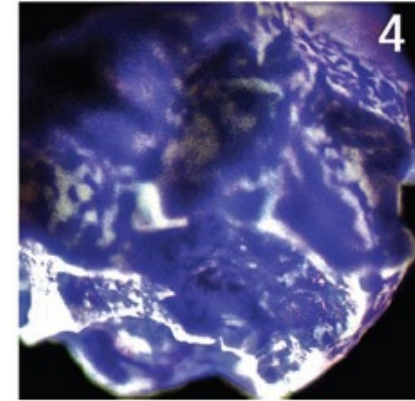
QUANDO?

1950-70s: Primi xenotrapianti di linee tumorali in modelli animali (*standard xenografts*) e di tumori umani in modelli murini (*tumorgrafts*)

2000s: Introduzione dei *genetically engineered mouse* (GEM) models

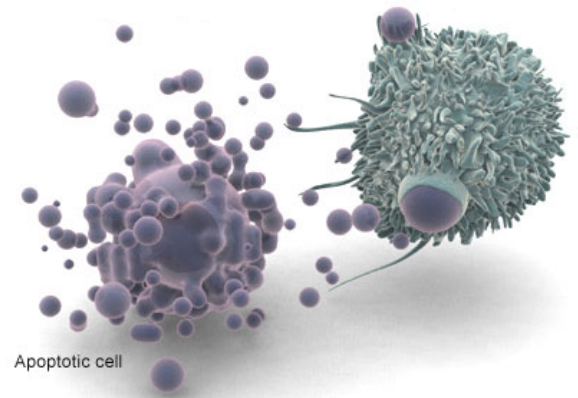
APPLICAZIONI

Medicina
rigenerativa



Studi di ontogenesi e
morfogenesi

Terapie cellulari



U.S. National Library of Medicine





Xenotrapianti nella ricerca sul cancro

Xenotrapianti di cellule primarie da paziente o linee cellulari tumorali in animali immunodeficienti

- Generalmente topi o ratti

Nude



Scid



Rag-2 -/-



Genotipo e fenotipo topi immunodeficienti

Nude



Gene FOXP1 regola lo sviluppo del timo e la differenziazione cheratinociti

Mutazione FOXP1 determina aplasia timica (immunodeficienza grave
→ assenza linfociti T) e alopecia

Scid



Gene PRKDC fondamentale nella via di maturazione linfocitaria

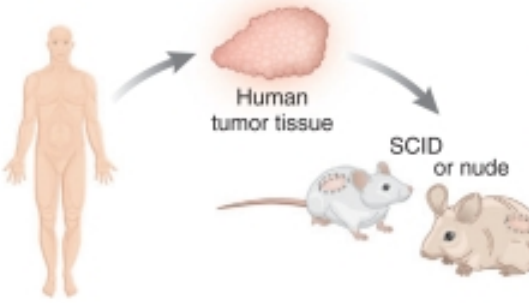
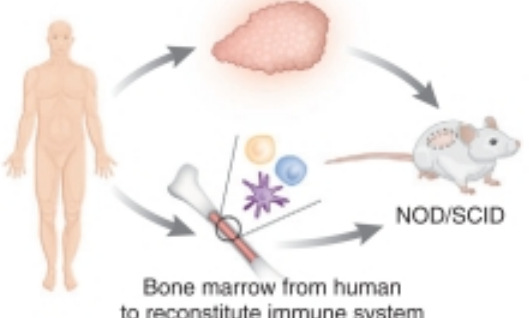
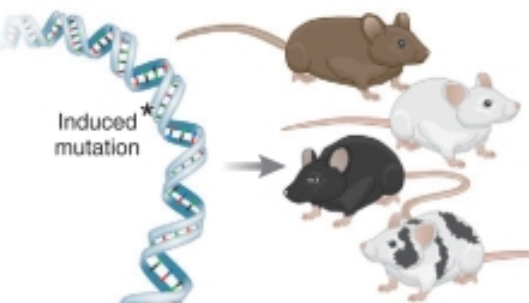
Mutazione PRKDC determina blocco maturativo di linfociti T e B

