



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN FARMACIA**

TESI DI LAUREA

OLIGONUCLEOTIDI ANTISENSO NEL TRATTAMENTO  
DELL' IPOACUSIA NEUROSENSORIALE

RELATORE:

Chiar.ma Prof.ssa Maria Teresa Conconi

LAUREANDO:

Alfredo Lequaglie

ANNO ACCADEMICO 2021/2022



*A Giovanni*

*Che l'ascolto di parole di Verità ti arricchisca di ideali,  
che la tua voce li manifesti,  
e che la tua vita li realizzi.*

*Zio Alfredo*



Oligonucleotidi antisenso nel  
trattamento dell'ipoacusia  
neurosensoriale



# INDICE

<b>1. CAPITOLO 1</b>	<b>1</b>
1.1. INTRODUZIONE	1
<b>2. CAPITOLO 2</b>	<b>3</b>
2.1. ANATOMIA E FUNZIONE DELL'ORECCHIO	3
2.2. DISFUNZIONI VESTIBOLARI	7
2.3. PERDITA DELL' UDITO	7
2.4. PERDITA CONGENITA DELL'UDITO	8
2.4.1. Cause ambientali della perdita congenita dell'udito	9
2.4.2. Cause genetiche della perdita congenita dell'udito	16
2.5. MODELLI ANIMALI	31
2.6. METODI UTILIZZATI PER STUDIARE LA PERDITA DELL'UDITO	34
2.7. L'IMPIANTO COCLEARE E GLI SVILUPPI RECENTI NEI TRATTAMENTI DELLA PERDITA CONGENITA DELL'UDITO	37
2.7.1. Trattamenti farmacologici	40
2.7.2. Terapia genica	41
2.7.3. Editing genomico	45
<b>3. CAPITOLO 3</b>	<b>47</b>
3.1. GLI OLIGONUCLEOTIDI ANTISENSO	47
3.1.1. Modificazioni oligonucleotidiche	48
3.1.2. Meccanismo d'azione degli antisenso	54
3.1.3. Delivery degli ASO	57
3.2. IL PATISIRAN (ONPATTRO®)	58
3.3. GLI ASO CHE HANNO COME BERSAGLIO I microRNA	59
<b>4. CAPITOLO 4</b>	<b>61</b>
4.1. OLIGONUCLEOTIDI ANTISENSO PER IL TRATTAMENTO DELLA DISFUNZIONE DELL'ORECCHIO INTERNO	61
4.1.1. Trattamento della disfunzione dell'orecchio interno	61
4.1.2. Terapia con oligonucleotidi antisenso	66
4.1.2.1. RNA Interference	67
4.1.2.2. Oligonucleotidi antisenso Splice-Switching	71
<b>5. CAPITOLO 5</b>	<b>79</b>
5.1. CONCLUSIONI	79
<b>6. CAPITOLO 6</b>	<b>81</b>
6.1. BIBLIOGRAFIA	81





# 1. CAPITOLO 1

## 1.1. INTRODUZIONE

La perdita dell'udito è il disturbo neurologico più comune negli esseri umani. Più di 500 milioni di persone (quasi il 7% della popolazione mondiale) hanno una perdita dell'udito invalidante, un numero destinato a salire a quasi 1 miliardo entro il 2050. Una significativa perdita dell'udito si riscontra ogni 2-3 neonati su 1000 e in circa un terzo nelle persone oltre i 65 anni di età. La perdita congenita dell'udito è il difetto più comune di nascita. L'ipoacusia congenita influisce sull'acquisizione del linguaggio e sullo sviluppo sociale e cognitivo dei bambini. Le cause della perdita uditiva congenita sono molteplici e ad ora non esiste una cura. Le possibilità di trattamento sono limitate ad approcci palliativi, quali apparecchi acustici per i casi lievi e moderati, e impianti cocleari per le sordità gravi e profonde. Questi insieme anche alla logopedia possono aiutare a migliorare la qualità della vita e le capacità di comunicazione dei bambini sordi. Questo elaborato vuole fornire una panoramica dell'ipoacusia neurosensoriale, in particolare di quella congenita: sulle cause ambientali e genetiche, sui modelli animali comuni, sui metodi diagnostici, e sui recenti progressi nello sviluppo di terapie per trattare la sordità. Per questi ultimi viene qui approfondito l'approccio di editing genomico attraverso gli oligonucleotidi antisense. Viene quindi fornito un loro studio riguardante la tecnologia, il delivery, i target della malattia, e altre considerazioni chiave per lo sviluppo di questo approccio terapeutico.

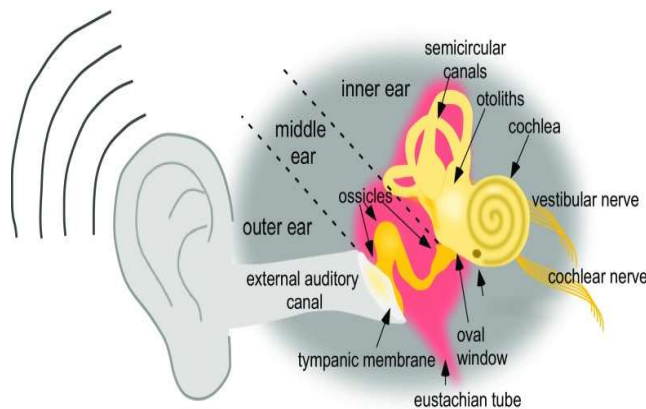


## 2. CAPITOLO 2

(le informazioni di seguito riportate sono state estratte dall' articolo di  
(Hastings and Jones, 2019)

### 2.1. ANATOMIA E FUNZIONE DELL'ORECCHIO

L'orecchio è suddiviso in orecchio esterno, medio e interno. L'orecchio interno ospita due organi sensoriali, cioè il sistema vestibolare, che fornisce informazioni di posizione cruciali per l'equilibrio, e la coclea, che rileva il suono ed è responsabile dell'udito. In alcuni casi, ma non in tutti, i problemi vestibolari accompagnano la perdita dell'udito. L'orecchio è progettato per rilevare il suono accoppiando l'ingresso di onde sonore nell'orecchio esterno con la vibrazione della membrana timpanica e il movimento meccanico della catena dei tre ossicini nell'orecchio medio, seguiti dalla trasduzione dei segnali meccanici in segnali elettrici nell'orecchio interno.

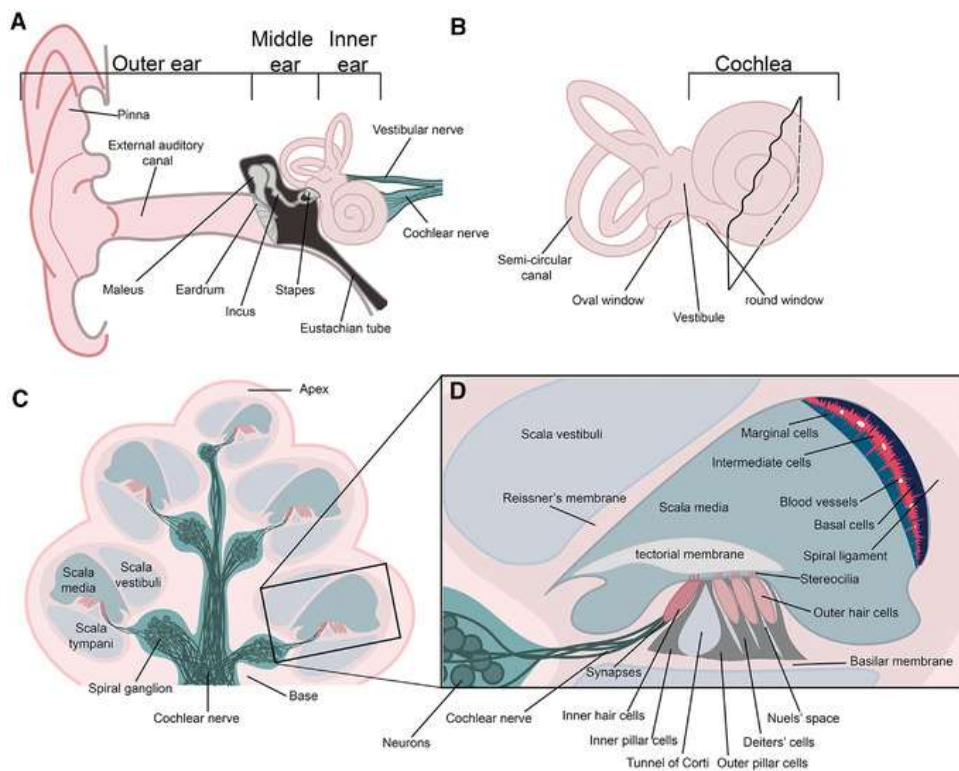


**Figura 1. Anatomia dell'orecchio.**  
Diagramma delle principali strutture dell'orecchio esterno, medio e interno.

Immagine di (Hastings and Jones, 2019)

L'orecchio interno è suddiviso in coclea, l'organo sensoriale primario per l'udito, in otoliti e in canali semicircolari, che costituiscono il sistema vestibolare periferico. Il movimento degli ossicini fa pressione su un'apertura dell'orecchio interno coperta da una membrana chiamata finestra ovale. Questa pressione sposta la perilinfa dell'orecchio interno, creando un'onda che viaggia attraverso la coclea, deprimendo la membrana

basilare nella coclea, e questo movimento viene infine compensato alla finestra rotonda. La finestra rotonda stessa è una membrana alla base della coclea che consiste in due strati epiteliali interno ed esterno e uno strato fibroso medio. La membrana basilare forma la base dell'organo del Corti, che contiene 3 tipi di cellule, cioè le cellule ciliate interne (IHC), le cellule ciliate esterne (OHC) e le cellule di sostegno (SC) (Fig. 2). Le cellule ciliate sono cellule meccanosensoriali altamente organizzate con proiezioni simili a ciglia sulla loro superficie chiamate stereociglia che, quando vengono flesse dal movimento della perilinfa a seguito di una vibrazione sonora, creano potenziali recettoriali che inducono il rilascio di neurotrasmettitori sulle terminazioni sinaptiche dei neuroni del nervo cocleare (cioè acustico). Questo segnale sensoriale viene poi trasmesso attraverso il ganglio spirale e ritrasmesso attraverso i nuclei del ponte, del mesencefalo e del talamo alla corteccia uditiva nel lobo temporale. In questo modo, le onde sonore sono trasmesse dall'orecchio esterno all'orecchio medio fino all'orecchio interno, e alla coclea e sono convertite in segnali elettrici attraverso le IHC. Questi segnali sono poi trasmessi al cervello tramite neuroni afferenti e percepiti come suono. La perdita o l'assenza di cellule ciliate comporta l'incapacità dei neuroni di trasmettere le informazioni alle vie acustiche centrali, causando la perdita dell'udito. La perdita delle cellule ciliate è permanente in quanto la rigenerazione non avviene negli esseri umani.



**Figura 2. Anatomia dell'orecchio.** (A) L'orecchio esterno trasmette le vibrazioni sonore all'orecchio medio attraverso il canale uditivo esterno. Le ossa dell'orecchio medio trasmettono la pressione delle vibrazioni sonore nella rampa vestibolare, contenente perilinfia, dell'orecchio interno attraverso la finestra ovale. (B) L'orecchio interno ospita gli organi sensoriali del sistema vestibolare responsabili del rilevamento del movimento e dell'accelerazione, e la coclea, che ospita l'organo uditivo del Corti. (C) Sezione attraverso i giri della coclea. (D) Ingrandimento di un giro della coclea che mostra le cellule di sostegno, le cellule ciliate interne ed esterne dell'organo del Corti, le sinapsi delle cellule ciliate interne con i neuroni dell'VIII nervo cranico (ganglio cocleovestibolare), e le cellule marginali, intermedie e basali della Stria Vascolare.

Immagine di (Renauld and Basch, 2021)

L'ipoacusia è tipicamente valutata testando la sensibilità uditiva, eseguita misurando le soglie dell'udito, definite come il livello più basso di suono che può essere sentito il 50% delle volte. Le soglie uditive sono misurate in decibel (dB) e la soglia è valutata a diverse frequenze (Hertz, Hz) in ogni orecchio, per determinare il grado di perdita uditiva in funzione di quanto la

soglia uditiva è al di sopra della norma. Per esempio, soglie che sono da 26 a 40 dB più alte del normale indicano una perdita uditiva lieve, moderata se 41-55 dB, moderata-grave 56-71dB, mentre soglie maggiori di 91 dB sono un'indicazione di perdita profonda. Un test ampiamente utilizzato per determinare una risposta uditiva e quindi valutare le soglie è la risposta uditiva del tronco cerebrale (ABR), che è un potenziale evocato dall'udito generato in risposta alla stimolazione sonora che è prodotta da impulsi elettrici del nervo cocleare e del tronco encefalico. Questi impulsi nervosi sono rilevati come onde e sono indicativi della risposta nel sistema periferico (cioè il nervo cocleare) seguiti da onde di attività nei circuiti uditivi del sistema nervoso centrale. Ritardi, o assenza di risposte ABR, indicano una disfunzione uditiva. Ulteriori misurazioni dell'udito che sono spesso utilizzate nella valutazione della sordità comprendono la valutazione delle emissioni otoacustiche (OAE), che sono suoni generati dall'orecchio interno come risultato dell'amplificazione del suono da parte delle cellule ciliate esterne. Le OAE sono assenti in seguito al danno delle OHC, e quindi la misurazione di questi suoni permette la valutazione diretta della funzione delle cellule ciliate esterne.

Nell'orecchio interno è poi presente l'apparato vestibolare. Il cervello ha bisogno del sistema vestibolare per capire la sua posizione e il movimento. L'apparato vestibolare periferico è composto dagli otoliti e dai canali semicircolari, che, rispettivamente, riferiscono al cervello il movimento lineare e rotatorio della testa. Come la coclea, anche gli organi vestibolari funzionano attraverso il movimento delle stereociglia sulla superficie delle cellule ciliate sensoriali, anche se qui, a differenza delle cellule ciliate cocleari, l'attivazione meccanica delle stereociglia è in gran parte indotta dai cambiamenti di posizione della testa e dall'angolo rispetto all'attrazione gravitazionale della Terra. Come l'udito, l'equilibrio può essere valutato con metodi comportamentali e fisiologici. Una misura diretta della funzione vestibolare è il potenziale evocato vestibolare miogenico (VsEP), che comporta una valutazione dei potenziali d'azione generati dal nervo vestibolare in risposta al movimento della testa come registrato dalla superficie del cranio, simile all'ABR.

## **2.2. DISFUNZIONI VESTIBOLARI**

La disfunzione vestibolare si manifesta con vertigini e disorientamento spaziale e spesso è accompagnata da un'alterazione dell'equilibrio. Colpisce fino a 90 milioni di persone solo negli Stati Uniti, la prevalenza della disfunzione vestibolare aumenta con l'età, il 35% degli adulti sui 40 anni soffre di questa condizione e fino al 70% delle persone oltre i 70 anni. I problemi vestibolari aumentano il rischio di cadute, di lesioni legate alle cadute e morte, e quindi hanno un grande impatto sulla salute e sul benessere socioeconomico. I disturbi dell'equilibrio possono derivare dalla compromissione vestibolare periferica o da deficit del sistema nervoso centrale. La disfunzione vestibolare può avere cause genetiche o può derivare da un numero qualsiasi di insulti, come ototossine o infezione virale, o condizioni, come la vertigine posizionale parossistica benigna, o la malattia di Meniere, anche se molti casi di deterioramento sono degenerativi e idiopatici. Si sa considerevolmente poco sulle cause genetiche della disfunzione vestibolare rispetto alla perdita dell'udito. Ci sono poche mutazioni genetiche note associate a problemi vestibolari con l'eccezione di quelli associati anche con la perdita dell'udito, dove la disfunzione vestibolare è stata riscontrata colpire il 34% dei bambini con forme genetiche di ipoacusia. La riabilitazione vestibolare e un processo di compensazione probabilmente mediato dal sistema nervoso centrale possono ridurre i sintomi acuti, e attualmente non ci sono farmaci efficaci per il trattamento della disfunzione vestibolare persistente o ricorrente.

## **2.3. PERDITA DELL' UDITO**

La perdita dell'udito causata da danni o disfunzioni nell'apparato sensoriale dell'orecchio interno, denominata ipoacusia neurosensoriale (SNHL), rappresenta il 90% di tutte le perdite uditive umane. Ci sono molti tipi e cause di perdita dell'udito, tra cui la perdita dell'udito legata all'età (presbiacusia), perdita dell'udito indotta dal rumore, malattie autoimmuni, ototossicità indotta da farmaci, malattia di Meniere, tinnito e infezioni, e forme causate da mutazioni genetiche. Si stima che i fattori genetici causino più del 50% dei casi di SNHL, di cui la maggior parte coinvolga un singolo gene o una regione genetica. Le mutazioni genetiche possono anche

aumentare il rischio di perdita dell'udito legata all'età e altre cause di deficit dell'udito. Ad oggi, più di 6000 varianti geniche presenti in più di 150 geni sono state associate alla perdita dell'udito non sindromica e quasi 40 geni sono implicati nella perdita dell'udito sindromica, con più di 400 sindromi aventi una componente di perdita dell'udito. La maggior parte delle varianti genetiche associate alla perdita dell'udito sono autosomiche recessive (80%), mentre il 20% sono autosomiche dominanti.

## **2.4. PERDITA CONGENITA DELL'UDITO**

(le informazioni di seguito riportate sono state estratte dalla review di (Renauld and Basch, 2021)

L'ipoacusia neurosensoriale congenita è il difetto di nascita più comune; si stima che colpisca 2-3 ogni 1000 nati. Può colpire una o entrambe le orecchie. È stato dimostrato che nei bambini la perdita uditiva unilaterale è rappresentata dal 29% di casi, mentre bilaterale dal 71%. Inoltre, il 90% di bambini sordi ha genitori udenti.

È stato stimato che il 50% delle perdite uditive congenite sono dovute a cause genetiche e l'altro 50% a fattori ambientali (CDC 1999-2007).

Le cause ambientali possono essere divise in diverse categorie a seconda della loro origine, quali infezioni intrauterine, farmaci o traumi. Diversi patogeni hanno capacità di trasmissione verticale, il che significa che la barriera materno-fetale non protegge il feto dall'infezione. Le infezioni più comuni che possono essere trasmesse al feto con un effetto teratogeno sono raggruppate sotto l'acronimo TORCH (Toxoplasmosis-Others-Rubella-Cytomegalovirus-Herpes simplex). Tra questi, citomegalovirus, rosolia, herpes simplex, coriomeningite linfocitica, e l'infezione da Zika virus possono portare alla perdita congenita dell'udito.

Le cause genetiche della sordità congenita possono essere divise in due sottogruppi: sindromica e non sindromica. La prima, che è associata ad altri sintomi, rappresenta il 30% dei casi di origine genetica, mentre l'altra, dove



la sordità è l'unico sintomo, rappresenta il 70% dei casi, di cui circa la metà di questi ultimi sono dovuti ad una mutazione nel gene codificante la connessina (Lammens *et al.*, 2013).

### **2.4.1.Cause ambientali della perdita congenita dell'udito**

Le cause ambientali della perdita uditiva congenita, più comuni nei paesi a basso reddito e in via di sviluppo, sono diverse e includono infezioni virali, parassitarie o batteriche, così come l'uso di droghe e alcol durante la gravidanza.

#### ***Infezioni virali***

La causa non genetica più comune di sordità congenita è un'infezione in utero con citomegalovirus (CMV), che colpisce dallo 0,6% allo 0,7% dei neonati nei paesi industrializzati.

#### ***Citomegalovirus***

Negli Stati Uniti, si stima che le infezioni congenite da CMV colpiscano circa 26.500 neonati all'anno; di questi dal 10% al 15% presentano sintomi alla nascita. La perdita dell'udito legata all'infezione congenita da CMV può manifestarsi alla nascita o svilupparsi nel corso dei primi 3 anni di vita. Molti studi hanno riportato che il rischio di trasmissione in utero è maggiore durante il terzo trimestre, anche se questa infezione porterà a meno conseguenze per il feto. Nonostante il suo rischio teratogeno e la sua prevalenza nei paesi sviluppati e in quelli in via di sviluppo, non esistono vaccini efficaci per prevenire il CMV congenito. Si spera che ci sia un vaccino contro il CMV nel prossimo futuro, dato che diversi vaccini sono attualmente in fase di sperimentazione clinica.