Rag-2 -/-



Gene RAG2 essenziale nella ricombinazione somatica

Mutazione RAG2 arresto della differenziazione linfociti T e B

	ADVANTAGES	DISADVANTAGES
Orthotopic xenograft of human tumors  Human tumor tissue SCID or nude	- Can predict the drug response of a tumor in a human patient - Provides realistic heterogeneity of tumor cells - Allows for rapid analysis of human tumor response to a therapeutic regime	- Mice are immunocompromised, providing a less realistic tumor microenvironment
Xenograft of human tumor in humanized mice  NOD/SCID Bone marrow from human to reconstitute immune system	- Appropriately mimics human tumor microenvironment - Can predict the drug response of a tumor in a human patient - Provides realistic heterogeneity of tumor cells	- Expensive - Technically complicated
Genetically engineered mice (GEM)  Induced mutation	- Potential analysis of many genetic backgrounds by using a variety of mouse strains - Tumor exists in the presence of competent immune system (realistic microenvironment) - Defined mutations can mimic those identified in human tumors - Can follow tumor development from early time points	- Targets a limited number of genes which is usually not reflective of the complex heterogeneity of human tumor cells - Development is costly and time consuming, often requiring years of work before validation - Tumor development in animals is slow and variable

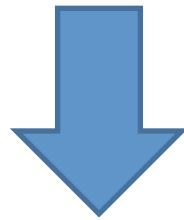
Scopi

Oncogenesi

- Studiare l'insorgenza dei tumori
- Studiare la progressione tumorale
- Studiare le interazioni con i tessuti
- Studiare il processo metastatico

Terapie

Valutare efficacia, sicurezza e cinetica dei trattamenti



Cercando di trarre conclusioni generalizzabili anche all'uomo

LIMITI DEL MODELLO DI XENOTRAPIANTO

- Tumori non si sviluppano attraverso un processo multistep
- Manca l'intervento di cellule infiammatorie e sistema immunitario
- Non riproducono fedelmente le interazioni tra cellule tumorali e ambiente stromale
- Linee cellulari sono molto uniformi potendo non rispecchiare l'eterogeneità del tumore
- Rappresentano degli stadi avanzati della malattia, con una progressione neoplastica massiva
- Spesso non sono in grado di dare luogo a metastasi

*Garber et al., 2009; Cancer and Metastasis Reviews; Gopinathan, Tuveson, 2008;
Walrath et al., 2010 Advances in cancer*



Sito di iniezione

Sotto cute



- Osservazione diretta
- Tumore palpabile e misurabile
- No metastasi

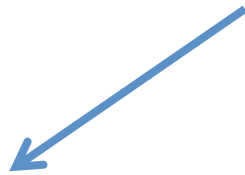
Ortotopico

- Maggiore fedeltà
- Dimensioni generalmente inferiori
- Metastasi

I risultati preclinici negli Xeno con linee cellulari possono non corrispondere ai successivi studi clinici



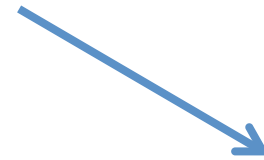
MODELLI ALTERNATIVI



GEM models



Xenotrapianti
personalizzati per
ogni paziente

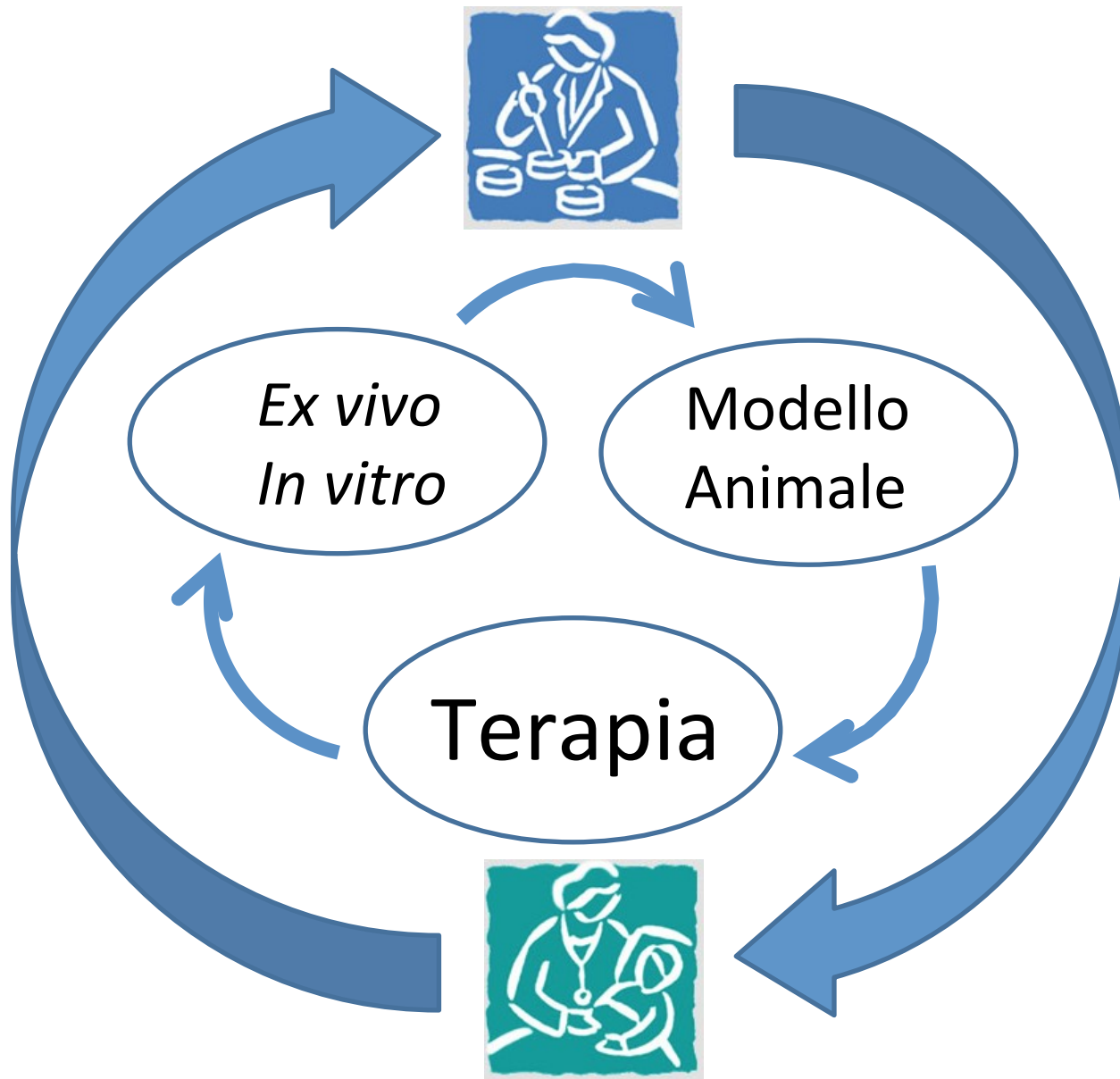


Induzione
chimica/fisica
del tumore

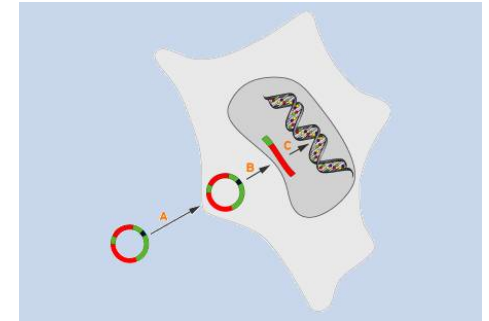
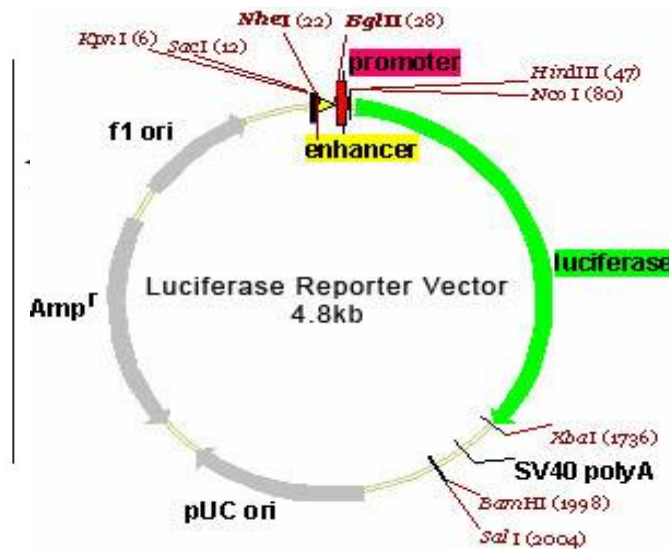
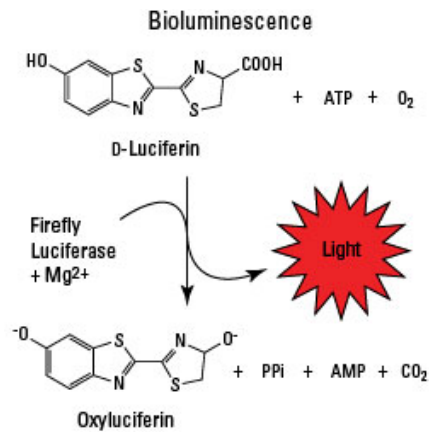
- Cellule Tumorali Primarie: Differenze donatore-specifiche