Il meccanismo patogenetico dell'infezione congenita da CMV non è completamente compreso, ma diverse analisi sull'uomo e studi sui topi suggeriscono il coinvolgimento dei neuroni del ganglio spirale e della stria vascolare nella SNHL (perdita uditiva neurosensoriale). Più recentemente,

diversi studi di infezione postnatale hanno mostrato la stessa localizzazione del virus nell'orecchio interno e hanno dimostrato la degenerazione della vascolarizzazione della stria vascolare e del legamento spirale. Uno studio postnatale nel topo ha mostrato la rapida perdita di nastri presinaptici, che suggerisce una neurodegenerazione come un meccanismo della SNHL nell' infezione congenita da CMV. Un difetto nella stria vascolare potrebbe anche spiegare la perdita secondaria delle cellule ciliate e la progressiva SNHL in alcuni bambini.

### *Rosolia*

La rosolia è la principale causa di difetti alla nascita prevenibili con vaccino (OMS). Nel 2010, il numero di bambini nati in tutto il mondo con il virus della rosolia congenita è stato stimato in più di 100.000 all'anno. L'infezione di una madre incinta non sempre porta alla sindrome da rosolia congenita. Un feto ha il 90% di rischio di presentare sintomi se l'infezione insorge tra le 2 e le 10 settimane di sviluppo. Questo rischio scende drasticamente allo 0% dopo 19 settimane. La perdita dell'udito può essere presente alla nascita, ma il più delle volte viene rilevata tra i 6 e i 12 mesi di vita.

La fisiopatologia del virus della rosolia non è ben compresa. Il virus può infettare qualsiasi organo e creare un'infezione non litica nei feti. Diversi studi sull'uomo hanno mostrato cambiamenti nella stria vascolare, come la dilatazione dei capillari e l'atrofia della stria vascolare con presenza di linfociti e cellule mononucleate nello strato cellulare intermedio. La maggior parte dei neonati sordi esaminati avevano un collasso del condotto cocleare e del sacco.

### *Virus da Coriomeningite linfocitaria (LCMV)*

L'incidenza del LCMV sui difetti congeniti di nascita è difficile da valutare, principalmente a causa della sua somiglianza con altri difetti congeniti della nascita e l'assenza di linee guida per la diagnostica prenatale. Questa infezione zoonotica trasmessa dai roditori è portata principalmente dal topo

comune, e non è stata riportata alcuna trasmissione orizzontale da uomo a uomo se non attraverso il trapianto di organi. L'infezione congenita da LCMV porta fino al 35% di mortalità e i sopravvissuti presentano difetti nello sviluppo del sistema nervoso centrale se infettati all'inizio del processo di sviluppo. Diversi studi hanno riportato che la SNHL non è un sintomo comune dell'infezione congenita da LCMV, poiché la sua prevalenza varia tra il 7% e il 20% a seconda dello studio.

Il meccanismo patologico del LCMV è stato studiato principalmente nel sistema nervoso centrale.

### *Herpes simplex*

L'herpes genitale causato dal sierotipo HSV 1 o 2 è una delle malattie a trasmissione sessuale più diffuse nel mondo (Cherpes, Matthews, & Maryak, 2012). La prevalenza dell'HSV-1, che causa più comunemente l'herpes labiale, è stata stimata in circa il 48% della popolazione americana tra i 14 e i 49 anni nel 2015, mentre l'HSV-2, che comunemente colpisce i genitali, è stato stimato colpire il 12% della popolazione. Nonostante questo virus sia ampiamente diffuso, la percentuale di sieroconversione durante la gravidanza è stimata in meno del 2%, e di questa percentuale, meno del 3% dei neonati sarà contaminato dal virus. Diversi studi hanno dimostrato che la prima infezione o la riattivazione del virus nelle donne incinte porta ad un rischio estremamente basso di trasmissione in utero. La maggior parte dei casi di herpes neonatale sono acquisiti nel periodo perinatale. Indipendentemente dal fatto che l'infezione in utero è estremamente bassa, l'infezione fetale porta ad un cattivo esito, con alta morbilità e mortalità. Tra i sintomi congeniti, diversi ricercatori hanno notato la presenza di perdita dell'udito dal 10% al 33% dei neonati.

La fisiopatologia della perdita uditiva congenita dovuta all'infezione da herpes simplex non è nota, ma diversi studi su porcellini d'india hanno dimostrato il deterioramento della stria vascolare e dell'organo di Corti. Le analisi istologiche hanno rivelato una stria vascolare rigonfiata e la scomparsa delle cellule sensoriali nel giro basale della coclea.

## *Zika virus*

Una recente infezione teratogena, da Zika virus, è diventata un problema di salute pubblica quando l'epidemia si è diffusa in Sud America nel 2013. Questo patogeno trasmesso dalle zanzare è in grado di passare attraverso la barriera placentare per infettare il feto e creare problemi di sviluppo. L'incidenza dei difetti di nascita è difficile da valutare a causa della mancanza di strumentazione per RT-PCR necessaria per monitorare l'infezione nelle aree colpite. Questo problema potrebbe spiegare l'ampia gamma di deficit uditivi valutati in diversi studi, che vanno dallo 0% al 68% dei feti infettati. Un'altra spiegazione potrebbe essere la presenza di diversi ceppi di ZIKV con diversi livelli di aggressività. Diversi vaccini e terapie peptidiche antivirali sono stati sviluppati, e alcuni candidati vaccini sono attualmente in fase I di studi clinici per proteggere la popolazione dal virus Zika.

La patogenesi dello ZIKV è stata studiata in diversi modelli *in vitro* e in animali. Uno studio bioinformatico e *in vitro* ha dimostrato l'attivazione di una risposta proliferativa e pro-apoptotica P-53 nelle cellule progenitrici neurali umane in risposta a ZIKV. L'infezione in topi adulti ha rivelato la presenza di vacuolizzazione nella stria vascolare, nelle cellule scure del vestibolo e nel ganglio spirale. L'infezione in utero dei topi ha portato a deficit di udito dal 25% al 66% della prole.

## ***Infezioni parassitarie***

### *Toxoplasmosi*

Il *Toxoplasma gondii* è un protozoo parassita intracellulare che può infettare qualsiasi animale a sangue caldo. Questa comune zoonosi parassitaria utilizza il gatto come ospite. La sieroprevalenza, che riflette l'esposizione di una popolazione, varia notevolmente da paese a paese e aumenta con l'età. Uno studio tedesco ha stimato il rischio di sieroconversione, che corrisponde alla prima infezione, all'1% durante la gravidanza. Un'infezione da *T. gondii* passa spesso inosservata, poiché solo il 5% delle donne incinte

infette presentano sintomi. Il rischio di trasmissione verticale è in evoluzione dal 6% all'inizio della gravidanza fino al 72% alla trentaseiesima settimana.

Il meccanismo di patogenesi della SNHL da *T. gondii* non è noto, e il minore tasso di SNHL nei bambini trattati diminuisce la necessità di ricerca. Nel 2013, uno studio sull'osso temporale eseguito su neonati deceduti ha mostrato cisti da Toxoplasmosi del parassita sulla stria vascolare, sul legamento spirale e sulla macula sacculare. I ricercatori hanno concluso che le cisti possono essere una forma di cisti dormiente, poiché la loro presenza non era associata a necrosi dei tessuti o infiammazione.

### ***Infezioni batteriche***

#### *Treponema pallidum*

Sebbene la sifilide congenita sia spesso nota come un fattore di rischio per la perdita congenita dell'udito, recenti analisi sulla sifilide congenita non hanno mostrato alcun caso di perdita congenita dell'udito associata all'infezione in utero. Alcuni studi precedenti hanno indicato la sifilide congenita come causa di sordità congenita, ma la fisiopatologia non è chiara. Un fattore importante per questa modifica è l'introduzione della penicillina come trattamento che ha alleviato la morbidità associata all'infezione fetale.

### ***Alcol e oppioidi***

Nonostante il consumo di alcol durante la gravidanza sia la causa più prevenibile tra i difetti di nascita, la sua prevalenza raggiunge le 7 ogni 1000 nascite negli Stati Uniti. Le conseguenze più drastiche del consumo di alcol, chiamate sindrome feto-alcolica, sono state stimate a 1 nascita ogni 500-1000 nascite in Australia. Mentre alcuni studi hanno mostrato solo una tendenza all'associazione tra l'esposizione prenatale all'alcol e i difetti dell'udito, una meta-analisi ha mostrato una prevalenza del 56% per l'ipoacusia conduttiva e del 57% per la SNHL nei bambini affetti da sindrome feto-alcolica rispetto alla popolazione generale negli Stati Uniti.

Anche se la fisiopatologia associata alla perdita dell'udito non è nota, uno studio ha dimostrato un'incidenza del 19% nei ratti affetti da sindrome feto-alcolica, confermando il nesso causale tra alcol e difetti uditivi. La tossicità dell'alcol nella formazione del primo e secondo arco branchiale durante l'embriogenesi è stata suggerita come spiegazione della SNHL e della perdita uditiva conduttiva.

Gli studi che analizzano le conseguenze del consumo di cocaina o di oppioidi durante la gravidanza non hanno mostrato un aumento significativo della SNHL nei bambini da madri che abusavano di cocaina o oppioidi.

### ***Complicazioni neonatali***

L'ittero è un problema perinatale comune che avviene quando la bilirubina contenuta nei globuli rossi è presente in quantità eccessiva nel sangue a causa di una temporanea mancanza di clearance da parte del fegato. Questa iperbilirubinemia che si verifica durante la prima settimana dopo la nascita è presente nel 60% fino all'84% dei neonati e di solito si risolve da sola. Tuttavia, il 7% dei neonati richiede un trattamento di fototerapia o in casi gravi una exsanguinotrasfusione per evitare lesioni neurologiche. Sfortunatamente, una perdita uditiva neurosensoriale si è vista nel 12% di questi neonati.

La fisiopatologia dell'iperbilirubinemia consiste in un problema delle vie uditive con normale funzione periferica dell'orecchio caratterizzata da cellule ciliate non danneggiate. Gli studi hanno dimostrato un aumento delle latenze ABR. Questo fenomeno può essere spiegato dall'aspetto degenerativo del ganglio spirale, dove i neuroni dimostrano dimensioni ridotte e una mancanza di assoni mielinizzati. La tossicità si verifica quando l'aumento della concentrazione di bilirubina nel sangue è superiore alla capacità di legame dell'albumina. Questa bilirubina non coniugata si diffonde attraverso la barriera emato-encefalica e la membrana cellulare per creare una neuroinfiammazione. Studi precedenti evidenziano la produzione di stress ossidativo e di stress del reticolo endoplasmatico (ER-stress) come causa della tossicità neuronale.

Sono stati utilizzati diversi modelli animali per capire i meccanismi con cui l'iperbilirubinemia induce la tossicità neuronale e la perdita dell'udito. Tra questi, il ratto Gunn ha il vantaggio di non possedere l'enzima uridina difosfato-glucuronosiltransferasi, e quindi presenta un'elevata concentrazione di bilirubina circolante per tutta la durata della vita del ratto. Diversi gruppi hanno anche studiato l'iperbilirubinemia acuta con la somministrazione di sulfadimetossina per ridurre il legame del siero. È stato anche sviluppato un modello di topo con enzima glucuronosiltransferasi 1a1 inattivo (Ugt1<sup>-/-</sup>). In questo modello di topo, il fenotipo è più drastico; un ittero si sviluppa subito dopo la nascita e i neonati muoiono un paio di giorni dopo a causa della neurotossicità della bilirubina. L'iniezione intraperitoneale di bilirubina e sulfadimetossina è stata utilizzata anche nei topi wild-type per indurre iperbilirubinemia. Questi studi non solo hanno permesso la comprensione della patogenicità dell'iperbilirubinemia, ma anche lo sviluppo di un potenziale trattamento per ridurre il rischio di danni neurologici indotti dalla bilirubina come la perdita dell'udito. Finora, diversi composti neuroprotettivi e antinfiammatori sono stati testati su questi modelli animali per trovare una terapia adiuvante per migliorare il protocollo già in atto.

Un'altra complicazione neonatale che può portare alla perdita dell'udito è l'emorragia intraventricolare. Questa patologia si sviluppa solitamente durante la prima settimana di vita dei neonati estremamente prematuri. La prevalenza è calcolata al 16% nei neonati sotto le 28 settimane, mostrando un aumento del rischio con la diminuzione dell'età gestazionale e del peso. Mentre la causa precisa non è ancora perfettamente compresa, l'im maturità del sistema nervoso centrale e l'alterazione del flusso sanguigno cerebrale nei prematuri possono portare a emorragia intraventricolare. Nel 9% dei casi, il neonato svilupperà una perdita dell'udito come conseguenza a lungo termine dell'emorragia intraventricolare.

Sebbene le cause ambientali rappresentino il 50% dei casi di sordità congenita, la maggior parte può essere prevenuta con la vaccinazione (rosolia), la consapevolezza degli effetti negativi (alcol), o il trattamento

precoce (T. gondii, iperbilirubinemia). Questi interventi riducono drasticamente la prevalenza della sordità congenita. Sebbene la ricerca abbia portato allo sviluppo di vaccini e trattamenti per evitare le conseguenze delle infezioni fetali, nuovi virus possono emergere in qualsiasi momento, come è stato dimostrato nel 2013 in Sud America durante l'epidemia del virus Zika o nel 2020 in tutto il mondo con la SARS-CoV2 (coronavirus, COVID-19). Poiché la ricerca su COVID-19 è troppo recente e ancora in corso, non ci sono informazioni sufficienti per conoscere il rischio di trasmissione verticale e di perdita congenita dell'udito nelle donne incinte infette. Test di laboratorio e screening dell'udito nel neonato dovrebbero essere effettuati alla nascita come precauzione e per garantire un intervento precoce se necessario.

#### **2.4.2. Cause genetiche della perdita congenita dell'udito**

Nell'ultimo secolo, più di 150 geni associati alla sordità sono stati identificati e studiati. La sordità genetica può essere classificata secondo il meccanismo patologico che porta alla perdita dell'udito. Le cause genetiche di sordità possono essere una ciliopatia, una neuropatia, una sinaptopatia, una neurocristopatia o un disturbo dell'omeostasi. La ciliopatia è una categoria di malattie causate dalla perdita delle funzioni fisiologiche delle ciglia. Le ciliopatie cocleari sono un gruppo di malattie che colpiscono lo sviluppo o il mantenimento dei fasci di stereociglia meccanosensoriali presenti sulla superficie apicale delle cellule ciliate sensoriali essenziali per l'udito. Sebbene le stereociglia non siano ciglia di per sé, queste strutture composte da actina richiedono il cilium primario delle cellule ciliate – il chinociglio-per un corretto sviluppo e orientamento. Le neuropatie uditive si riferiscono a un problema nella trasmissione del suono dalla coclea al cervello. Più specificamente, questo problema nasce a valle delle cellule ciliate ed è causato dall'interruzione degli impulsi nervosi che viaggiano dai neuroni del ganglio spirale al cervello. Le sinaptopatie uditive, patologie appena a monte della neuropatia uditiva, derivano da un'alterazione delle sinapsi a nastro delle cellule ciliate. Anche i problemi nell'omeostasi dell'orecchio interno sono ben noti per causare la perdita dell'udito. Le



giunzioni cellulari, i canali ionici e i loro regolatori giocano un ruolo essenziale nella specifica composizione dell'endolinfa richiesta per l'udito. Infine, una neurocristopatia è caratterizzata da un problema nello sviluppo delle cellule della cresta neurale. Per l'udito, le cellule della cresta neurale contribuiscono ad una significativa quantità di struttura dell'orecchio come la cartilagine del padiglione, gli ossicini e le cellule gliali e intermedie della coclea. Tutte queste patologie possono essere ereditate in modo recessivo o dominante per creare perdita dell'udito congenita o progressiva.

### ***Sordità sindromica***

La sordità sindromica si caratterizza per essere associata ad altri sintomi. Questi sintomi possono colpire un'ampia varietà di organi come gli occhi, la pelle, i reni e il cuore. Vengono qui di seguito discusse le cinque cause più comuni di ipoacusia sindromica congenita. La tabella 1 presenta un elenco dettagliato delle mutazioni che causano questi tipi di sordità sindromica.

### ***Sindrome di Usher***

La sindrome di Usher è una ciliopatia autosomica recessiva divisa in tre categorie in base alla gravità dei sintomi e all'età di insorgenza. L'Usher di tipo 1 è caratterizzata da una sordità profonda congenita, una disfunzione vestibolare e una perdita progressiva della vista a partire dalla prima decade di vita. La sindrome di Usher di tipo 2 è meno grave, con una sordità congenita da blanda a moderata e l'inizio della cecità dopo la pubertà. La sindrome di Usher tipo 3 è rara e presenta un'ipoacusia progressiva post-linguale e una cecità che inizia durante l'età adulta. Nel 2010, la prevalenza della sindrome di Usher è stata stimata fino al 9% della sordità congenita.

Per l'Usher di tipo 1, la MYO7A (Miosina 7a) è stata determinata come il gene più frequentemente implicato (53%), per il quale la metà delle mutazioni sono state previste portare a proteine troncate. Gli altri geni implicati nell'Usher di tipo 1 sono USH1C, CDH23, PCDH15, USH1G e CIB2. Per il secondo tipo di Usher che porta anch'esso alla perdita

congenita dell'udito, l'USH2A è stato determinato come il gene responsabile nel 79,3% dei casi. Gli altri geni implicati nella sindrome di Usher di tipo 2 sono VLGR1 (chiamato anche GPR98) e WHRN. Una recente meta-analisi ha calcolato la frequenza di questi geni in tutti i pazienti Usher. Lo studio ha mostrato che USH2A che codifica per l'Usherina contribuisce al 50% di tutti i casi di Usher e la MYO7A per il 21%.

**Tabella 1: sordità sindromica congenita con modelli murini**

Pendred	Pendrin	SLC26A4 KO	$Pds^{-/-}$ or $Slc26a4^{-/-}$	Everett et al. (2001)
	Pendrin	SLC26A4c.919-2A.G	$Slc26a4^{tm1Dontuh/tm1Dontuh}$	Y. C. Lu (2011)
	Pendrin	SLC26A4 p.H723R	$Slc26a4^{tm1Dontuh/tm2Dontuh}$	Y. C. Lu (2014)
	Pendrin	SLC26A4 hH723R	$mPDS^{-/-}$	Choi et al. (2020)
	Pendrin	SLC26A4 L236P	$Slc26a4^{L236P}$	Wen et al. (2019)
	Pendrin	SLC26A4 p.S408F	$Slc26a4^{loop/loop}$	Dror & Avraham (2010)
	Pendrin	SLC26A4 conditional KO	$Slc26a4^{\Delta/\Delta}$	Choi et al. (2011)
Usher Syndrome				
type 1	Myosin 7a	MYO7A	<i>Shaker-1</i> or $Myo7a^{Sh}$	Gibson et al. (1995)
type 1	Harmonin	USH1C	<i>Deaf circler</i> or <i>dfer</i> or $Ush1c^{dfer}$	Johnson et al. (2003)
type 1	Cadherin 23	CDH23	<i>Waltzer</i> or $Cdh23^v$	Di Palma et al. (2001); Wilson et al. (2001)
type 1	Protocadherin 15	PCDH 15	<i>Ames waltzer</i> or $Pcdh15^{aw-TgN2742Rpw}$	Alagramam et al. (1999)
type 1	Sans	USH1G	<i>Jackson shaker</i> or $Ush1g^{Js/Js}$	Kikkawa et al. (2003)
type 2	Usherin	USH2A	$Ush2a^{-/-}$	Liu et al. (2007)
type 2	Vlgr1	GPR98	$VLGR1^{deITM}$	McMillan & White (2004)
type 2	Whirlin	WHRN	$Whrn^{wi/wi}$	Mburu et al. (2003)
type 2	Cib2	CIB2	$CIB2^{-/-}$	Michel et al. (2017)
Jervell & Lange-Nielsen		KCNE1	$Isk^{-/-}$	Vetter et al. (1996)
			$Kcne1^{pkr}$	Letts et al. (2000)
		KCNQ1	$Kcnq1^{-/-}$	Casimiro et al. (2001)
Waardenburg		EDNRB exon 2-3 deletion	WS4	
		EDNRB exon 3 deletion	$Ednrb^{-/-}$	
		EDNRB KO	<i>Pieldbal-lethal</i> or $Ednrb^{s-1}$	Hosoda et al. (1994)
		EDN3	<i>Lethal spotting</i> $Edn3^{ls}$	Baynash et al. (1994)
		MITF Dominant mutation	$Mi^{Wh}$	Steingrímsson et al. (1994)
		MITF Recessif form	$Mi^{Vi}$	Steingrímsson et al. (1994)
		SNAI2	$Snai2^{del1}$	Jiang et al. (1998)
		PAX3	$Pax3^{Cre/Cre}$	Kim et al. (2014)
B-O-R		EYA1	$Eya1^{-/-}$	Xu et al. (1999)
		EYA1	$Eya1^{Bor}$	Johnson et al. (1999)
		SIX1	$Six1^{cwe/cwe}$ (catweasel)	Bosman et al (2009)

Tabella di (Renauld and Basch, 2021)

Come ricordato sopra, la sindrome di Usher è un disordine genetico eterogeneo per il quale già dieci geni sono stati scoperti finora. Ogni gene codifica una proteina espressa nelle cellule ciliate dell'organo del Corti. Sebbene i loro ruoli siano diversi, ciascuna delle proteine Usher partecipa alla formazione e al mantenimento del fascio di ciglia o del nastro di sinapsi, due strutture specializzate delle cellule ciliate meccanosensoriali. Sono stati utilizzati modelli di topo per capire meglio il ruolo svolto da ogni proteina Usher; alcuni di questi sono elencati nella tabella 1. Questi modelli hanno permesso ai ricercatori di notare un fenotipo comune con una forma anormale del fascio di ciglia caratteristico delle cellule sensoriali.

### *Sindrome di Pendred*

La sindrome di Pendred è caratterizzata da perdita dell'udito, un acquedotto vestibolare dilatato e la formazione di un gozzo (ingrandimento della ghiandola tiroidea) che di solito si sviluppa durante la pubertà. I sintomi possono variare da un paziente all'altro, dalla perdita dell'udito congenita a quella a insorgenza tardiva, e da un semplice allargamento dell'acquedotto vestibolare a una malformazione della coclea chiamata deformità di Mondini, che aggiunge all'allargamento una partizione incompleta della porzione apicale della coclea. Inoltre, la tiroide è anche spesso colpita da ipotiroidismo, anche se alcuni rari pazienti affetti da Pendred presentano già un ipertiroidismo. Questa sindrome è dovuta a una mutazione in una proteina chiamata pendrina, codificata dal gene SLC26A4. Più di 200 diverse mutazioni del gene SLC26A4 sono state trovate negli esseri umani finora. La prevalenza della sindrome di Pendred varia da paese a paese, mentre le mutazioni predominanti che causano la malattia mostrano anche differenze etniche e geografiche. Per esempio, la sindrome di Pendred rappresenta il 5% di tutte le perdite uditive prelinguali in Asia orientale. Sebbene la maggior parte dei pazienti con la sindrome di Pendred presentino una mutazione in uno o entrambi gli alleli del gene SLC26A4, in alcuni questo non avviene. Mutazioni negli elementi cis-regolatori critici per l'espressione di SLC26A4 così come mutazioni nei fattori di trascrizione necessari per la sua attivazione, possono anche portare alla sindrome di Pendred.

Studi approfonditi hanno cercato di capire la fisiopatologia della sindrome di Pendred nell'orecchio. Nei topi adulti, la pendrina si trova nella membrana apicale del sacco e del condotto endolinfatico, nel solco esterno associato alle lunghe proiezioni all'interno del legamento spirale, e nelle cellule di transizione vestibolari nell'utricolo e nel sacco, ma non nelle cellule scure. Un knockout completo della pendrina nei topi ha rivelato un organo del Corti degenerato, una forma irregolare delle cellule marginali della stria vascolare, e una diminuzione dell'espressione del canale del potassio KCNJ10. La dilatazione endolinfatica è visibile nell'E15.5, ma gli autori concludono che la malformazione è probabilmente una conseguenza di un progressivo deterioramento e gonfiore del compartimento endolinfatico quasi maturo, piuttosto che di un arresto nello sviluppo della coclea. Studi elettrofisiologici della coclea hanno dimostrato una normale concentrazione di potassio, ma un'abolizione del potenziale endococleare. Sono stati anche riscontrati l'acidificazione dell'endolinfa e un aumento della concentrazione di calcio. I ricercatori hanno ipotizzato che l'assenza di pendrina, che potrebbe secernere  $\text{HCO}_3^-$  nell'endolinfa, porti ad un'alcalinizzazione dello spazio intrastriale, che aumenterebbe i radicali liberi e lo stress ossidativo. La presenza di radicali liberi e l'acidificazione dell'endolinfa comporterebbero una riduzione dell'espressione di KCNJ10, essenziale per la generazione del potenziale endococleare e quindi dell'udito normale. Sebbene questi studi mostrino la fisiopatologia dell'assenza di pendrina, la maggior parte delle mutazioni umane porta a sostituzioni di aminoacidi o mutazioni frameshift. Attraverso studi in vitro si è notato che la maggior parte delle mutazioni prevalenti nella pendrina creano una ritenzione della proteina nella regione intracellulare invece di raggiungere la membrana plasmatica. Questa ritenzione avviene principalmente nel reticolo endoplasmatico, che recentemente è diventato l'obiettivo per lo sviluppo di una terapia per questa sindrome.

Diversi modelli di topi per la pendrina sono stati sviluppati nel tempo. Il primo presenta un'assenza totale di pendrina, che porta a una profonda perdita dell'udito e a problemi vestibolari, ma non riflette il fenotipo dei pazienti meno gravemente colpiti. Per questo motivo, altri ricercatori hanno sviluppato mutazioni puntiformi corrispondenti alle mutazioni trovate nei pazienti Pendred come H723R, la più comune tra le popolazioni asiatiche. Sorprendentemente, questa mutazione nel topo non ha portato alla perdita

dell'udito. Di conseguenza, il gruppo ha deciso di studiare questa mutazione puntiforme nella sequenza umana della pendrina, che porta a una perdita uditiva meno grave del knockout completo, riflettendo più da vicino la malattia umana.

### *Sindrome di Waardenburg*

La sindrome di Waardenburg è stata precedentemente stimata responsabile del 2% - 5,38% di tutte le perdite uditive congenite, ma un recente studio ha affermato che la prevalenza è molto più alta di quanto riportato in precedenza e può raggiungere il 9%, colpendo 1 su 10.000 neonati. La sindrome di Waardenburg è una neurocristopatia e può essere divisa in quattro categorie in base ai sintomi clinici. La sindrome di Waardenburg di tipo 2 è caratterizzata da perdita dell'udito e anomalie della pigmentazione. La sindrome di Waardenburg di tipo 1 aggiunge il telecaneto ai due sintomi precedenti, mentre quella di tipo 3 aggiunge anomalie muscoloscheletriche degli arti superiori ai primi tre sintomi. La sindrome di Waardenburg di tipo 4, chiamata anche Shah-Waardenburg, è caratterizzata da perdita dell'udito e anomalie della pigmentazione associate alla malattia di Hirschsprung, che corrisponde all'assenza di innervazione dell'intestino che porta ad un megacolon agangliare. Una meta-analisi eseguita nel 2015 ha mostrato che la Waardenburg di tipo 1 rappresenta quasi il 50% della popolazione affetta da Waardenburg, il tipo 2 rappresenta il 32,6%, il tipo 3 solo per l'1,7% e il tipo 4 per il 18,9%. Lo studio ha anche mostrato che la perdita dell'udito è presente nel 71% dei pazienti. Questa sindrome è geneticamente eterogenea, dove sono noti sei geni patogenici, PAX3 (tipo 1 e 3), SOX10 (tipo 2 e 4), EDNRB (tipo 2 e 4), ET3 (tipo 2 e 4), MITF (tipo 2), e SNAI2 (tipo 2). La penetranza e i fenotipi possono essere ampiamente variabili tra i pazienti anche nella stessa famiglia. Sono note altre neurocristopatie, che sono presentate in una recente revisione dal laboratorio di Donna Martin, come ad esempio la sindrome di Tietz albinismo-sordità, la sindrome craniofacciale-sordità-mano, la sindrome di Charcot-Marie-Tooth che provocano una profonda perdita dell'udito neurosensoriale (Ritter and Martin, 2019).

L'associazione di perdita dell'udito e ipopigmentazione che definisce la sindrome di Waardenburg è la conseguenza di un difetto nello sviluppo delle cellule della cresta neurale che evolveranno in melanociti. I geni coinvolti nella sindrome di Waardenburg sono tutti implicati nello sviluppo delle cellule della cresta neurale e nei loro derivati. Diversi studi sul tracciamento della discendenza e sulla delezione di geni hanno permesso ai ricercatori di collegare la sindrome con la scomparsa delle cellule melanocitiche nella cute e nella stria vascolare della coclea. Le cellule intermedie, originate dalle cellule della cresta neurale che migrano nella stria vascolare, sono essenziali per la formazione del potenziale endococleare, un componente chiave dell'udito.

Diversi modelli di topo hanno aiutato la comprensione della sindrome di Waardenburg, e ogni gene implicato è stato analizzato nei topi, mostrando la partecipazione di mutazioni recessive e dominanti. Diverse mutazioni in un gene hanno dimostrato portare a fenotipi diversi, come mostrato per MITF. La delezione specifica dell'espressione di EDNRB nelle cellule della cresta neurale ha confermato che il fenotipo Waardenburg deriva da difetti dello sviluppo delle cellule della cresta neurale.

### *Sindrome branchio-oto-renale (BOR)*

Come nel caso di molte sindromi rare, la prevalenza precisa della sindrome BOR è ancora sconosciuta. Due stime fatte da Fraser nel 1976 e nel 1980 suggeriscono che BOR rappresenta lo 0.15% o 2% di tutte le forme di sordità congenita. Il numero reale è probabilmente in questa gamma di prevalenza. Un altro ostacolo alla determinazione della prevalenza reale è la sovrapposizione dei sintomi con diverse altre sindromi come la sindrome otofacio-cervicale e la sindrome di Townes-Brocks. I fenotipi più comuni della sindrome BOR sono la perdita dell'udito (92%-98%), anomalie dell'arco branchiale (come la cisti della fessura branchiale palpabile nel collo, 50%-68%), fosse preauricolari (53%-83%), e anomalie renali come l'ipoplasia renale (38%-40%). La sordità può essere conduttiva (20%), SNHL (30%) o mista (40%), e alcuni studi hanno anche trovato una perdita progressiva dell'udito in pazienti con sordità non congenita. Il gene più comunemente colpito in pazienti BOR è l'EYA1. Altri due geni della famiglia

SIX sono stati scoperti in seguito come cause della sindrome BOR. Gli effetti delle mutazioni EYA1 e SIX1 sono stati studiati in diversi modelli murini. I geni EYA1 e SIX1 sono espressi all'inizio dello sviluppo, prima della formazione dell'orecchio. A E9, EYA1 e SIX1 sono espressi nella regione ventrale della vescicola ottica. Più tardi, il SIX1 è espresso nella regione che darà origine alla stria vascolare e al futuro dominio prosensoriale fino a quando la cellula uscirà dal ciclo cellulare. Nell'organo del Corti completamente differenziato, il SIX1 è anche espresso nelle cellule ciliate, il che potrebbe spiegare la progressiva perdita dell'udito osservata in alcuni pazienti. In un modello di topo non avente la proteina funzionale Eya1 o Six1, i topi eterozigoti presentano una conduzione del suono anormale a causa di anomalie morfologiche negli ossicini dell'orecchio medio. Il mutante omozigote per Eya1 muore alla nascita ma mostra palpebre aperte, gravi difetti scheletrici e craniofacciali, nessun rene, fosse preauricolari, ossicini malformati e nessuna struttura dell'orecchio interno o ganglio acustico. Un altro studio con una mutazione ipomorfica di Eya1 manifesta un fenotipo meno grave. Le analisi istologiche hanno rivelato una coclea ridotta, un quarto della dimensione normale, la presenza di un legamento spirale, ma senza una stria vascolare associata, e la completa assenza dell'organo del Corti.

Un modello di topo con una mutazione ipomorfica per Six1, chiamato Catweasel, è stato utilizzato per studiare l'implicazione di Six1 nello sviluppo dell'orecchio. Il mutante eterozigote presenta un fenotipo meno grave, con l'assenza di collegamento tra il centro della parte sensoriale della cresta posteriore e le cellule ciliate interne aggiuntive lungo la coclea. Il mutante omozigote ha una coclea tronca senza cellule sensoriali, simile al mutante Eya1<sup>-/-</sup>. Gli ossicini sono normali tranne che per l'incudine, che non presenta il lungo processo. Il canale semicircolare laterale e le finestre ovali e rotonde sono assenti. La vescicola uditiva si è formata ma non è riuscita a svilupparsi ulteriormente, creandone una gravemente ridotta. Altre ricerche evidenziano l'aumento della morte cellulare presente in entrambe le vescicole uditive dei topi omozigoti, ragion per cui la struttura dell'orecchio interno è piccola.

### *Sindrome di Jervell e Lange-Nielsen*

La sindrome di Jervell e Lange-Nielsen è una rara sindrome autosomica recessiva caratterizzata da sordità neurosensoriale e un intervallo QT prolungato all'elettrocardiogramma, che porta a sincope ricorrente e tachicardia. La sua prevalenza è stimata a 1 ogni 200.000 bambini sotto i 10 anni in Svezia. Questa prevalenza potrebbe essere sottostimata a causa dell'alto tasso di mortalità dovuto all'arresto cardiaco conseguente a tachicardie ventricolari di pazienti non trattati. Questa sindrome ha origine dalle mutazioni in due geni specifici: KCNQ1 e KCNE1 (precedentemente chiamati KvLQT1, KV7.1 o KCNA8 e LQTS, Mink o Isk, rispettivamente). Mentre le mutazioni in KCNE1 sono associate a un rischio inferiore di eventi cardiaci rispetto a KCNQ1, il KCNQ1 rappresenta il 90% dei pazienti e il KCNE1 rappresenta il restante 10%.

In termini di fisiopatologia, KCNQ1 codifica un canale del potassio che può formare eteromultimeri con Kcne1 per creare un canale del potassio rettificante ritardato dove Kcne1 è una subunità di regolazione. Questo canale eteromultimerico KCNE1/KNCQ1 svolge un ruolo essenziale nella produzione dell'endolinfa, come si è visto nel modello murino KCNE1 knockout (KO), dove il compartimento dell'endolinfa è interamente collassato a causa del collasso della membrana di Reissner a P3 (prima della comparsa dell'udito nel topo). Le cellule ciliate e il ganglio spirale degenerano più tardi. KCNE1 è localizzato all'apice delle cellule marginali della stria vascolare e delle cellule scure del vestibolo. KCNQ1 è anche localizzato all'apice delle cellule marginali. Uno studio di KNCQ1 KO ha anche mostrato il collasso della membrana di Reissner, ma il restringimento del volume dello spazio endolinfatico era meno importante che nel KCNE1 mutante. È interessante il fatto che un paziente con una mutazione intronica in uno sito di splice regolatorio di KCNQ1, che ha portato solo il 10% di trascrizione funzionale di KCNQ1, non abbia mostrato alcun difetto uditivo. Questo paziente omozigote indica che il 10% del KCNQ1 funzionale era in grado di mantenere un udito normale, ma era insufficiente per il cuore dove era stato osservato ancora un lungo QT.



## ***Sordità non sindromica***

I pazienti con ipoacusia non sindromica non presentano altri sintomi oltre alla sordità. Per la maggior parte, l'ipoacusia non sindromica autosomica dominante inizia dopo l'acquisizione del linguaggio nella prima-quarta decade di vita. Al contrario, l'ipoacusia non sindromica autosomica recessiva è congenita o pre-linguale, e profonda con poche eccezioni. Le patologie di sordità non sindromiche possono essere classificate in base ai loro nomi di locus, che corrispondono all'abbreviazione DFNA per autosomica dominante e DFNB per autosomica recessiva, seguita da un numero che corrisponde al loro ordine di scoperta (Tabella 2). Poiché alcuni geni possono possedere una variante recessiva e una variante dominante, alcuni DFNA corrispondono alla stessa posizione sul cromosoma come DFNB; questo è il caso di DFNB1 e DFNA3, come presentato più avanti. Ad oggi, 124 sono il numero totale di geni identificati finora associati all'ipoacusia neurosensoriale non sindromica, di cui 51 associati all'ipoacusia autosomica dominante e 78 all'ipoacusia autosomica recessiva, mentre 5 sono i geni associati all'ipoacusia non sindromica X-linked (Homepage Hereditary Hearing Loss, 2019). In questa sezione saranno trattate le più comuni ipoacusie congenite non sindromiche.

### *GJB2 o Connessina 26*

La perdita uditiva non sindromica più comune è causata da mutazioni nella proteina chiamata connessina 26. Le mutazioni nel gene GJB2 possono causare una perdita d'udito recessiva o dominante a seconda della mutazione presente nel locus DFNB1 A o DFNA3, rispettivamente, poiché entrambi mappano nella stessa regione del cromosoma 13. Una meta-analisi eseguita nel 2013 ha valutato una prevalenza mondiale di ipoacusia congenita autosomica recessiva dovuta a mutazioni GJB2 al 16,9%. La prevalenza è stata più alta in Europa col 27.1% e più bassa in Africa subsahariana (5.6%).

La Connessina 26 può assemblarsi con se stessa o con altre connessine per creare un canale chiamato connessione. Due connessioni omo- o eteromeriche su cellule adiacenti possono creare una giunzione gap che

permette la comunicazione intercellulare tra le due cellule, dove ioni e piccole molecole possono passare. Uno studio sui ratti ha dimostrato che la proteina connessina 26 è espressa nelle cellule di sostegno dell'organo di Corti, così come nelle cellule del solco interno e periferiche, mentre sulla parete laterale della coclea la proteina è espressa nei fibroblasti, nelle cellule intermedie e nelle cellule basali della stria vascolare. Questa espressione nella coclea crea due sistemi di giunzioni gap, cioè il sistema di giunzione gap epiteliale e quello del tessuto connettivo. La delezione della connessina 26 nella coclea permette ulteriori analisi del meccanismo di patogenesi associato alle mutazioni di GJB2. In questo studio, i ricercatori hanno mostrato l'assenza dell'udito nei topi adulti, un EP (potenziale endocleare) più basso, e una concentrazione di potassio nell'endolinfa, così come la morte delle cellule ciliate nell'organo del Corti. Hanno ipotizzato che il meccanismo della perdita dell'udito provenisse da un accumulo locale di potassio sotto le cellule sensoriali che potrebbe portare alla loro morte per stress ossidativo. Il ruolo importante delle giunzioni gap nel riciclaggio del potassio era già stato stabilito, e questa teoria è stata ampiamente accettata. Sebbene il meccanismo alla base della sordità sia ancora sconosciuto oggi, diversi risultati sono in contraddizione con questa ipotesi precedentemente accettata. Uno dei primi elementi di prova contrastanti fu la presenza di una perdita cellulare non significativa nell'organo del Corti o nel ganglio spirale dopo l'insorgenza dell'udito, anche se i topi presentavano una profonda sordità congenita. Più tardi, un altro studio ha dimostrato che la riduzione di EP osservata in assenza della connessina 26 non era abbastanza significativa per spiegare la sordità. Inoltre, la delezione della connessina 26 prima del P4 ha portato ad un tunnel di Corti collassato, mentre la delezione successiva del P6 non ha portato alla sordità dopo l'insorgenza dell'udito. L'assenza precoce di connessina 26 porta anche a sinapsi immature nelle cellule ciliate. Questa scoperta non era sufficiente a spiegare la sordità, ma ha confermato un problema di sviluppo nella coclea in assenza della connessina 26. Infine, l'assenza di difetti di sviluppo in un modello di topo senza la connessina 30 solleva la possibilità che la connessina 26 sia necessaria per le comunicazioni genetiche intercellulari attraverso miRNA per il corretto sviluppo dell'organo del Corti. Recentemente, uno studio ha dimostrato una relazione tra le cellule dei pilastri malformate e la perdita dell'udito in topi connessina 26-deficienti.