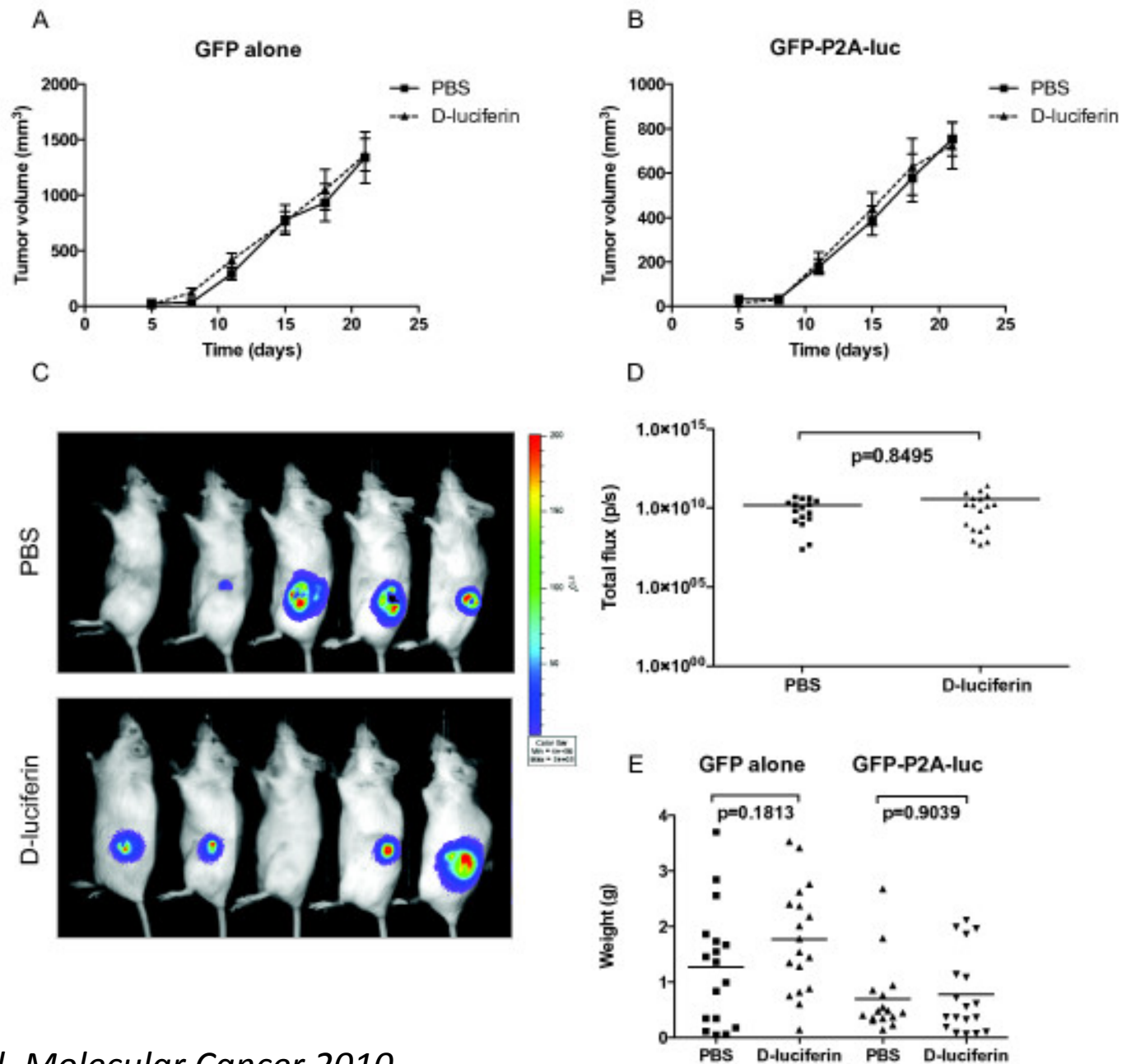


From the bench to the bedside



Live Imaging - BIO



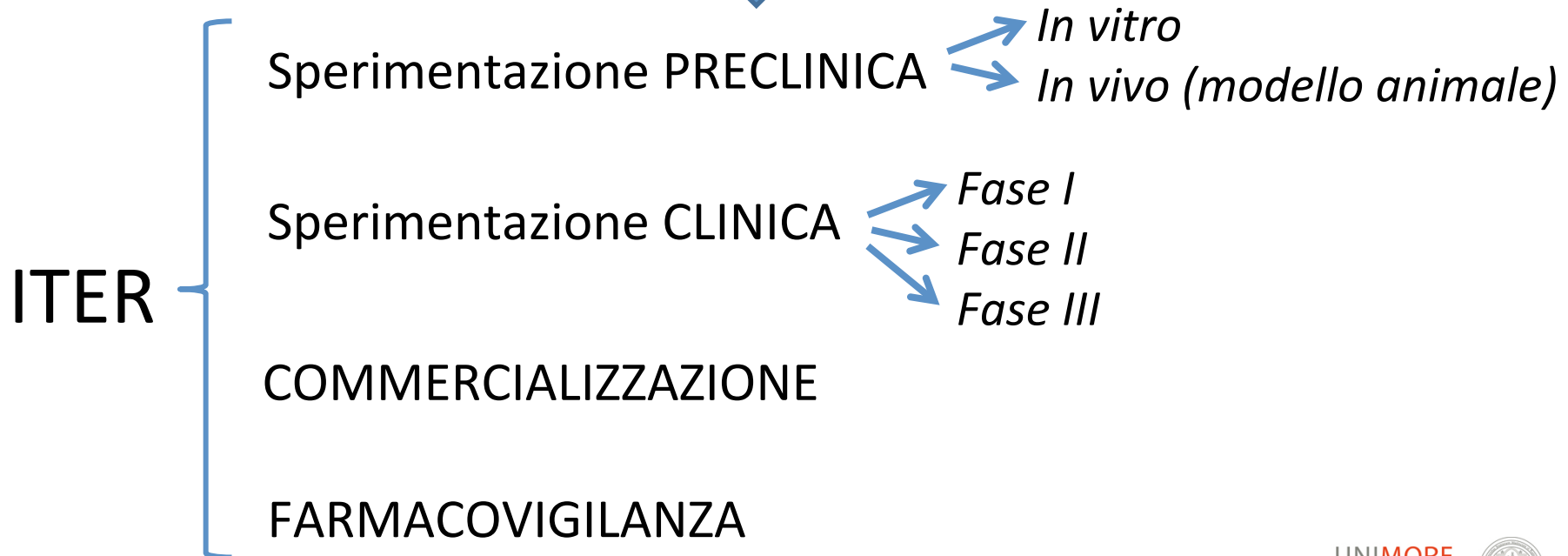


UN VELOCE SGUARDO NORMATIVO

Prodotti a base di cellule ingegnerizzate
(cellule sottoposte ad una manipolazione rilevante)

sono

PRODOTTI MEDICINALI



ANIMAL CARE



Decreto legislativo 27 gennaio 1992 , n. 116

disciplina la protezione degli animali utilizzati a fini
sperimentali o ad altri fini scientifici

Recepimento della Direttiva Europea 2010/63



Legge delega, Art. 13

(Criteri di delega al Governo per il recepimento della direttiva 2010/63/UE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 settembre 2010, sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici)

1. Nell'esercizio della delega per l'attuazione della direttiva (...) il Governo è tenuto a seguire (...) anche i seguenti principi e criteri direttivi specifici:

.
. .
.

f) vietare l'utilizzo di animali (...), **per gli xenotrapianti (...)**;



Ceppo JAX® Mice: NOD SCID



JAX® n°001303
Ceppo: NOD.CB17-
Prkdcscid/J

**non obesi
diabetici
immunodeficienti**

Mutazione spontanea omozigote del gene PRKDC (codificante per una componente del complesso enzimatico → ricombinasi V(D)J)



(la ricombinasi V(D)J media la RICOMBINAZIONE SOMATICA durante il processo di maturazione linfocitaria, riparando le rotture a doppia elica del DNA)



Il deficit di questo enzima si traduce nell'impossibilità dei linfociti T e B ed in gran parte NK di proseguire nel percorso maturativo.



Cancerogenesi tramite xenotrapianti

Linfopenia → Mancanza di una risposta immunitaria adattativa
Ipogammaglobulinemia → Immunodeficienza umorale



NOD/SCID MODELLO SPERIMENTALE IDEALE

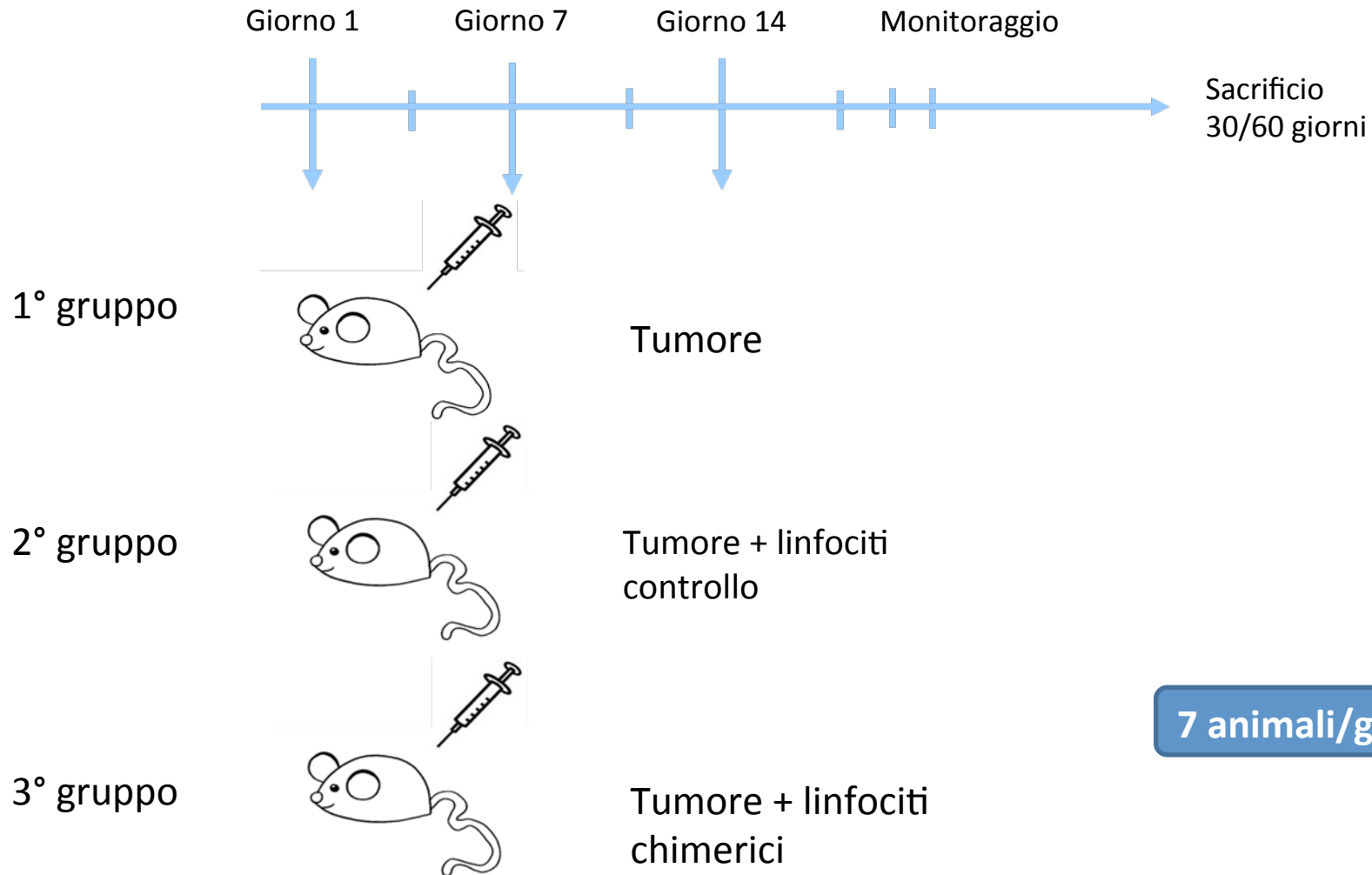
XENOTRAPIANTO DI CELLULE TUMORALI

- Età animali che entrano in sperimentazione → 6-8 settimane
- Suddivisione omogenea (sesso e peso) in gruppi sperimentali
- Inoculo di cellule per via sottocutanea → 200 ul di **matrigel** o di PBS



- Monitoraggio nel tempo → peso
- Sacrificio → necropsia (raccolta organi e materiale biologico)
- Valutazione in immunoistochimica del materiale raccolto

DISEGNO SPERIMENTALE



TRATTAMENTO → EFFETTORE:TARGET 5:1

		EFFETTORI	TARGET
Tumore	1° gruppo	/	1×10^6 cells
Tumore + linfociti controllo	2° gruppo	5×10^6 cells	1×10^6 cells
Tumore + linfociti chimerici	3° gruppo	5×10^6 cells	1×10^6 cells

MONITORAGGIO SPERIMENTAZIONE

SETTIMANALMENTE:

Peso animali

Misura volume masse tumorali in mm^3

Volume= length* width²/2

~ 1000-1200 mm^3 in 28 gg

FINE SPERIMENTAZIONE



Sacrificio animali in anestesia letale

NECROSCOPIA

SH-SY5Y



IMR32



IMMUNOISTOCHIMICA

Allevamento e mantenimento animali NOD/SCID in Biostab

- Specified Pathogen Free, cioè liberi da patogeni specifici
- In Biostab possono entrare soltanto animali provenienti da allevamenti certificati per essere mantenuti in condizioni sanitarie e ambientali rigidamente controllate