### *SLC26A4 o Pendrina*

Uno studio condotto in Francia ha dimostrato che nella popolazione caucasica, la mutazione nel SLC26A4 può rappresentare fino al 4% della sordità non sindromica nei bambini, rendendo questo gene la seconda causa più frequente di sordità non sindromica. La fisiopatologia della mutazione SLC26A4 è stata già spiegata nella parte relativa alla sindrome di Pendred, poichè questo gene può portare alla sindrome di Pendred così come il DFNB4.

### *OTOF o Otoferlina*

Un'altra importante causa della perdita uditiva congenita recessiva è il gene OTOF (locus DFNB9). Diversi studi hanno dimostrato che la prevalenza di mutazioni patogeniche OTOF rappresenta dal 2,3% al 7,3% delle perdite uditive prelinguali recessive, a seconda della regione del mondo studiato. Sorprendentemente, in Arabia Saudita, questo gene è responsabile del 33% delle perdite uditive neurosensoriali. La maggior parte dei pazienti colpiti presenta una perdita uditiva da grave a profonda pre-linguale. Il gene OTOF contiene 28 esoni codificanti e codifica molteplici isoforme lunghe e corte. Uno studio su una famiglia affetta ha dimostrato che le isoforme lunghe sono necessarie per la funzione dell'udito. Le mutazioni patogeniche sono ampiamente disperse tra il gene, e la maggior parte di esse sono uniche in una famiglia. Alcune varianti ricorrenti sono state scoperte in diverse popolazioni etniche. Tra le mutazioni più ricorrenti, possiamo trovare Q829X nelle popolazioni spagnole e p.R1939Q nelle popolazioni giapponesi.

Diversi studi hanno svelato il ruolo dell'otoferlina nel processo uditivo. L'immunomarcatura sul tessuto del topo ha mostrato l'espressione dell'otoferlina nelle cellule ciliate sensoriali dell'organo del Corti già da E16. Il ganglio spirale è anche reattivo per l'anticorpo anti-otoferlina per una breve finestra di tempo tra P2 e P7. Sebbene la marcatura persista negli stadi adulti nelle cellule ciliate interne, le cellule ciliate esterne smettono di esprimere otoferlina dopo P6, che corrisponde alla scomparsa dei contatti sinaptici afferenti presenti sulle cellule ciliate esterne. Nelle cellule ciliate

interne, la proteina si trova nella regione basolaterale delle cellule ciliate, associata alle vescicole sinaptiche. Lo studio di un modello di topo carente dell'otoferlina evidenzia l'assenza di udito di quei topi ad ogni frequenza, con la funzione corretta delle cellule ciliate esterne dimostrata da DPOAE. A causa dei difetti nella via uditiva, ma non nella funzione delle cellule ciliate esterne, questa sinaptopatia uditiva è stata classificata come una neuropatia uditiva. Studi istologici hanno dimostrato la normale morfologia delle cellule ciliate e delle loro sinapsi a nastro, anche se il loro numero era inferiore nell'omozigote knockout. Il gruppo di ricerca ha concluso che l'otoferlina è necessaria per l'esocitosi sinaptica del neurotrasmettitore tra le cellule ciliate e i neuroni del ganglio spirale. Per una corretta codifica del suono, le sinapsi afferenti delle cellule ciliate interne sono in grado di trasdurre il suono in impulso nervoso ad un alto tasso e con un alto grado di precisione. Per questo scopo specifico, la regione basolaterale della cellula contiene diverse vescicole legate di fronte ad una singola sinapsi a nastro. Una recente ricerca si è concentrata sul ruolo specifico dell'otoferlina in quelle sinapsi a nastro. Hanno dimostrato che la proteina funziona come un sensore di calcio, innescando la fusione delle vescicole sinaptiche con la membrana presinaptica e la ricostituzione del pool di vescicole alla sinapsi a nastro delle cellule ciliate interne. Più recentemente, le pecore sono state utilizzate per creare un modello animale di un grande mammifero con perdita dell'udito legata alla carenza di otoferlina, per consentire lo studio di possibili terapie.

La sordità congenita, che sia sindromica o no, dovrebbe essere determinata il più presto possibile per garantire il miglior risultato possibile. In casi di perdita uditiva sindromica, altri organi potrebbero essere colpiti e un trattamento appropriato potrebbe salvare la vita, come nel caso della sindrome di Jervell-Lange-Nielsen in cui il paziente è ad alto rischio di arresto cardiaco. Inoltre, è stato ben stabilito che i ritardi nel trattamento possono portare a ritardi nel linguaggio e nella cognizione. Un altro esempio dell'importanza della diagnosi precoce è la possibilità di un progressivo peggioramento dell'udito o la comparsa di altri sintomi come la cecità nella sindrome di Usher. La diagnosi precoce permette di fornire una consulenza

completa ai genitori e la capacità di affrontare i problemi all'inizio della vita del paziente.

Infine, con i recenti progressi nello sviluppo di un saggio su un pannello di perdita uditiva ereditaria (HHLP), che analizza 166 geni correlati alla perdita dell'udito non sindromico e sindromico, per rilevare varianti a singolo nucleotide (SNV), inserzioni e delezioni (indel) e varianti del numero di copie (CNV), la possibilità di identificare precocemente il gene interessato potrebbe diventare una realtà accessibile (Butz *et al.*, 2020).

**Tabella 2:** ipoacusie congenite non sindromiche con il loro locus classificato per causa di sordità

	LOCUS	GENE	Protein	Mouse model	References
<b>Homeostasis</b>					
	DNFB1	GJB2	Connexin 26	Cx26 <sup>flox/flox</sup>	Cohen-Salmon et al. (2002)
	DFNA3	GJB2 or GJB6	Connexin 26 and 30	Cx26 <sup>R75W</sup>	Inoshita et al. (2008)
	DNFB4	SCL26A4	Prendrin	mPDS <sup>-/-</sup>	Choi et al. (2020)
	DNFB39	HGF	Hgf	Hgf <sup>FUFI</sup> Hgf <sup>del10Neo</sup> and Hgf <sup>del10</sup>	Schultz et al. (2009) Morell et al. (2020)
<b>Synaptopathies</b>					
	DFNB9	OTOF	Otoferlin	Otof <sup>-/-</sup> Otof <sup>I515T/I515T</sup> Otof <sup>C2C/C2C</sup>	Roux et al. (2006) Strenzke et al. (2016) Michalski et al. (2017)
<b>Ciliopathies</b>					
	DNFB2	MYO7A	Myosin 7a	Shaker-1	Gibson et al. (1995)
	DNFB3	MYO15	Myosin 15	Shaker-2	Probst et al. (1998)
	DNFB6	TMIE	Tmie	Tmie <sup>sr/sr</sup>	Mitchem et al. (2002)
	DFNB7/11	TMC1	Tmc1	deafness or Tmc1 <sup>dn/dn</sup>	Kurima et al. (2002)
	DFNB12	CDH 23	Cadherin 23	Waltzer	Di Palma et al. (2001); Wilson et al. (2001)
	DFNB18	USH1C	Harmonin	Deaf circler or Ush1c <sup>dscr</sup>	Johnson et al. (2003)
	DFNB23	PCDH15	protocadherin 15	Ames Waltzer or Pcdh15 <sup>av-TgN2742Rpw</sup>	Alagramam et al. (1999)
	DFNB28	TRIOBP	Triobp	Triobp <sup>Δex8/Δex8</sup>	Kitajiri et al. (2010)
	DFNB29	CLDN14	Claudin 14	Cldn14 <sup>-/-</sup>	Ben-Yousef et al. (2003)
	DFNB30	MYO3A	Myosin 3A	Myo3a <sup>KI/KI</sup>	Walsh et al. (2011)
	DFNB31	WHRL	Whirlin	Whrn <sup>wi/wi</sup>	Mburu et al. (2003)
	DFNB36	ESPN	Espin	Jerker or Espn <sup>Je</sup>	Sekerková, Richter, & Bartles (2011)
	DFNB37	MYO6	Myosin 6	Snell's waltzer or Myo6 <sup>sv</sup>	Avraham et al. (1995)
<b>Others</b>					
	DNFB21	TECTA	alpha-tectorin	Tecta-Cre	Babola, Kersbergen, Wang, & Bergles (2020)
	DFNA8/12	TECTA	alpha-tectorin	Tecta <sup>C1509G/+</sup>	Xia et al. (2010)

Tabella di (Renauld and Basch, 2021)

## 2.5. MODELLI ANIMALI

Nella scelta di un modello animale per studiare la sordità congenita, devono essere considerati diversi parametri come i tempi di sviluppo, le malattie specifiche dell'ospite o la possibile trasmissione verticale durante lo sviluppo fetale. Questi parametri influenzeranno il disegno sperimentale a seconda del risultato desiderato, come la comprensione del meccanismo di progressione o la scoperta di un farmaco diretto contro la malattia studiata. In questa prospettiva, è importante notare che ci sono drammatiche differenze di sviluppo tra la maturazione del sistema uditivo umano e quello di altri mammiferi. Per questo motivo, è spesso necessario estrapolare la fase di sviluppo per studiare la malattia congenita e il trattamento in un modello animale. Viene qui di seguito presentata una rassegna sulle differenze di sviluppo tra quello dell'orecchio del topo e dell'uomo così come la traslazione di terapie da topo a uomo.

### *Zebrafish*

Lo zebrafish, *Danio rerio*, è diventato un popolare modello animale alternativo per la ricerca sull'udito negli ultimi due decenni. Per studiare le cellule sensoriali, il pesce zebra fornisce diversi vantaggi come modello animale. In primo luogo, possiede cellule ciliate nell'orecchio interno e nella linea laterale, che permette un facile accesso fisico alle cellule ciliate. In secondo luogo, si sviluppa rapidamente in pochi giorni dopo la fecondazione esterna, e le cellule ciliate maturano in un giorno. Questo permette una rapida esecuzione degli esperimenti e una rapida generazione dei dati. In terzo luogo, molte linee di pesci transgenici sono già disponibili, e l'espressione genetica di costrutti fluorescenti può essere facilmente ottenuta. Inoltre, gli embrioni e le larve trasparenti lo rendono un modello eccellente per l'imaging *in vivo*. Infine, le piccole dimensioni e la socievolezza di questo piccolo pesce lo rendono facile da mantenere in una piccola struttura, che è un vantaggio per lo screening di farmaci ad alta produttività e per la mutagenesi. Ma questo modello contiene anche alcuni inconvenienti, come una maggiore distanza evolutiva dall'uomo rispetto ad altri mammiferi come i roditori. Le cellule sensoriali della linea laterale posseggono proprietà fisiologiche simili agli organi vestibolari immaturi dei

mammiferi, ma sono diverse dalle cellule ciliate cocleari mature del topo. E infine, sebbene questo pesce sia un modello potente per lo screening dei farmaci, il fatto che viva sott'acqua, rende problematici i test di sostanze chimiche con bassa solubilità in acqua. In conclusione, il pesce zebra è un buonissimo modello animale per lo screening di composti farmacologici solubili per l'ototossicità o l'imaging *in vivo* di meccano-trasduzione e sinaptopatia delle cellule ciliate.

### *Pulcino*

Il pulcino è il modello animale più attraente per costruire reti di regolazione genica. La sua embriologia è molto ben descritta e simile allo sviluppo umano. L'embrione del pulcino ha una dimensioni più grande ed è facilmente accessibile, rendendo questo modello un organismo adatto alla manipolazione genica sperimentale e l'imaging *in vivo* per studiare i processi biologici dinamici e i processi di sviluppo come il destino delle cellule. L'otocisti (precursore dell'orecchio interno) è abbastanza facilmente accessibile per la manipolazione chirurgica, e porta ad un buon tasso di sopravvivenza embrionale. Le uova possono essere prodotte in gran numero, con la produzione di un uovo al giorno per pollo, consentendo esperimenti su larga scala. Un altro vantaggio del modello pulcino è che, a differenza dei mammiferi, le cellule ciliate possono rigenerarsi, il che ha permesso l'identificazione di percorsi per la rigenerazione. Tuttavia, il pulcino presenta alcuni svantaggi come le differenze morfologiche tra la papilla basilare e l'organo del Corti, e il lungo tempo di generazione per la maturità sessuale (6 mesi). Recentemente, i ricercatori hanno individuato la quaglia giapponese come un'interessante alternativa. La quaglia presenta diversi vantaggi rispetto al pulcino, come una più piccola dimensione e una maturità sessuale accelerata di 6 settimane, che è più breve del topo (8 settimane) e dello zebrafish (12 settimane) presentati in questa sezione.



## *Roditori*

I roditori sono diventati il modello animale più utilizzato per la ricerca sull'udito nell'ultimo decennio, poiché l'anatomia e la fisiologia dell'orecchio interno e del sistema uditivo centrale sono simili tra i roditori e gli esseri umani. I piccoli roditori permettono un periodo di gestazione relativamente breve (3 settimane) e la maturità in 3 mesi. Inoltre, possono generare diverse cucciolate all'anno, rendendo questo un modello animale efficiente in termini di costi. Rispetto allo zebrafish e al pulcino, i roditori condividono più somiglianze con gli esseri umani, dato che circa il 99% dei geni del topo hanno ortologhi umani. Diversi roditori come il topo, il ratto e il porcellino d'India hanno diversi vantaggi. Il modello di topo offre una grande varietà di mutanti genetici, il che può far risparmiare tempo e denaro. Ceppi consanguinei geneticamente identici sono anche un vantaggio prezioso per l'identificazione della funzione del gene. Tuttavia, come gli altri modelli animali, i topi hanno diversi svantaggi, come la loro bassa socievolezza rispetto al ratto e al porcellino d'India e l'esistenza di diversi ceppi di topi che mostrano una progressiva perdita dell'udito già a partire da 2 mesi. L'insorgenza precoce della perdita dell'udito in questi modelli crea una finestra molto stretta in cui studiare le terapie. Il ratto è un buon compromesso tra l'alta socievolezza del porcellino d'India e il grande repertorio di mutazioni genetiche già disponibile nel topo. La loro frequenza uditiva, che va da 520 Hz a 70 KHz, è anche più vicina alla gamma umana nelle basse frequenze, poiché l'udito dei topi va da 2 KHz a 85 KHz, mentre l'umano è tra 2 Hz e 20 KHz. D'altra parte, il ratto è particolarmente suscettibile all'otite media, che ha un impatto sull'udito. Infine, il porcellino d'India è apprezzato per la sua facilità di manipolazione, la capacità di apprendimento e le dimensioni maggiori, che rendono la chirurgia più facile. Il porcellino d'India permette anche la trasmissione verticale delle infezioni materne come il CMV, a differenza del topo.

## 2.6. METODI UTILIZZATI PER STUDIARE LA PERDITA DELL'UDITO

Per comprendere il processo dell'udito e la fisiopatologia presente nei modelli di sordità, diversi metodi istologici ed elettrofisiologici sono stati sviluppati. Sebbene gli studi istologici non possano stabilire se l'udito è funzionale, questi metodi sono utilizzati di routine per comprendere la fisiopatologia alla base della sordità. La microscopia elettronica di superficie e l'immunostochimica sono metodi comuni utilizzati per studiare il corretto sviluppo delle cellule ciliate e delle loro stereociglia. Per studiare l'elettrofisiologia dell'udito, sono stati sviluppati diversi metodi. Qui vengono discussi quelli più usati.

### ***ASR: riflesso da spavento acustico***

Questo metodo, basato sulla risposta motoria dopo che l'animale ha sentito un breve suono forte, è efficace nell'identificare una profonda ipoacusia neurosensoriale. Questo metodo non invasivo è semplice e può essere usato in diverse specie. Nel roditore, questo riflesso può essere analizzato da un movimento completo del corpo o da un piccolo movimento dell'orecchio, chiamato riflesso di Preyer. Nello zebrafish, il riflesso è valutato da una curvatura del corpo seguita da una rapida accelerazione del piccolo pesce. Lo svantaggio di questo test è che è soggettivo, riflette solo l'orecchio migliore ed è insensibile alle perdite uditive meno gravi. Recentemente, per superare la soggettività di questo test, un gruppo ha sviluppato una classificazione automatica delle forme d'onda del riflesso da spavento acustico usando un metodo di apprendimento automatico, per il quale sono state utilizzate diverse famiglie di algoritmi per combinare le caratteristiche legate allo spavento in modelli predittivi robusti per prevedere se una forma d'onda ASR è uno spavento o no (Fawcett *et al.*, 2020).

### ***ABR: risposta uditiva del tronco cerebrale***

L'ABR è una delle misure elettrofisiologiche oggettive dell'udito più comunemente utilizzate. È un metodo non invasivo utilizzato per valutare lo stato di salute della via uditiva dai nervi cocleari al tronco cerebrale. Questo metodo è usato nei roditori da laboratorio, ed è anche usato nella clinica per lo screening di neonati, bambini e adulti per la sordità. Gli elettrodi sono posizionati sul cuoio capelluto del soggetto per registrare l'attività elettrica dal nervo cocleovestibolare al tronco encefalico dopo uno stimolo acustico. La lettura produce un grafico a 7 onde (5 nei roditori), dove ogni onda rappresenta la funzione e la latenza di una diversa porzione del percorso uditivo. Ogni orecchio può essere testato indipendentemente. Nei roditori, la misurazione richiede l'anestesia, ma spesso non è necessaria nei test sull'uomo. Oltre ad aiutare a diagnosticare la perdita dell'udito, l'ABR è anche usata per rilevare schwannomi e lesioni del tronco encefalico.

### ***EP: potenziale endococleare***

Un potenziale endocleare di +80 mV nella scala media è essenziale per l'amplificazione della coclea. Questo fornisce parte della fonte di voltaggio necessario per guidare la corrente del trasduttore delle cellule ciliate esterne (OHC), che porta alla forza elettromeccanica delle OHC. La determinazione dell'EP è una procedura terminale invasiva nei roditori. L'intervento richiesto è difficile da stabilire in laboratorio, poiché richiede materiali specifici e una procedura molto delicata e precisa. Essa comporta l'attento posizionamento di elettrodi di lettura nella scala media dell'orecchio interno per registrare la tensione. Poiché l'elettrodo deve perforare la parete laterale della coclea, c'è un rischio di perdite di endolinfa che danno letture imprecise. Le misure di EP non sono una lettura dell'udito, ma piuttosto una lettura delle proprietà dell'endolinfa, che sono necessarie per il funzionamento delle cellule ciliate. Una EP ridotta o assente a causa di difetti nel trasporto del potassio o nella stria vascolare, può portare a gravi perdite dell'udito e/o a sordità congenita.

### ***DPOAE: emissione otoacustica dei prodotti di distorsione***

Questa misurazione si basa sul fatto che l'amplificatore cocleare (cellule ciliate esterne) risponde al suono creando una vibrazione lungo la membrana basilare. Per valutare la DPOAE, due toni puri di frequenze vicine ( $f_1$  e  $f_2$ ) sono generati simultaneamente. La stimolazione della coclea in due posizioni vicine l'un l'altra porta alla produzione di un terzo tono ad una frequenza nota inferiore ( $2f_1 - f_2$ ) che può essere registrato. Quando le DPOAE sono presenti e normali in ampiezza e configurazione, questo indica che l'amplificatore cocleare (cioè la motilità OHC) è normalmente funzionale. In assenza di disfunzioni neurologiche o di isolate cellule ciliate interne, questo risultato è coerente con un udito normale. Quando DPOAE sono assenti, questo indica che c'è qualche disfunzione nella coclea, anche se il livello di disfunzione e, quindi, il grado di perdita uditiva non è chiaro. La misurazione DPOAE fa ora parte dello screening standard della perdita uditiva nei neonati, e per i neonati e gli adulti non richiede sedazione. In laboratorio, la DPOAE viene misurata sui roditori sotto anestesia.

## **2.7. L'IMPIANTO COCLEARE E GLI SVILUPPI RECENTI NEI TRATTAMENTI DELLA PERDITA CONGENITA DELL'UDITO**

Attualmente, non ci sono cure per la perdita dell'udito, sia essa congenita o acquisita. Le opzioni disponibili per le persone che soffrono di ipoacusia consistono in apparecchi acustici per i casi lievi e in impianti cocleari per i casi più profondi o gravi, a condizione che il paziente sia un buon candidato a ricevere l'impianto. Sebbene questi approcci siano progrediti rapidamente nel recente passato, né l'amplificazione del suono da apparecchi acustici né la stimolazione del nervo uditivo da parte degli elettrodi dell'impianto cocleare possono essere paragonati all'udito naturale.

Gli impianti cocleari (IC) sono protesi che stimolano elettricamente il nervo cocleare per ripristinare non solo la percezione del suono, ma anche la comprensione del parlato nelle persone con profonda ipoacusia neurosensoriale. Gli IC utilizzano un elaboratore del suono alimentato a batteria, indossato a livello dell'orecchio, per trasmettere segnali elettrici con una serie di elettrodi impiantati chirurgicamente nell'orecchio interno. Aggirano quindi le cellule ciliate uditive difettose o assenti per stimolare elettronicamente un sottinsieme di neuroni del ganglio spirale o le fibre nervose dei neuroni uditivi. La prima generazione di impianti è stata approvata dalla FDA nel 1984. Questi dispositivi utilizzavano un singolo elettrodo che permetteva ai riceventi di percepire la presenza o l'assenza di suono, sebbene ripristinassero in modo variabile la comprensione del parlato. L'FDA ha approvato i primi impianti multicanale per adulti e bambini rispettivamente nel 1987 e nel 1990.

I pazienti che oggi si sottopongono all'impianto lo fanno in base a un numero crescente di indicazioni e utilizzano dispositivi con un campo tonotopico di ben 24 elettrodi. Questi moderni IC promuovono l'acquisizione del linguaggio, l'alfabetizzazione e le prestazioni scolastiche nei bambini sordi in età prelinguistica, e al tempo stesso di ripristinare il riconoscimento vocale e di migliorare la qualità della vita degli adulti che non sono in grado di utilizzare l'amplificazione tradizionale (Rauterkus *et al.*, 2022).

A tal proposito, è opportuno riportare le osservazioni di Guasti *et al.*, 2014:

l'applicazione precoce (prima dei 12 mesi) di impianti cocleari nei bambini, ha effetti benefici sul loro linguaggio espressivo e ricettivo;

la necessità di considerare l'area linguistica che viene ad essere indagata (lessico, fonologia, morfosintassi, semantica e grammatica);

la necessità di considerare le caratteristiche della lingua di arrivo al bambino. Infatti, è stata presa come esempio una differenza potenzialmente rilevante tra la fonologia italiana e inglese: l'inglese ha un elevato numero di tipi di sillabe diverse mentre l'italiano di meno (16 contro 8). Questa proprietà, combinata con altre proprietà fonologiche, come la riduzione delle vocali e dei gruppi consonantici, dà luogo a una struttura ritmica più irregolare delle parole in inglese che in italiano, e questo può essere più impegnativo per i bambini. Inoltre, nonostante i bambini con IC abbiano ottenuto punteggi inferiori rispetto ai loro coetanei normo-udenti, in un certo numero di aree il loro comportamento linguistico ha seguito la stessa tendenza dei bambini normo-udenti, suggerendo che l'impianto precoce è compatibile con un modello di sviluppo del linguaggio simile a quello dei bambini normo-udenti.

Riprendendo il tema dei possibili sviluppi nei trattamenti per l'ipoacusia, negli ultimi dieci anni il Next Generation Sequencing (NGS) ha permesso l'identificazione di più geni e percorsi legati alla sordità. Insieme agli strumenti di biologia molecolare sviluppati di recente, questo ha aperto il campo allo sviluppo di terapie per la perdita dell'udito che includono il delivery e l'editing dei geni, il trapianto di cellule staminali e sistemi di somministrazione mirata di farmaci. Questi strumenti e terapie sono riassunti nella Tabella 3.

**Tabella 3:** recenti sviluppi verso i trattamenti dell'ipoacusia

Intratympanic		Oishi et al. (2013)
Round window		Pietola et al. (2008)
Post semi-circular canal		Suzuki et al. (2017)
Cochleostomy		Akil et al. (2012); Chang et al. (2015); Wang, Kempton, & Brigande (2018); Wang et al. (2013)
Intra-amniotic		Depreux et al. (2016); Wang et al. (2020)
Gene therapy	Adeno-associated viruses	Al-Moyed et al. (2019); Askew et al. (2015); Chang et al. (2015); Gyorgy et al. (2019); Landegger et al. (2017); Nist-Lund et al. (2019); Tan et al. (2019)
	Lentivirus	Bedrosian et al. (2006)
Gene editing	Cas9-sgRNA	Gao et al. (2018)
	Antisense oligonucleotides	Depreux et al. (2016)
	Short interfering RNA	Oishi et al. (2013)
Drug treatments	BF844	Alagramam et al. (2016)
	Salicylate	Ishihara et al. (2010)
	Rapamycin	Fujioka et al. (2020)
	Cell therapy	Nabeyama et al. (2017)
Cell therapy	Human stem cell	M. Y. Lee et al. (2017); Chen et al. (2018)

Tabella di (Renauld and Basch, 2021)

### **2.7.1. Trattamenti farmacologici**

La combinazione dei progressi sui modelli murini e su quelli basati sulle cellule, lo screening ad alto rendimento, e l'identificazione dei geni legati alla sordità ha permesso lo sviluppo di nuovi e noti farmaci per trattare alcuni tipi di sordità congenita. Uno screening ad alto rendimento di oltre 50.000 molecole ha identificato diversi composti che erano in grado di stabilizzare e ripristinare la corretta localizzazione di una variante mutante del gene CLARIN nelle cellule HEK293. Questa mutazione è una delle cause della sindrome di Usher di tipo III nell'uomo. Le molecole candidate sono state analizzate in uno screening secondario per la tossicità e la farmacocinetica, e questo ha portato all'identificazione di un composto che è stato poi modificato chimicamente per migliorare la sua potenza e le proprietà fisico-chimiche. In ulteriori studi sulle cellule, questo composto, BF844, è risultato agire post-traduzionalmente insieme alle proteine chaperone per stabilizzare la proteina mutante e localizzarla correttamente alla membrana plasmatica. Quando è stato testato in un modello di topo della sindrome di Usher III, il farmaco BF844 è stato in grado di fermare la perdita progressiva dell'udito e abbassare le soglie dell'udito rispetto agli animali di controllo.

Un approccio simile è stato attuato per identificare le molecole che potrebbero correggere la localizzazione impropria di diverse forme mutanti di pendrina. La pendrina è il prodotto del gene SLC26A4, responsabile della sindrome di Pendred, la forma più comune di sordità sindromica. Nella linea cellulare HEK293 che esprime il mutante P123S della pendrina, i ricercatori hanno testato l'efficienza di 20 derivati del salicilato chimicamente modificati per dirigere la corretta localizzazione della proteina mutante. Essi avevano precedentemente dimostrato che il salicilato può agire come chaperone molecolare per ripristinare la pendrina da forme scorrette di folding. Questi esperimenti hanno portato all'identificazione di una piccola molecola a bassa citotossicità in grado di correggere il misfolding e la localizzazione della pendrina alla membrana plasmatica.

Un altro studio incentrato sulla sindrome di Pendred ha generato cellule epiteliali cocleari da cellule staminali pluripotenti indotte derivate da pazienti affetti da sindrome di Pendred. Questo approccio ha permesso lo studio di forme mutanti di SLC26A4 umano e ha aggirato il fatto che non ci sono



buoni modelli animali per la sindrome di Pendred. Gli autori hanno trovato aggregati della proteina mutante che non sono riusciti a localizzarsi nella membrana plasmatica e invece sono stati associati con il sistema dell'ubiquitina proteasoma nel citoplasma delle cellule. L'aggregazione intracellulare della proteina mutante ha portato alla morte cellulare, e questo potrebbe essere corretto dall'attivazione dell'autofagia. Il trattamento delle cellule con la rapamicina, un noto attivatore dell'autofagia, ha aumentato la sopravvivenza delle cellule e diminuito il numero di cellule positive alla caspasi 3 attivata. Poiché la rapamicina è un noto farmaco attualmente utilizzato in altre applicazioni terapeutiche, questo studio ha aperto la porta a una sperimentazione di fase I/II per il trattamento della sindrome di Pendred, che è attualmente in corso.

### **2.7.2.Terapia genica**

La terapia genica, o l'uso di materiale genetico per trattare le malattie, ha guadagnato molto spazio nella ricerca sulla perdita dell'udito a causa dei recenti successi nel recupero della sordità causata da diversi difetti genetici in modelli animali. I fattori chiave per il successo sono un delivery minimamente invasivo e relativamente specifico, e l'ottimizzazione di vettori che trasportano il materiale genetico.

Alcuni dei primi studi fatti in questo settore, hanno fornito o adenovirus associati (AAV) o lentivirus (LV) che trasportano GFP (proteina fluorescente verde) nell'otocisti di embrioni di topo in utero. Questi esperimenti hanno preso di mira le cellule ciliate e i progenitori delle cellule di sostegno nella regione prosensoriale dell'orecchio. Sebbene l'espressione di GFP da AAV fosse presente nelle cellule ciliate interne, nelle cellule ciliate esterne e nelle cellule di supporto l'espressione GFP era relativamente bassa. In confronto, la GFP dei lentivirus marcava un numero maggiore di cellule ciliate esterne, tuttavia gli animali hanno mostrato una significativa diminuzione della soglia uditiva, sollevando preoccupazioni sull'ototossicità. Da allora, l'ottimizzazione dei vettori AAV ha permesso una maggiore efficienza utilizzando questo metodo di delivery, sia nella coclea che nell'organo sensoriale vestibolare.

Un'altra opzione di delivery comunemente usata è l'iniezione attraverso la membrana della finestra rotonda dell'orecchio interno che si collega alla perilinfia nella rampa timpanica e in quella vestibolare. Anche se questo è probabilmente il meno invasivo dei modi di somministrazione, i primi studi sul delivery di GFP attraverso questo metodo, utilizzando LV o AAV, hanno portato principalmente all'espressione della stria vascolare nelle cellule marginali e nelle cellule che rivestono i dotti della perilinfia, ma non nell'organo del Corti o nel ganglio spirale. Vettori AAV recentemente sviluppati, con modifiche che permettono al virus di attraversare le membrane mesoteliali che separano la perilinfia dall'organo del Corti, hanno portato in un trasferimento genico più efficiente nelle cellule di sostegno, nelle cellule ciliate interne e nelle cellule ciliate esterne della coclea.

Un terzo metodo di delivery consiste in una cocleostomia, una piccola incisione nella parete laterale della coclea per iniettare il vettore virale direttamente nella scala media. Questo metodo è stato usato ampiamente con relativo successo, perché le particelle virali possono venire in diretto contatto con le cellule ciliate e le cellule di sostegno nella scala media. Tuttavia, la procedura è invasiva e l'intervento stesso può causare la perdita dell'udito se i tessuti sono danneggiati.

Il primo successo della terapia genica per ripristinare l'udito viene da uno studio che utilizzava un modello murino con sordità ereditaria. Il DFNA25 autosomico dominante è causato da una mutazione missenso nel gene che codifica VGLUT3, un trasportatore vescicolare di glutammato, che è espresso dalle cellule ciliate interne. VGLUT è un componente essenziale per la trasmissione sinaptica tra le cellule ciliate interne e la sinapsi del nervo afferente. I topi VGLUT3 KO sono sordi e mostrano una riduzione di circa il 20% dei neuroni del ganglio spirale. Iniettando un AAV1 che portava una copia funzionale del gene VGLUT, gli autori sono stati in grado di confermare l'espressione del gene nelle cellule ciliate interne, il quale ha ripristinato l'udito a livelli normali in questi topi entro 7-14 giorni dall'iniezione. Sia la cocleostomia che la membrana della finestra rotonda sono stati testati, con un trasferimento genico più efficiente ottenuto con quest'ultimo. Anche se le soglie dell'udito sono state ripristinate, come misurato dall'ABR, non vi è stato alcun aumento del numero di neuroni del ganglio spirale. Un approccio simile è stato adottato per curare i modelli

murini di DFNB7/11 e DFNA36, che hanno sordità autosomica recessiva e dominante, rispettivamente. Queste sordità congenite sono prodotte da mutazioni nelle proteine Tmc (canale transmembrana-simile) presenti nelle punte delle stereociglia e necessarie per la meccano-trasduzione sia delle cellule ciliate interne sia di quelle esterne. I topi privi di Tmc funzionale mancano di trasduzione sensoriale, sono sordi, e soffrono di disfunzioni dell'equilibrio anche se le loro cellule ciliate appaiono normali. Dopo l'iniezione di un costrutto AAV2/-Cba-Tmc, gli autori dello studio hanno riportato modesti guadagni nelle soglie dell'udito, ma il virus non è riuscito a trasfettare le cellule ciliate esterne. Qualche anno dopo, lo stesso gruppo ha sperimentato con un adenovirus sintetico modificato (sAAV-Tmc1) che non solo ha trasfettato le cellule ciliate interne ma anche quelle esterne. Oltre a ripristinare l'udito a livelli quasi normali nei topi Tmc-/-, l'iniezione del virus ha anche corretto le disfunzioni dell'equilibrio causate dalla mancanza di Tmc nelle cellule ciliate degli organi vestibolari.

Una delle principali sfide nell'uso di AAV per la terapia genica è la loro limitata capacità in termini di DNA che può essere introdotto nel virus, circa 5 KB di dimensione. Il gene dell'otoferlina, la cui mutazione è responsabile della sordità DFNB9, è di circa 6 KB, e quindi troppo grande per un adenovirus o per trasfettare in modo efficiente le cellule ciliate con lentivirus o tramite elettroporazione. Oltre un migliaio di mutazioni patogeniche sono state identificate all'interno di questo gene, che colpisce tra il 2% e il 10% dei pazienti affetti da ipoacusia ereditaria non sindromica. Il prodotto di questo gene, l'otoferlina, è espresso nelle cellule ciliate interne ed è richiesto postnatalmente per l'esocitosi, per la ricostituzione delle vescicole, per la riformazione delle vescicole e per l'endocitosi. Le cellule ciliate interne in topi Otof-/- hanno una riduzione del 40% del numero dei nastri sinaptici. Per aggirare la capacità limitata degli adenovirus, Al-Moyed et al. (2019) hanno progettato due serie di mezzi vettori di AAV duali contenenti ciascuno una metà della sequenza codificante l'otoferlina, e delle sequenze del sito donatore e di quello accettore dello splicing, rispettivamente. Quando co-iniettati attraverso la finestra rotonda, questi vettori sono stati in grado di trasfettare in modo efficiente le cellule ciliate interne e, in misura minore, quelle esterne. Le due metà della sequenza codificante hanno formato un trascritto completo che è stato rilevato con PCR. Nei topi Otof-/-, l'iniezione a P6, ha prodotto una normale proteina otoferlina, a circa il 30% del livello

dei topi wild-type. Questo era sufficiente per recuperare parzialmente l'udito, con le soglie ABR tra 40 e 60 dB (le soglie normali wild-type sono  $30\pm 5$ , e la sordità completa è  $>80$  dB). Le iniezioni, tuttavia, non hanno ripristinato il numero dei nastri sinaptici.

Tre studi separati hanno recentemente riportato il recupero dell'udito utilizzando la terapia genica in modelli murini della sindrome di Usher. Il primo studio ha utilizzato un modello murino della sindrome di Usher di tipo 1, in cui una mutazione puntiforme del gene armonina (USH1c) ricapitola la sindrome umana che causa una progressiva perdita dell'udito e sordità. Iniettando un adenovirus sintetico contenente una copia funzionale di armonina attraverso la finestra rotonda, gli autori sono stati in grado di trasfettare in modo efficiente sia le cellule ciliate interne sia le cellule ciliate esterne. Questo ha portato ad un recupero funzionale della trasduzione sensoriale e al ripristino della perdita uditiva misurata da ABR. Nel secondo studio, gli autori hanno generato un modello murino con sindrome di Usher di tipo III che ricapitola la perdita progressiva dell'udito vista in questa sindrome, dove l'espressione del gene clarina-1 è drammaticamente down-regolata nel periodo postnatale, provocando sordità profonda da P21-P25 nei topi. Iniettando AAV2 o AAV contenente una copia completa del gene clarina-1, attraverso la finestra rotonda, gli autori sono stati in grado di preservare l'udito in questi topi fino all'età adulta, in contrasto con i topi di controllo in cui la perdita dell'udito progrediva dopo P2.

Il terzo studio ha utilizzato un modello di topo *Clnr1*<sup>-/-</sup>, che non ricapitola la perdita progressiva dell'udito osservata nei pazienti con sindrome di Usher di tipo III, ma piuttosto presenta difetti delle cellule ciliate e sordità dalla nascita. In questo caso, il recupero dell'udito è stato ottenuto con l'iniezione a P1 di un AAV9 contenente una copia funzionale del gene clarina-1. Questo vettore ha l'ulteriore vantaggio di trasfettare le cellule ciliate interne ed esterne non solo nei topi, ma anche nei primati non umani, il che lo rende un vettore promettente per la traslazione in studi clinici.

Oltre agli esempi di cui sopra in cui la terapia genica è stata utilizzata con successo per recuperare i difetti dell'udito causati da mutazioni nelle cellule ciliate sensoriali, c'è stato qualche successo nel trattamento di altri tipi di sordità sindromica associati a tipi di cellule non sensoriali nella coclea.

Mutazioni nella subunità del canale del potassio KCNQ1 nell'uomo, causano la sindrome di Jervell e di Lange-Nielsen, che è caratterizzata da una grave sordità congenita. Questo canale è espresso nelle cellule marginali della stria vascolare, ed è necessario per la generazione dell'endolinfa e del potenziale endococleare. In sua assenza, la scala media collassa, con conseguente morte delle cellule dell'organo uditivo del Corti. L'iniezione di un AAV modificato contenente una copia funzionale del gene *Kcqn1* direttamente nella scala media di topi *Kcqn1*<sup>-/-</sup> ha portato ad un'efficiente trasfezione delle cellule marginali e ad un completo recupero delle soglie uditive. Anche se l'iniezione ha portato anche all'espressione ectopica della proteina in altri tipi di cellule nella coclea, questo non ha avuto un effetto dannoso sul recupero dell'udito.

### **2.7.3. Editing genomico**

Una mutazione dominante negativa missenso nel canale TMC1 nelle cellule ciliate causa la perdita progressiva dell'udito neurosensoriale nell'uomo. La mutazione Beethoven nel topo *Tmc1* (*Tmc1*<sup>Bth/+</sup>) causa un fenotipo simile, con soglie uditive elevate e una perdita di cellule ciliate interne seguita dalla morte delle cellule ciliate esterne a partire dal primo mese di età. Gao et al. (2018) hanno progettato piccoli RNA guida (sgRNA) il cui bersaglio è la mutazione missenso nell'allele *Bth* del gene *Tmc*. Hanno prima testato l'efficienza dei diversi sgRNA trasfettando fibroblasti derivati da topi *Tmc1*<sup>Bth/Bth</sup> *ex-vivo* usando lipidi cationici per il rilascio del complesso Cas9-sgRNA nelle cellule. Hanno identificato un complesso, Cas9-*Tmc1*-mut3, che ha dato i migliori risultati. Hanno poi iniettato il complesso lipidico contenente Cas9-*Tmc1*-mut3 direttamente nella scala media dei topi *Tmc1*<sup>Bth/+</sup> a P1. L'iniezione ha portato a una maggiore sopravvivenza delle cellule ciliate interne ed esterne rispetto alle orecchie non iniettate. Quattro settimane dopo l'iniezione, gli animali trattati hanno mostrato una soglia ABR significativamente più bassa rispetto ai controlli, suggerendo che i complessi Cas9-*Tmc1*-mut3-lipid fossero efficaci nel ridurre la perdita progressiva dell'udito. Questo è il primo esempio di editing genomico *in vivo* per correggere una mutazione missenso nell'orecchio interno.