- L'uso di animali SPF è oggi fortemente raccomandato per gli studi di immunologia e di genetica, di tossicologia e di **oncologia**



Allevamento topi NOD/SCID

- L'allevamento si sviluppa in locali microbiologicamente controllati (area barrierata)
- L'accesso all'area barrierata è strettamente controllato e limitato per garantire il mantenimento di condizioni microbiologiche SPF
- Le procedure di ingresso del personale prevedono l'uso obbligatorio di indumenti sterili e il passaggio attraverso una doccia ad aria
- Tutti i materiali utilizzati all'interno della barriera (compreso le diete) sono sterilizzati in autoclave
- Gli animali sono stabulati in racks a ventilazione forzata (IVC) e mantenuti secondo i protocolli standard.



Servizio Standard

(operativo sia per gli animali “naive” che per quelli in sperimentazione)

- mantenimento in gabbie di dimensione idonee alla specie e alla consistenza del gruppo, disposte in racks o armadi ventilati
- somministrazione ad libitum di diete di mantenimento standard certificate, con caratteristiche specifiche per la specie
- abbeverazione, mediante biberon singoli, con acqua autoclavata
- cambio settimanale delle gabbie con sostituzione di gabbie pulite autoclavate
- monitoraggio giornaliero delle condizioni ambientali (temperatura e umidità)
- controllo giornaliero dello stato di salute degli animali naive presenti
- pulizia e disinfezione dei locali
- presenza del personale per garantire i controlli anche nei week end e nei giorni festivi per 365 giorni l'anno
- monitoraggio sanitario delle colonie.



SPESE DI MANTENIMENTO

- Animali molto costosi (prezzo unitario → 120 euro)
- Spese di stabulazione della colonia e della sperimentazione
- Spese mangime e farmaci
- Zona barrierata SPF e strumentazione per anestesia dedicate



Grazie alla Direzione ed Al Personale
Tecnico Amministrativo dello
Stabulario

Grazie a Voi dell'Attenzione