Gli **oligonucleotidi antisenso (ASO)** sono brevi acidi nucleici modificati che possono legarsi a specifiche sequenze di RNA. A causa della loro farmacocinetica e delle proprietà tossicologiche favorevoli, sono candidati ideali dell'editing genomico per la terapia farmacologica. L'iniezione intraamniotica di un ASO che era stato destinato per colpire altri organi ha portato ad una significativa down-regulation del gene bersaglio nell'orecchio interno (Depreux *et al.*, 2016). Questo risultato ha motivato i ricercatori a utilizzare questo metodo per consegnare un ASO specifico che aveva dimostrato nei topi neonati di correggere una mutazione missenso, che produce un sito di splicing ectopico nel gene armonina in un modello murino di Usher. L'iniezione intra-amniotica dell'embrione ha portato ad un recupero più efficiente del fenotipo delle cellule ciliate rispetto a quanto osservato nelle iniezioni intraperitoneali neonatali di ASO; tuttavia, l'udito e il miglioramento dell'equilibrio non sono stati significativi. Lo stesso gruppo ha poi modificato l'iniezione, e invece di fornire ASO per via sistemica attraverso la cavità amniotica, ha preso di mira l'orecchio interno iniettando ASO direttamente nella cavità dell'orecchio interno di embrioni di topo E12.5. La somministrazione di ASO nell'orecchio interno ha migliorato l'efficienza dell'editing del gene mutante nelle cellule ciliate così come la morfologia delle cellule ciliate sia nella coclea che negli organi vestibolari, e ha ripristinato l'udito e l'equilibrio in età adulta (Wang *et al.*, 2020).

## 3. CAPITOLO 3

(Le informazioni di seguito riportate sono state estratte dalla review (Dhuri *et al.*, 2020)

### 3.1. GLI OLIGONUCLEOTIDI ANTISENSO

La produzione o il metabolismo aberranti delle proteine sono associati a numerose malattie e disturbi. Poiché le proteine sono prodotte decodificando le informazioni memorizzate nell'RNA messaggero (mRNA), la produzione aberrante di proteine può essere regolata dal targeting dell'mRNA. Inoltre, una maggiore comprensione dell'RNA ha svelato i suoi molteplici ruoli. Fino all'avvento degli RNA non codificanti (ncRNA), l'mRNA era considerato solo come il mediatore tra il DNA e il ribosoma per la sintesi proteica. Tra gli ncRNA, i microRNA (miRNA), i piccoli RNA derivati dal RNA transfer, gli pseudogeni, i PIWI-interacting RNA, gli ncRNA lunghi (lncRNA) e gli RNA circolari sono stati identificati come regolatori critici delle funzioni biologiche attraverso la modulazione dell'espressione genica. Quindi, la strategia antisense che prevede il targeting di pre-mRNA, mRNA o ncRNA può alterare la produzione di proteine che causano la malattia per interventi terapeutici. A differenza del targeting delle proteine basato su piccole molecole, i farmaci antisense esercitano il loro effetto attraverso le regole di Watson-Crick di accoppiamento delle basi con la sequenza di RNA bersaglio. Questo principio di riconoscimento molecolare fornisce al campo antisense una maggiore flessibilità nella progettazione di farmaci a base di RNA e accelera il suo sviluppo, che è fondamentale per il targeting di una miriade di malattie rare e genetiche. La fusione di modifiche della struttura chimica degli oligonucleotidi e le diverse opzioni di delivery forniscono un'ulteriore spinta al campo dell'antisense. La recente approvazione da parte della Food and Drug Administration (FDA) statunitense di diversi farmaci a base di acidi nucleici ha ulteriormente stimolato l'interesse nella ricerca antisense. Attualmente, numerosi farmaci antisense si candidano in studi clinici per trattare malattie cardiovascolari, metaboliche, endocrine, neurologiche, neuromuscolari, infiammatorie e le malattie infettive. Questa rassegna fornisce una breve panoramica delle modifiche strutturali degli oligonucleotidi antisense (ASO) di nuova generazione, i loro meccanismi

d'azione, le strategie di delivery e le informazioni complete sulle terapie antisenso approvate dalla FDA e sugli attuali tipi di farmaci basati sull'antisenso che si candidano negli studi clinici.

### **3.1.1. Modificazioni oligonucleotidiche**

In studi precedenti, gli ASO basati su una struttura fosfodiesterica (noti anche come ASO non modificati) sono stati utilizzati per colpire l'RNA con un successo moderato. Tuttavia, a causa della presenza di un legame fosfodiesterico, gli ASO non modificati sono suscettibili alla degradazione delle nucleasi. Inoltre, le grandi dimensioni e la carica degli ASO non modificati limitano la loro diffusione passiva nella cellula. Pertanto, una più recente generazione di ASO chimicamente modificati è stata studiata per aumentare l'efficacia, la stabilità enzimatica, e diminuire la risposta immunitaria e la tossicità off-target (tabella 4).



**Tabella 4: modificazioni chimiche degli oligonucleotidi antisense.**

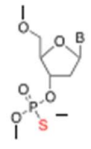
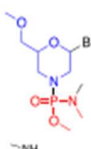

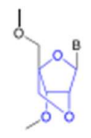
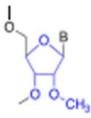
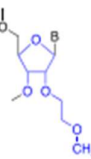
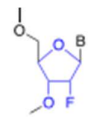

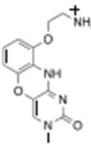
Name	Structure	Mechanism	Properties
<b>Phosphate modification</b>			
Phosphorothioate (PS)		RNase H1 cleavage	Enzymatic stability
<b>Sugar phosphatemoification</b>			
Phosphorodiamidate morpholino (PMO)		Steric hindrance/splice modulation	Improved aqueous solubility, higher binding affinity
Peptide nucleic acid (PNA)		Steric hindrance/splice modulation	Enzymatic stability, higher binding affinity, no immune activation
<b>Sugar modification</b>			
Locked nucleic acid (LNA)		Steric hindrance/RNase H1 cleavage	Higher binding affinity, enzymatic stability
2'-O-methyl (2'-O-Me)		Steric hindrance/splice modulation	Higher binding affinity, enzymatic stability, reduced immune stimulation
2'-O-methoxyethyl (2'-O-MOE)		Steric hindrance/splice modulation	Higher binding affinity, enzymatic stability, reduced immune stimulation
2' fluoro (2' F)		Steric hindrance/splice modulation	Higher binding affinity
<b>NucleoBase modification</b>			
5'methylcytosine		RNase H1 cleavage	Higher binding affinity, no immune stimulation
G-clamp		Steric hindrance	Higher binding affinity

Tabella di (Dhuri *et al.*, 2020)

### *1. Fosforotioato (PS)*

Il Fosforotioato appartiene alla prima generazione di ASO che lavorano con un meccanismo basato sulla scissione dell'mRNA. Negli ASO fosforotioati (PS), l'ossigeno non legante del gruppo fosfato è sostituito da un gruppo di zolfo, con conseguente formazione di un legame PS, che è resistente alla degradazione da parte delle nucleasi rispetto agli ASO non modificati. I PS-ASO si legano fortemente alle proteine del siero come l'albumina, fatto che riduce ulteriormente la loro clearance renale e facilita più a lungo la circolazione in vivo. Uno studio farmacocinetico nei topi dopo la somministrazione endovenosa (IV) di 30 mg kg<sup>-1</sup> di PS-ASOs ha rivelato il 40% di escrezione nelle urine in 48 ore. Rispetto agli ASO non modificati, i PS-ASO mostrano una distribuzione predominante nel fegato, rene e milza quando somministrati sistemicamente e dimostrano un buon assorbimento cellulare. Dopo la somministrazione sistemica nelle scimmie, i PS-ASO dimostrano un'eliminazione bifasica del plasma con un'emivita iniziale di 30-48 min, seguita da una seconda emivita lunga di 35-50 h. Tuttavia, la somministrazione ripetuta IV o intradermica di PS-ASO nei roditori suscita una reazione immunitaria, evidenziando la tossicità associata ad essi.

### *2. Oligomero morfolino fosforodiamidato (PMO)*

Negli oligomeri morfolino fosforodiamidati, la frazione di zucchero a cinque atomi è sostituita con una subunità di morfolina a sei atomi, e ogni anello di morfolina è interconnesso con il legame fosforodiamidato. I PMO sono neutri di carica ed esercitano il loro effetto antisense tramite ingombro sterico o modulazione dello splice. L'assenza del gruppo carbonile nella struttura del PMO fornisce resistenza contro le proteasi e le esterasi. L'anello di morfolina aumenta anche la solubilità in acqua. Le morfoline sono state ampiamente utilizzate in biologia dello sviluppo per numerose applicazioni basate sull'antisense.

### 3. *Acidi nucleici peptidici (PNA)*

Gli acidi nucleici peptidici sono analoghi sintetici dell'acido nucleico che contengono unità neutre di N-2-amminoetil glicina neutra, con basi azotate collegate da un linker metil carbonilico flessibile. A causa della loro struttura neutra e artificiale, i PNA sono resistenti alla degradazione enzimatica e possiedono una forte affinità di legame con le sequenze di RNA rispetto agli ASO non modificati. Problematiche significative sono associate con i PNA a causa della loro bassa solubilità in acqua e basso assorbimento cellulare. Quindi, sono stati sviluppati vari PNA modificati chimicamente, quali i PNA cationici, i PNA alfa e gamma guanidinici e i PNA lisinici, per risolvere questi problemi.

### 4. *Acidi nucleici bloccati (LNA)*

Gli acidi nucleici bloccati contengono un ponte metilenico vincolato tra il 2' dell'ossigeno e il 4' del carbonio del ribosio e mostrano una forte affinità di legame con le sequenze di DNA o RNA bersaglio grazie alla loro struttura preorganizzata. Ciascuna modifica dell'acido nucleico bloccato (LNA) aumenta la temperatura di fusione del duplex di 2-8°C. Gli LNA esprimono la loro capacità antisense attraverso un meccanismo di ingombro sterico. Diversi design di LNA, gapmer, mixmer e altre modifiche sono stati valutati per la loro attività antisense e confrontati con gli ASO non modificati.

I gapmer sono LNA-DNA-LNA che contengono nucleotidi di DNA continui intercalati tra due nucleotidi di LNA nelle regioni terminali (Figura 3). È stato dimostrato che i gapmer stimolano il meccanismo di scissione basato sulla RNasi H1.

I mixmer contengono nucleotidi di DNA intervallati tra i nucleotidi di LNA lungo tutta la sequenza e non inducono la scissione con RNasi H1, ma modulano l'espressione dell'mRNA attraverso un meccanismo di ingombro sterico. È stato osservato che un tratto minimo di quattro nucleotidi LNA a ciascun terminale della sequenza è sufficiente a fornire un'emivita di 15 ore agli LNA, che è ~10 volte superiore a quella degli ASO non modificati.



**Figura 3: Progettazione di oligonucleotidi antisenso (ASO).** Gli ASO modificati chimicamente forniscono una resistenza alle nucleasi e una migliore affinità di legame con il loro bersaglio. Il design modificato su tutta la lunghezza rappresenta modifiche chimiche in tutta la sequenza. Il design Gapmer comprende una regione centrale composta da nucleotidi di DNA e un tratto di LNA o modifiche al 2' o nucleotidi PS che fiancheggiano entrambi i terminali della sequenza. Il design Mixmer contiene LNA (o modifiche al 2') e nucleotidi di DNA presenti in sequenza.

Immagine di (Dhuri *et al.*, 2020)

## 5. Modifiche del ribosio

La modifica chimica in posizione 2' del ribosio migliora l'affinità di legame e la resistenza alla degradazione enzimatica. La modifica del ribosio a 2' porta ad ASO 2' fluoro (2' F), 2'-O-metil (2'-O-Me) e 2'-O-metossietil (2'-O-MOE). Ogni modifica al 2' aumenta la temperatura di fusione del duplex di 2°C. La modifica 2'-O-Me diminuisce anche il legame non specifico con le proteine durante la somministrazione in vivo. Come spiegato in precedenza, anche i gapmer sono compresi nella classe degli ASO modificati in posizione 2' del ribosio. In questo caso, in un design gapmer, una regione centrale di nucleotidi antisenso non modificati è affiancata da nucleotidi modificati al 2' alle due estremità. I nucleotidi non modificati inducono la scissione dell'RNA bersaglio da parte dell'RNasi H1, mentre i nucleotidi modificati al 2' migliorano l'affinità di legame dell'ASO alla regione di interesse e proteggono dalle endonucleasi. In uno studio di Shen *et al.* nei topi, gli ASO modificati con F in posizione 2' mostrano una maggiore affinità di legame con le proteine intracellulari come le proteine di splicing di drosophila (DBHS), riducendo le proteine DHBS e provocando epatotossicità. Pertanto, è necessario prestare attenzione durante gli studi in vivo, poiché le modifiche 2' F possono portare a tossicità.

## *6. Modifica delle basi azotate*

Le modifiche delle basi azotate sono state introdotte per migliorare le proprietà degli ASO. Tra le modifiche della base azotata, gli analoghi della citosina sono stati ampiamente utilizzati. È stato notato che i PS-ASO che contengono tratti di dinucleotide CpG (-Citosina-fosfato-Guanina-) attivano il recettore toll-like e provocano una stimolazione immunitaria. Pertanto, gli analoghi basati sulla 5-metilcitosina sono stati utilizzati con la chimica a base di PS per ridurre al minimo la stimolazione immunitaria. Similmente, un altro analogo della citosina, G-clamp, è stato utilizzato per aumentare l'efficacia degli ASO. Le modifiche di G-clamp contengono residui di fenossazina che formano un totale di cinque legami idrogeno con la guanina complementare nella sequenza bersaglio mediante accoppiamento di Watson-Crick e appaiamento di basi di Hoogsteen. È stato dimostrato che singole sostituzioni di G-clamp possono aumentare l'affinità di legame di 23°C.

### 3.1.2. Meccanismo d'azione degli antisenso

Circa quattro decenni fa, Zamecnik e Stephenson riportarono per la prima volta che gli ASO sintetici a 13-residui a singolo filamento fossero in grado di provocare un arresto nella traduzione, agendo sull'mRNA del virus del sarcoma di Rous. Dopo diversi studi, è stato stabilito che gli ASO attivi hanno generalmente una lunghezza di 15-20 nucleotidi e possono colpire l'RNA complementare mediante appaiamento di basi secondo Watson-Crick senza causare alcuna significativa tossicità fuori bersaglio. Inoltre, studi approfonditi hanno stabilito che il meccanismo degli ASO sintetici può essere di due tipi: (1) scissione dell'RNA e (2) blocco dell'RNA (Figura 4).

#### 1. Degradazione mediata dalla RNasi H1

Gli ASO hanno come bersaglio l'RNA, formando eteroduplex ASO-RNA, che agiscono come substrati per gli enzimi RNasi presenti nel citoplasma (Figura 4). Le RNasi degradano l'RNA nell'eteroduplex. Il design Gapmer contiene una regione centrale di nucleotidi non modificati che favoriscono l'attività dell'RNasi H1 e i nucleotidi modificati che la affiancano aumentano la sua affinità di legame e le proprietà di resistenza enzimatica. La maggior parte dei farmaci approvati dalla FDA esercitano il loro effetto antisenso attraverso le RNasi.

#### 2. Interferenza a RNA (RNAi)

I piccoli RNA interferenti esogeni (siRNA) sono sequenze di RNA a doppio filamento di 22 nucleotidi con 2 nucleotidi che sporgono all'estremità 3' di uno dei due filamenti. Questa sequenza si associa con l'enzima Argonata 2 (Ago 2) per formare il complesso di silenziamento indotto dall'RNA (RISC), dove il filamento passeggero viene degradato. Il filamento guida rimanente dirige il RISC verso la regione complementare dell'mRNA dove l'enzima Ago 2 taglia l'mRNA ed esercita il suo effetto di silenziamento genico (Figura 4). L'RNAi funziona con un meccanismo simile a quello RNasi H-dipendente. La differenza significativa rispetto alla degradazione basata

sulle RNasi è che il siRNA è associato alla proteina di clivaggio prima di interagire con il sito bersaglio.

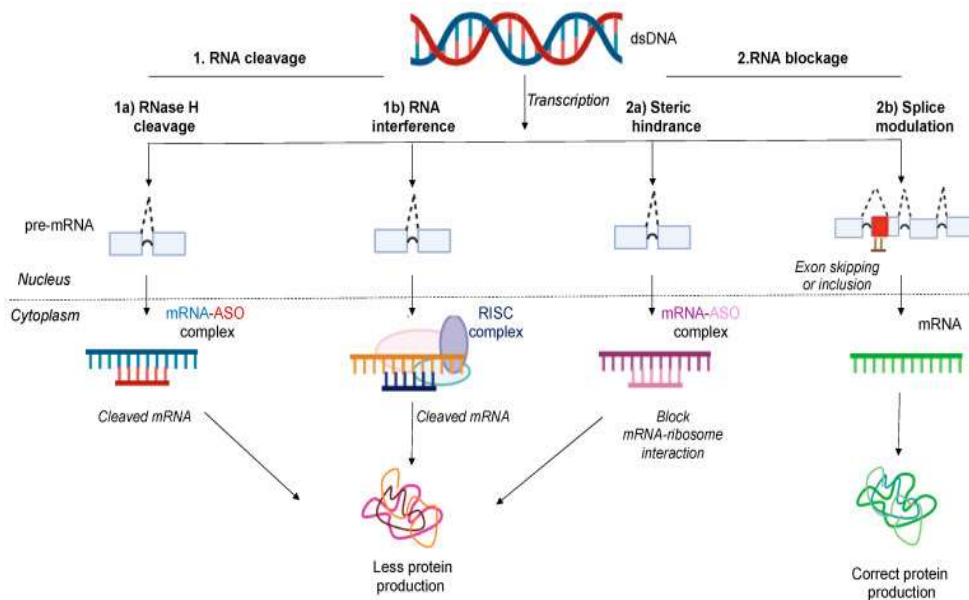
### 3. *Blocco sterico*

#### 3 (a). Arresto della traduzione dovuto a un ingombro sterico

Queste classi di ASO si legano alla sequenza di RNA bersaglio e provocano un arresto della traduzione inibendo l'interazione con la subunità ribosomiale 40S o 60S (Figura 4). Gli ASO basati sull'ingombro sterico non attivano la scissione mediata dalla RNasi H1; pertanto, la struttura del pre-mRNA viene mantenuta. L'ingombro sterico è direttamente correlato all'affinità di legame degli ASO. Un aumento dell'affinità di legame determina un'ibridazione superiore con l'RNA bersaglio, con conseguente arresto traslazionale. Inoltre, oligonucleotidi sintetici a singolo filamento di 20-25 nucleotidi sono progettati per legare i miRNA e impedirne l'interazione con l'mRNA con un meccanismo basato sull'ingombro sterico, controllando ulteriormente l'espressione genica. Alcuni studi hanno anche riportato che gli ASO possono legarsi ai pre-miRNA nel nucleo ed esercitare un ingombro sterico.

#### 3 (b). Meccanismo basato sulla modulazione splice o sullo splice switching

Gli ASO possono esercitare i loro effetti anche attraverso lo splicing alternativo. La modulazione dello splicing può essere di due tipi: (1) eliminazione di esoni e (2) inclusioni di esoni. Le mutazioni frameshift alterano i profili di splicing del pre-mRNA che portano a una produzione anomala di proteine o a un arresto della traduzione delle proteine funzionali a lunghezza piena. Eliminando gli esoni, gli ASO si legano ai trascritti del pre-mRNA, correggono la sequenza di lettura dannosa e producono una proteina corta ma funzionale. Mentre includendo gli esoni, gli ASO si legano al sito del pre-mRNA e impediscono allo spliceosoma e ai fattori di splicing di accedere ai siti di trascrizione (Figura 4). Nel 1993, per la prima volta, è stato dimostrato che il 2'-O-Me ha eseguito con precisione lo splicing del pre-mRNA mutato della beta-globina in vitro, per produrre una variante mRNA di splice che ripristinava la produzione di emoglobina.



**Figura 4: Meccanismo d'azione degli oligonucleotidi antisense (ASO):** Gli ASO agiscono provocando (1) la scissione dell' RNA o (2) il blocco dell'RNA. (1a) Scissione mediata dalla RNasi H1, (1b) Interferenza dell'RNA (RNAi), (2a) Ingombro sterico e (2b) Modulazione dello splicing. (1a) L'eteroduplex ASO-mRNA recluta l'enzima RNasi H1 e questo enzima taglia l'mRNA bersaglio. (1b) La degradazione dell'mRNA da parte del siRNA associato con il complesso di silenziamento che induce l'RNA (RISC). (2a) Il complesso ASO-mRNA blocca stericamente e impedisce l'interazione dell'mRNA con i ribosomi per la traduzione delle proteine. (2b) Un esempio di oligonucleotidi splice switching (SSO). I rettangoli raffigurano le regioni degli esoni codificanti separate da una curva che rappresenta la regione intronica non codificante del pre-mRNA. Il quadrato rosso rappresenta la regione mutata dell'esone. La linea tratteggiata rappresenta il modello di splicing del pre-mRNA. La scissione mediata da RNasi H1, l'interferenza dell'RNA e i meccanismi di ingombro sterico producono una minore quantità di proteina, mentre la modulazione dello splicing produce la forma corretta di proteina. La modificazione della base fosforotioata (PS) e della 5'metilcitosina inducono la scissione dell'mRNA. Gli acidi nucleici peptidici (PNA), le modifiche 2'-O-metile (2'-O-Me) e 2'-Ometossietil (2'-O-MOE), le morfoline fosforodiamidate (PMO), gli acidi nucleici bloccati (LNA) agiscono sull'mRNA per bloccarne stericamente la traduzione oppure questi ASO possono agire come SSO per modulare il comportamento di splicing.

Immagine di (Dhuri et al., 2020)



### **3.1.3. Delivery degli ASO**

Sebbene la somministrazione degli ASO abbia sempre rappresentato un ostacolo significativo per le loro ampie applicazioni cliniche, sono state impiegate diverse strategie per la loro somministrazione.

#### *1. Delivery basato sulla chimica a stabilizzazione potenziata*

Alnylam ha utilizzato ampiamente la chimica di stabilizzazione potenziata (ESC) per veicolare il siRNA. Nell'ESC, i siRNA sono coniugati alla N-acetil galattosamina (GalNAc). Il GalNAc ha come bersaglio selettivo il recettore dell'asialoglicoproteina (ASGPR), altamente espresso negli epatociti. Il galNAc inoltre stabilizza i coniugati di siRNA negli epatociti, nel plasma e nel sistema linfatico e riduce la stimolazione immunitaria.

#### *2. Delivery basato su nanoformulazione*

Numerosi sistemi di rilascio basati su nanoparticelle polimeriche come PLGA, PBAE e PEI sono stati utilizzati per veicolare gli ASO. Il PBAE e il PEI esercitano un effetto a "spugna protonica" che riduce l'intrappolamento endosomiale degli ASO e ne aumenta il rilascio. Tuttavia, il progresso di questi sistemi di rilascio è stato limitato nella clinica a causa della tossicità causata dall'eccessiva carica cationica e dalle molteplici interazioni non specifiche con le proteine del siero e dei tessuti. Al contrario, il PLGA, essendo biocompatibile e un polimero approvato dalla FDA, è stato ampiamente utilizzato per formulare nanoparticelle e veicolare gli ASO.

#### *3. Sistemi di delivery a base lipidica*

Diversi sistemi di rilascio a base lipidica, lipoplex, liposomi e nanoparticelle lipidiche (LNP) sono stati ampiamente utilizzati per veicolare gli ASO e i siRNA. Le LNP sono tipicamente rivestite di polietilenglicole (PEG), che aumenta il tempo di circolazione del sangue. Le LNPs mostrano anche un

accumulo nel microambiente tumorale grazie all'effetto di maggiore permeabilità e ritenzione (EPR). Il Patisiran contiene una formulazione di siRNA a base di LNP.

### **3.2. IL PATISIRAN (ONPATTRO ®)**

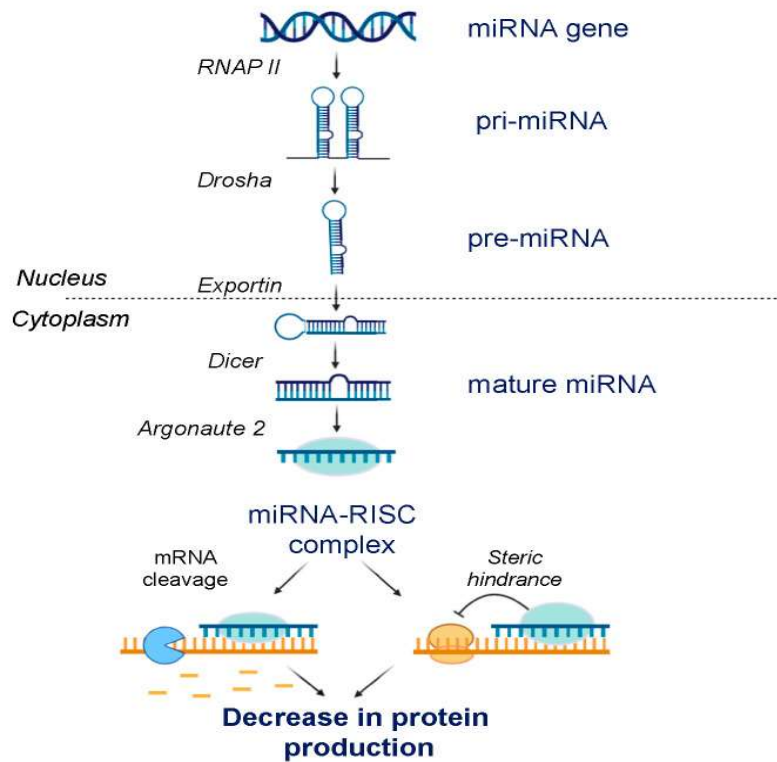
La transtiretina (TTR) è una proteina tetramericata coinvolta nel trasporto della tiroxina e del complesso tra vitamina A e proteina legante il retinolo. Negli individui sani, la proteina TTR è presente nel liquido cerebrospinale e nel siero. Tuttavia, le mutazioni puntiformi nel gene TTR producono proteine TTR aberranti che sono più suscettibili al misfolding e si depositano come fibrille amiloidi TTR negli spazi extracellulari del fegato, del cuore, dei nervi e del tratto gastrointestinale, portando infine a disfunzioni d'organo. La condizione patologica di cui sopra è nota come amiloidosi ereditaria mediata da transtiretina (hATTR) e si presenta con gravi sintomi di nausea, dolore e debolezza. Si stima che la hATTR colpisca circa 50.000 pazienti in tutto il mondo. Il Patisiran è il primo farmaco a base di siRNA sviluppato da Alnylam per l'hATTR. Il Patisiran è una formulazione a base di LNP che viene iniettata per via endovenosa a una concentrazione di 2 mg/mL. In particolare, il D-Lin-MC3-DMA è un veicolo lipidico cationico ionizzabile utilizzato per incapsulare il siRNA. Il D-Lin-MC3-DMA ha una costante di dissociazione acida (pKa) di 6,4, necessaria per mantenere una bassa carica superficiale per impedire la rimozione precoce del siRNA dal corpo. Con una pKa di 6,4, il gruppo lipidico ionizzabile è carico positivamente, il che favorisce la fuga dall'endosoma dopo l'endocitosi. Successivamente, il siRNA viene rilasciato nel citoplasma cellulare dove interagisce con l'mRNA della TTR, riducendo la traduzione della proteina TTR e inibendo così la formazione e la deposizione delle placche amiloidi. In uno studio di fase III randomizzato, in doppio cieco e controllato con placebo, i pazienti trattati con Patisiran hanno mostrato una riduzione dell'80% dei livelli sierici di TTR a dosi comprese tra 0,15-0,5 mg kg<sup>-1</sup>. Sono in corso altri tre studi clinici post-approvazione. Il primo studio sta studiando la sicurezza e l'efficacia del Patisiran in pazienti con hATTR dopo un trapianto di fegato. Il secondo studio valuterà la sicurezza a lungo termine del trattamento con Patisiran e

il terzo studio mira a valutare e confrontare l'efficacia del Vutrisiran con il Patisiran per il trattamento dell'hATTR.

### **3.3. GLI ASO CHE HANNO COME BERSAGLIO I microRNA**

I miRNA sono ncRNA lunghi 20-25 nucleotidi che svolgono ruoli critici nello sviluppo e nella definizione dell'identità cellulare e una espressione atipica di miRNA porta a vari disturbi maligni e non maligni. Il Miravirsen è stato sviluppato da Roche per colpire il miR-122 per l'infezione da virus dell'epatite C (HCV). Il Miravirsen contiene LNA e chimica a base di PS. I gravi effetti collaterali, tuttavia, hanno interrotto gli studi clinici del Miravirsen. Similmente, il Regulus Therapeutics ha sviluppato un antimir-21 (RG-012) per la sindrome di Alport, per ridurre il tasso di progressione della fibrosi renale. L'RG-012 ha ottenuto lo status di farmaco orfano negli Stati Uniti e in Europa. I microRNA che promuovono la carcinogenesi e la metastasi sono stati presi di mira dagli ASO. Un esempio importante è rappresentato dal miR-155, che è stato dimostrato essere up-regolato in molti sottotipi di linfoma, compreso il linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL). Il Cobomarsen (MRG-106) è un inibitore del miR-155 a base di LNA sviluppato da miRagen Therapeutics e attualmente in fase II di sperimentazione per il trattamento del linfoma cutaneo a cellule T, del linfoma a cellule T dell'adulto e della leucemia. La biogenesi e il meccanismo di azione dei miRNA sono illustrati di seguito (Figura 5).

## miRNA biogenesis



**Figura 5: Biogenesi dei miRNA e meccanismo d'azione.** Il miRNA è trascritto dalla RNA polimerasi II (RNAP II) per formare una struttura a doppio filamento ad anello chiamata pri-miRNA, che viene scissa dalla nucleasi Drosha per formare il pre-miRNA. L'esportina trasporta il pre-miRNA nel citoplasma dove viene ulteriormente elaborato da Dicer per formare un miRNA maturo a singolo filamento. Il miRNA maturo viene caricato nel complesso di silenziamento indotto dall'RNA (RISC) dove si associa con la proteina Argonate 2. Questo complesso miRNA-RISC interagisce con una sequenza di 6-8 nucleotidi dell'mRNA e regola la traduzione dell'mRNA attraverso la scissione dell'mRNA o l'ingombro sterico.

Immagine di (Dhuri *et al.*, 2020)

## 4. CAPITOLO 4

(le informazioni di seguito riportate sono state estratte dall' articolo di  
(Hastings and Jones, 2019)

### 4.1. OLIGONUCLEOTIDI ANTISENSEN PER IL TRATTAMENTO DELLA DISFUNZIONE DELL'ORECCHIO INTERNO

Gli oligonucleotidi antisenso (ASO) hanno mostrato un potenziale come molecole terapeutiche per il trattamento delle disfunzioni dell'orecchio interno. Gli organi sensoriali periferici responsabili dell'udito e dell'equilibrio sono alloggiati nell'orecchio interno. La perdita dell'udito e i problemi di equilibrio vestibolare colpiscono una vasta porzione della popolazione ed esistono opzioni di trattamento limitate. Il targeting ASO per l'orecchio interno come strategia terapeutica ha opportunità e sfide uniche di farmacocinetica e di delivery del farmaco. Di seguito vengono esaminati la tecnologia ASO, il delivery, i target della malattia e altre considerazioni chiave per lo sviluppo di questo approccio terapeutico.

#### 4.1.1. Trattamento della disfunzione dell'orecchio interno

Al fine di sviluppare farmaci efficaci per trattare la perdita dell'udito, deve essere preso in attenta considerazione il tipo specifico di perdita dell'udito e la causa del deficit. Le stime indicano che il 50% delle perdite uditive congenite, quelle che sono presenti alla nascita o subito dopo, hanno un'eziologia genetica, fatto che implica l'opportunità di correzione con approcci di terapia genica. Tuttavia, la perdita d'udito alla nascita indica probabilmente un problema nello sviluppo dell'apparato uditivo che dovrebbe richiedere negli esseri umani un intervento nelle fasi iniziali dello sviluppo fetale, dove la differenziazione delle cellule ciliate inizia durante il terzo mese di gravidanza (10-12 settimane dopo il concepimento). A

differenza degli esseri umani, in mammiferi come il topo, che è il più comune modello animale per la perdita genetica dell'udito, la coclea non è completamente sviluppata o funzionale alla nascita, consentendo interventi efficaci precoci tramite trattamento poco dopo la nascita. Così, effettuando una traslazione dei risultati da modelli murini sordi agli esseri umani si deve considerare le differenze nello sviluppo dell'udito tra specie.

Sebbene molte forme di disfunzione uditiva e vestibolare siano in fase di sviluppo e suggeriscano che il trattamento richieda un intervento precoce per ripristinare l'espressione genica appropriata al punto di tempo richiesto, ci sono molti casi di insorgenza tardiva o perdita dell'udito che progrediscono lentamente, causati da mutazioni genetiche che potrebbero rispondere a terapie applicate più avanti negli anni. Inoltre, la perdita dell'udito legata all'età e indotta dal rumore e altre forme degenerative di disfunzione dell'orecchio interno, potrebbero essere trattate in modo responsivo o profilattico nei bambini e negli adulti. Sebbene molti approcci, che hanno dimostrato un beneficio terapeutico per la perdita dell'udito e per la funzione vestibolare, abbiano trattato i topi subito dopo la nascita durante lo sviluppo dell'orecchio interno, ci sono stati alcuni studi che dimostrano l'efficacia terapeutica nell'orecchio interno in giovani e adulti, fatto che suggerisce che l'organo sarà responsivo alle terapie che sono attuate in fasi più tardive e che la tempistica dipenderà dal bersaglio specifico e dal deficit piuttosto che da qualsiasi barriera intrinseca alla terapia.

Per le forme genetiche di perdita dell'udito, le informazioni sull'effetto di una mutazione sono importanti per la progettazione di terapie. Quindi, sapere se una mutazione è autosomica dominante o recessiva, permette di comprendere quale approccio sia più efficace: quello basato sull'aumento della funzione di prodotti genici silenziati o sulla correzione di un'espressione genica aberrante tramite una perdita di funzione. Entrambi questi risultati possono essere raggiunti con un'appropriata progettazione degli ASO come descritto di seguito.

La via di somministrazione di molecole terapeutiche nell'orecchio è un altro tema nello sviluppo dei farmaci che deve essere affrontato. Anche se in alcuni casi l'orecchio interno è un organo ideale per la somministrazione di farmaci grazie al suo isolamento all'interno della capsula ossea dell'osso

temporale e il relativamente facile accesso attraverso l'orecchio medio, ci sono barriere specifiche per l'ingresso di farmaci nel sistema che devono essere superate.

Ci sono un certo numero di modi diversi per la somministrazione di farmaci nell'orecchio interno che sono stati esplorati e che possono essere ampiamente classificati come sistemici o locali. Per facilità di delivery, una terapia somministrata per esempio per via sistemica, per via endovenosa, per via intramuscolare o orale, può essere ideale se la molecola può accedere alle cellule coinvolte nell'orecchio interno. Tuttavia, le cellule endoteliali dei vasi sanguigni creano una barriera sangue-perilinfia e sangue-stria vascolare che limitano l'ingresso di farmaci applicati per via sistemica nell'orecchio interno e controllano anche l'eliminazione dei reagenti somministrati localmente.

**Figura 6: TRATTAMENTO CON OLIGONUCLEOTIDI ANTISENSO**

Il trattamento locale con ASO-29 nell'orecchio dei topi *USH1C* raggiunge le cellule ciliate e ripristina l'udito e l'equilibrio bloccando lo splicing criptico, promuovendo lo splicing corretto e l'aumento dei livelli di proteina armonina

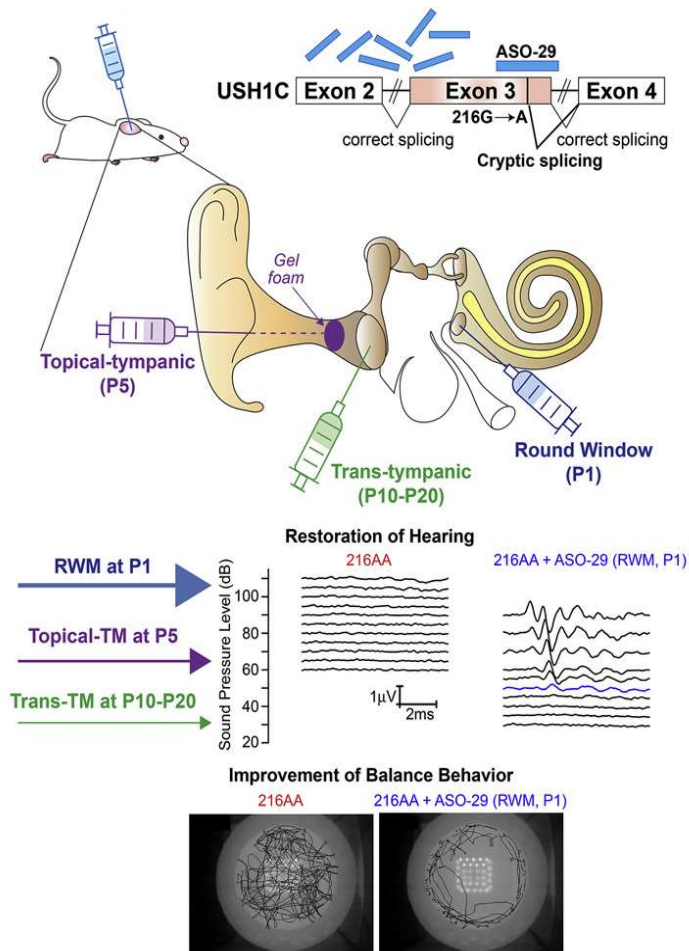


Immagine di  
(Lentz *et al.*, 2020)

Così, il delivery locale potrebbe essere vantaggioso in quanto fornirebbe il farmaco direttamente ed esclusivamente all'organo bersaglio, massimizzando così la concentrazione locale e minimizzando gli effetti sistemici e allo stesso tempo evitando anche molte delle barriere fisiche presenti in seguito al delivery sistemico. Le modalità di somministrazione locale che sono state esplorate includono: (1) la somministrazione



intratimpanica (IT) tramite iniezione attraverso la membrana timpanica e nell'orecchio medio, (2) la somministrazione intracocleare attraverso la finestra rotonda o cocleostomia, e (3) la somministrazione intralabirintina al canale semicircolare posteriore tramite canalostomia (Fig. 6). L'applicazione IT è limitata dal passaggio attraverso l'epitelio dell'orecchio medio, che copre la finestra rotonda e la finestra ovale, e l'eliminazione attraverso la tuba di Eustachio. La somministrazione IT di molecole terapeutiche in idrogeli, in alcuni casi, ha dimostrato di affrontare alcuni di questi problemi. Gli ultimi due metodi hanno il vantaggio di veicolare direttamente al sistema perilinfatico, evitando le barriere di adsorbimento, anche se, allo stesso tempo, questi possono essere considerati più invasivi e con più rischi potenziali rispetto agli approcci di delivery sistemico o intratimpanico. Infatti, l'iniezione nella finestra rotonda ha un'efficacia variabile, forse a causa dell'aumentato rischio di versamento nell'orecchio medio. La canalostomia può avere alcuni vantaggi per il delivery del farmaco direttamente all'orecchio interno senza il rischio di perdita dell'udito.

Un'importante considerazione per entrambe le modalità di delivery è il volume limitato di farmaco che può essere introdotto nel labirinto dell'orecchio interno, uno spazio che è limitato dal labirinto osseo circostante. Un modo per cui questa limitazione di volume può essere risolta è quello di iniettare attraverso la membrana della finestra rotonda, in seguito ad una fenestrazione del canale semicircolare, la quale aggiunge un'uscita per il fluido e raddoppia effettivamente il volume di iniezione consentito.

In definitiva, il tipo di farmaco, le cellule bersaglio, la funzione/disfunzione della proteina, il tipo di mutazione e i requisiti di sviluppo dovranno tutti essere attentamente considerati quando si progettano i trattamenti per l'orecchio interno.

Le terapie attuali che sono in clinica per le condizioni dell'orecchio interno sono principalmente farmaci come gli aminoglicosidi e gli steroidi; tuttavia, molti altri agenti di trattamento sono in via di sviluppo, tra cui piccole molecole, vettori virali per l'espressione di geni esogeni, editing genomico e oligonucleotidi antisense.

#### 4.1.2. Terapia con oligonucleotidi antisenso

Il targeting e la modifica dell'espressione genica con brevi sequenze di acido nucleico che funzionano, in parte, tramite accoppiamento complementare di basi a un RNA bersaglio hanno dimostrato essere una strategia terapeutica promettente. Ci sono diversi tipi di molecole antisenso che sono state esaminate come terapeutiche, che differiscono principalmente nel loro meccanismo d'azione. Queste includono gli oligonucleotidi antisenso (ASO) che alterano il loro bersaglio creando un blocco sterico al momento del legame, o quelli che degradano l'RNA quando si legano ad esso, come ribozimi, siRNA/miRNA, o ASO RNasi H-dipendenti. In generale, le molecole di RNA o DNA non modificate sono instabili e si degradano rapidamente *in vivo*. La maggior parte degli ASO sono chimicamente modificati per migliorare il loro profilo farmacologico. Le specifiche modifiche chimiche che vengono apportate agli ASO dipendono dal tipo di ASO. Le modifiche agli ASO sono state cruciali per stabilizzarli *in vivo*, aumentarne l'affinità di legame verso il loro bersaglio e migliorare l'uptake e il rilascio cellulare, e, più recentemente, fornire caratteristiche di targeting selettivo per il tessuto e specifico per il tipo cellulare. Due tipi di oligonucleotidi che sono stati esplorati come agenti terapeutici per la perdita dell'udito includono gli ASO splice-switching e l'RNA interference (RNAi) con le sequenze siRNA o miRNA.

#### 4.1.2.1. RNA Interference

Gli ASO che inducono la degradazione dell'RNA da parte del *complesso silenziatore indotto da RNA* (RISC) sono progettati come piccoli RNA interferenti (siRNA) o microRNA (miRNA) che innescano la degradazione dell'RNA attraverso la via dell'RNA Interference (RNAi). RNAi si riferisce al fenomeno per cui gli RNA a doppio filamento (dsRNA) inducono il silenziamento post-trascrizionale sequenza-specifico di un gene con una sequenza omologa al dsRNA prendendo di mira il trascritto dell'RNA (Fig. 7a). Questo processo comporta la scissione di una regione di dsRNA in un frammento dsRNA più breve da 21- a 23-nucleotidi attraverso una nucleasi dsRNA-specifica, chiamata Dicer. Il dsRNA risultante è legato da una proteina Argonauta, formando il complesso RISC dove 1 filamento del dsRNA viene rimosso e l'altro filamento viene rilasciato alla sequenza di RNA bersaglio per l'accoppiamento delle basi. Dopo il legame, l'RNA bersaglio è scisso, degradato, o in altre parole represso da un punto di vista traduzionale.

Utilizzare il meccanismo naturale di RNAi delle cellule per sottoregolare in modo specifico l'espressione genica introducendo il siRNA nella cellula, è stato uno strumento intensamente studiato per la terapia basata sui geni, e il primo farmaco a siRNA, il patisiran (ONPATTRO™), che ha come bersaglio e sotto-regola l'espressione del gene *TTR* nel fegato, è stato recentemente approvato dalla FDA per il trattamento dell'amiloidosi transtiretina ereditaria. Il Patisiran è un acido nucleico a doppio filamento a 21- nucleotidi con una porzione della sequenza modificata con 2'-O-metilcitidine e 2'-O-metiluridine. L'acido nucleico modificato è formulato come un complesso lipidico per il rilascio agli epatociti. Uno sviluppo chiave che ha portato al successo di questo trattamento siRNA è stata la formulazione a base di nanoparticelle lipidiche come agenti per il delivery dei siRNA.

Per il trattamento o la protezione contro la perdita dell'udito, una serie di diverse strategie basate su RNAi che differiscono negli RNA bersaglio, nelle modalità di delivery e nei tipi di molecole siRNA/miRNA hanno mostrato efficacia in modelli animali. Queste includono, ma non sono limitate agli approcci RNA che inducono la riduzione di mRNA codificanti proteine

tossiche, le proteine con guadagno di funzione o la modulazione dei percorsi genici che limitano la rigenerazione o proteggono contro la perdita dell'udito indotta dal rumore o contro l'ototossicità indotta dal cisplatino. Nella maggior parte dei casi riportati, gli siRNA non formulati sono stati rilasciati tramite iniezione trans-timpanica nell'orecchio medio prima dell'induzione di danni all'udito e alle cellule ciliate, il che risulta in una modesta protezione dalla perdita dell'udito. Questa modalità di rilascio sembra essere efficace per i siRNA, anche se miglioramenti nel delivery potrebbero elevare la protezione. Risultati promettenti con la trasduzione mediata da AAV di miRNA artificiali o siRNA formulati su nanoparticelle indicano approcci alternativi efficaci per il knockdown dell'espressione genica basata sull'RNAi. Qui, approfondiamo esempi di approcci RNAi per il trattamento di due diversi tipi di perdita uditiva.

### **DFNA36/TMC1**

L'uso di RNAi per sopprimere gli alleli mutanti autosomici dominanti associati alla perdita dell'udito è stato identificato come un approccio efficace in un modello animale di NSHL umana autosomica-dominante, in cui una mutazione missenso in un singolo allele del gene è responsabile del deficit. Per questo, un topo portatore dell'allele semidominante *Tmc1* c.1235T>A (p.M412K), conosciuto anche come mutazione missenso *Beethoven* (*Bth*), è stato trattato con un miRNA artificiale espresso tramite un vettore virale adeno-associato (AAV) somministrato tramite iniezione attraverso la membrana della finestra rotonda (Fig. 7a). La mutazione umana ortologa, *TMC1* c.1253T>A (p.M418K), è associata ad una progressiva ipoacusia neurosensoriale postlinguale con un'età di insorgenza che varia dai 5 ai 25 anni. Allo stesso modo nei topi, l'allele *Bth* causa una perdita progressiva dell'udito. Una singola iniezione di AAV-TMC1 miRNA in topi dal giorno 0 al giorno 2 dopo la nascita (P0-P2), ha portato ad una riduzione di quasi il 90% nel *Tmc1* c.1235T>A allele, quattro settimane dopo l'iniezione. Questo abbattimento dell'allele associato alla malattia ha migliorato la sopravvivenza delle cellule ciliate rispetto ai topi di controllo. L'espressione del miRNA mirato a *Tmc1* ha anche rallentato la progressione della perdita uditiva, misurata tramite ABR, per 21 settimane

con alcuni topi che mostravano soglie ABR stabili fino a 35 settimane, l'ultimo punto temporale valutato. La conservazione dell'udito era significativa a 8 e 16 kHz ma non a 32 kHz, simile a quanto riportato da altri sulla mancanza di efficacia di terapie per l'udito nella gamma delle alte frequenze nei topi e potrebbe essere correlata alla quantità di esposizione del trattamento alle cellule nella regione della coclea che è responsabile della rilevazione di toni ad alta frequenza.

In uno studio di follow-up, in cui la somministrazione è avvenuta tramite iniezione attraverso la membrana della finestra rotonda in combinazione con la fenestrazione del canale semicircolare, il trattamento di topi adulti con il miRNA mirato a TMC1 è risultato rallentare la progressione della perdita dell'udito e la degenerazione dei fasci di stereociglia e migliorare la sopravvivenza delle cellule ciliate. Questo studio ha dimostrato per la prima volta che le terapie genetiche basate sull'antisense sono efficaci quando somministrate ad un modello di topo adulto con sordità simile a quella umana, fornendo un'entusiasmante *proof of concept* di efficacia del trattamento più avanti nella vita. Inoltre, è importante notare che, pur avendo solo una differenza di un singolo nucleotide nella sequenza bersaglio, l'espressione del miRNA ha ridotto l'espressione dell'allele mutato senza influenzare l'espressione dell'allele wild-type. Questo knockdown allele-specifico è particolarmente importante nei casi di targeting di un bersaglio dominante negativo poiché il prodotto proteico wildtype è probabilmente richiesto e deve essere mantenuto per sostenere l'udito normale dopo che la proteina dominante negativa viene abbattuta. Nel complesso, questi risultati dimostrano la fattibilità dell'RNAi per la soppressione dell'espressione genica associata alla sordità per trattare la perdita dell'udito. Anche se questo approccio utilizza un'espressione mediata da AAV della molecola siRNA, che ha il vantaggio di un'espressione a lungo termine dell'RNA interferente, l'opzione dell'apporto non virale simile al Patisiran è una possibilità se si potesse sviluppare una formulazione appropriata, sviluppata per un rilascio efficiente nell'orecchio interno.

Altri approcci terapeutici basati sugli acidi nucleici per la disfunzione dell'orecchio interno hanno mostrato un buon effetto terapeutico nei modelli murini. L'uso di approcci diversi negli stessi modelli murini di sordità umana

ha permesso un confronto dei trattamenti. Per esempio, i topi *DFNA36/TMC1* che sono stati efficacemente trattati con miRNA artificiali somministrati con AAV per sottoregolare l'espressione dominante negativa di *TMC/Bth*, discussi sopra, hanno anche dimostrato di rispondere positivamente ad una strategia di editing genomico, usando il sistema (CRISPR)/Cas9, per correggere la mutazione *TMC1 Bth*. In questo caso, la proteina Cas9 è stata impacchettata con il suo RNA guida in una goccia lipidica che può fondersi con le cellule. L'iniezione delle nanoparticelle nell'orecchio interno di topi appena nati ha avuto come risultato il rilascio alle cellule e la formazione di cellule ciliate interne e un miglioramento temporaneo dell'udito nonostante l'editing genomico che era limitato ad un piccolo numero di cellule.

### **Hes1 e perdita dell'udito indotta dal rumore**

Un'altra strategia RNAi, che è stata studiata come approccio terapeutico per la perdita dell'udito causata da danni, è la sottoregolazione delle vie dell'espressione genica che sopprimono la rigenerazione. La rigenerazione delle cellule ciliate dopo un danno è considerata un obiettivo importante per il trattamento della perdita uditiva. L'induzione o l'espressione del fattore di trascrizione *Atoh-1*, che svolge un ruolo nella differenziazione delle cellule ciliate durante lo sviluppo, ma non è espresso ad alti livelli negli adulti, è stato un obiettivo per attivare la rigenerazione cellulare nell'orecchio interno. Un approccio è stato quello di sottoregolare i repressori dell'espressione genica di *Atoh-1* come i repressori trascrizionali della famiglia di geni *Hes* utilizzando siRNA. A questo scopo, il knockdown dell'espressione del gene *HES1* con siRNA ha portato alla differenziazione delle cellule ciliate e a un certo miglioramento delle soglie uditive nei porcellini d'india in seguito a lesioni da rumore. In questo caso, 3 giorni dopo la lesione, i siRNA sono stati consegnati incapsulati in nanoparticelle di acido poli(lattide-co-glicolide) (PLGA) per un rilascio prolungato in seguito alla somministrazione tramite infusioni con pompa mini-osmotica attraverso una cocleostomia laterale alla finestra rotonda.

#### 4.1.2.2. Oligonucleotidi antisense Splice-Switching

Gli ASO di tipo splice-switching sono tipicamente composti da 12-30 nucleotidi che vengono modificati chimicamente per migliorare la stabilità, il delivery e l'affinità di legame. Questo tipo di ASO funziona solamente legandosi. Gli ASO che conferiscono i loro effetti semplicemente legandosi ad un RNA bersaglio possono essere progettati per bloccare le interazioni di una specifica regione a filamento singolo di RNA con proteine o altre sequenze di RNA, alterando così l'elaborazione dell'RNA. Per l'attività di splice-switching, un ASO che si lega ad un RNA bersaglio può alterare il riconoscimento dei siti di splice dallo spliceosoma, il che porta ad un'alterazione del normale splicing dei trascritti target. È importante che, per evitare la scissione da parte della nucleasi endogena RNasi H, che scinde l'RNA che è accoppiato con il DNA, l'ASO debba essere chimicamente modificato per sfuggire alla scissione enzimatica.

Modifiche chimiche alla struttura portante, come legami morfolino fosforodiamidato, e allo zucchero, come i nucleotidi modificati al 2' e vincolati conformazionalmente, hanno migliorato la resistenza alla nucleasi. Quindi, con le opportune modifiche chimiche, gli ASO splice-switching modificano l'espressione genica senza alterare l'abbondanza complessiva dell'RNA target. Gli ASO splice-switching sono la base di farmaci approvati dalla FDA per l'atrofia muscolare spinale (SMA), nusinersen (SPINRAZA™), e la distrofia muscolare di Duchenne (DMD), eteplirsen (EXONDYS 51™).

Anche se non ancora esplorato come approccio terapeutico per la disfunzione dell'orecchio interno, l'uso di ASO dipendenti dalla RNasi H potrebbe essere uno strumento efficace quando l'obiettivo è la sottoregolazione dell'espressione genica, proprio come i siRNA e la via dell'RNAi sono stati utilizzati per la sottoregolazione dell'espressione genica. Gli ASO possono essere progettati per avere un nucleo di nucleotidi di DNA affiancati da nucleotidi di RNA modificati per la stabilità. Questi cosiddetti gapmer, quando vengono duplicati con l'RNA, creano un duplex DNA:RNA in cui l'RNA diventa un substrato per la scissione da parte della nucleasi endogena, RNasi H. I gapmer sono attualmente in clinica per il trattamento dell'ipercolesterolemia familiare, mipomersen (KYNAMRO™), e l'amiloidosi TTR, inotersen (TEGSEDI™).

## **ASO Splice switching (SSO) nella sindrome di Usher**

Gli ASO splice-switching sono stati usati per correggere l'espressione genica e recuperare l'udito e la funzione vestibolare nei modelli murini con sindrome di Usher.

### **USH1C/Armonina**

La prima dimostrazione che gli ASO potrebbero essere usati per trattare la perdita dell'udito è arrivata nel 2013 con la testimonianza di un ripristino uditivo e vestibolare in un modello murino di sindrome di Usher di tipo 1C in seguito al trattamento con ASO. La Usher di tipo 1C è causata da mutazioni in *USH1C* che codifica la proteina Armonina, un'impalcatura coinvolta in interazioni critiche per la formazione e il mantenimento delle stereociglia e per l'organizzazione delle cellule ciliate nella coclea. È stato progettato un ASO splice-switching per accoppiarsi alla sequenza del sito 5' di splice che è stata creata da una mutazione G>A in posizione c.216 nell'esone 3 del gene *USH1C* (Fig. 7b). Quando sono stati trattati con una singola iniezione intraperitoneale al giorno 5 postnatale (P5), l'udito è stato riportato a livelli wild-type ad alcune frequenze, come valutato dall'analisi della risposta del tronco encefalico evocata dall'udito. Questo recupero era completo alle basse frequenze, 8 e 16 kHz, e in misura minore a 32 kHz. Le cellule ciliate esterne erano anche funzionali nei topi trattati con ASO, come dimostrato da registrazioni DPOAE significative nei topi trattati, che erano assenti nei topi trattati con un controllo, un ASO non mirato. Le analisi ABR e DPOAE hanno rivelato che il trattamento dei topi in tempi più precoci a P1 rispetto a P5 ha portato a una migliore funzione IHC e OHC. Sorprendentemente, l'udito si è mantenuto per almeno sei mesi dopo il trattamento, sebbene sia stato osservato un aumento delle soglie rispetto alle misurazioni effettuate nei tempi precedenti. L'analisi immunohistochimica della localizzazione degli ASO nelle cellule ciliate cocleari usando un anticorpo ASO-specifico ha mostrato una distribuzione diffusa di ASO nella membrana basilare con una maggiore intensità di segnale nelle cellule ciliate interne rispetto a quelle esterne. Il recupero dell'udito era accompagnato da una conservazione significativa del numero di OHC e dall'organizzazione delle stereociglia. Sorprendentemente, sebbene ci fosse un consistente aumento dei livelli di proteina Armonina nella coclea dei topi Usher trattati con l'ASO mirato alla



mutazione 216G>A, c'era un livello relativamente basso di splicing corretto rispetto allo splicing nel sito aberrante. Questo risultato suggerisce che una bassa quantità di Armonina RNA sia sufficiente per sostenere l'udito in questi topi.

Il trattamento con ASO dei topi Usher ha anche eliminato tutti i comportamenti indicativi di disfunzione vestibolare nei topi, tra cui il volteggiare, l'andare a testa in giù e l'incapacità di nuotare. Un'indagine più dettagliata sul trattamento della disfunzione vestibolare è stata eseguita testando i topi Usher per i potenziali evocati sensoriali vestibolari (VsEP), che valutano direttamente la funzione vestibolare. È interessante notare che se il trattamento veniva somministrato durante un periodo critico tra il giorno postnatale 1 e il giorno 5 postnatale (P1-P5), i topi avevano una normale funzione vestibolare come indicato dai VsEP, mentre i topi trattati a P15 non mostravano un comportamento vestibolare anormale (girando in tondo e disfunzioni nel nuoto) ma avevano VsEP anormali. Anche il comportamento esplorativo è danneggiato nei topi Usher, un deficit non interamente legato al comportamento vestibolare anormale. Un'indagine sull'organizzazione dei movimenti esplorativi in questi topi è stata usata per valutare l'organizzazione spaziale sia negli ambienti bui che alla luce. Di solito i topi utilizzano una combinazione di spunti ambientali e di auto-movimento durante l'esplorazione e queste attività sono risultate interrotte nei topi Usher e recuperate nei topi Usher trattati con ASO per correggere lo splicing di *Ush1c*.

Lo sviluppo dell'udito nei topi continua dopo la nascita fino a circa P15. Questo periodo di sviluppo corrisponde all'intervallo di tempo in cui l'ASO-Ush deve essere somministrato per conferire un beneficio terapeutico ai fenotipi dell'udito e dell'equilibrio, suggerendo che esiste una finestra di opportunità per il trattamento durante lo sviluppo dell'udito. Tuttavia, negli esseri umani, il sistema uditivo diventa funzionale intorno alle 25-29 settimane di età gestazionale con le prime evidenze di ABR a 16 settimane di età gestazionale. Questa finestra di sviluppo suggerisce che un trattamento per la perdita uditiva congenita richiederebbe probabilmente la somministrazione in utero. Con questo in mente, uno studio recente ha scoperto che una somministrazione di ASO in cavità intra-amniotica provoca un effetto significativo sull'RNA target nell'orecchio interno. Quando

iniettato nella cavità amniotica di embrioni E13-13.5, l'ASO, che prende di mira il sito di splicing aberrante di *Ush1c* c.216A, ha aumentato l'mRNA corretto di *Ush1c* ad un livello paragonabile a quello osservato quando l'ASO è stato consegnato tramite iniezione intraperitoneale (IP) a P5. Questi risultati suggeriscono che il delivery intra-amniotico di ASO potrebbe essere considerato una via per un approccio terapeutico relativamente non invasivo per le malattie fetali e congenite.

Sono state riportate altre strategie per il trattamento della sindrome di Usher tipo 1c. Un approccio di delivery genico mediato da AAV ha mostrato un'efficacia simile di quello ottenuto con ASO splice-switching in topi *Ush1c* c.216A. In questo caso, il virus AAV-Ush 1c è stato iniettato nell'orecchio interno direttamente attraverso la finestra rotonda e similmente agli esiti con ASO, le funzioni vestibolare e uditiva sono state recuperate per più di 6 mesi dopo il trattamento. Analogamente ad ASO, il beneficio terapeutico era limitato a trattamenti effettuati prima di P10-P12, a stimoli a bassa frequenza, con un piccolo recupero a 32-kHz. Un più diretto confronto tra questi due approcci richiederà la valutazione dell'attività di ASO rilasciati direttamente nell'orecchio interno e un monitoraggio della funzione uditiva a più lungo termine. Entrambi questi studi dimostrano l'utilità di ASO e della tradizionale terapia genica nel trattamento di questa forma della sindrome di Usher. È importante notare che i due trattamenti non interferiscono tra loro e, quindi, potrebbero essere usati in combinazione, vantaggio che potrebbe essere notevole, per esempio, nei casi in cui il trattamento con AAV è limitato dall'immunogenicità.

## USH2A/Uscherina

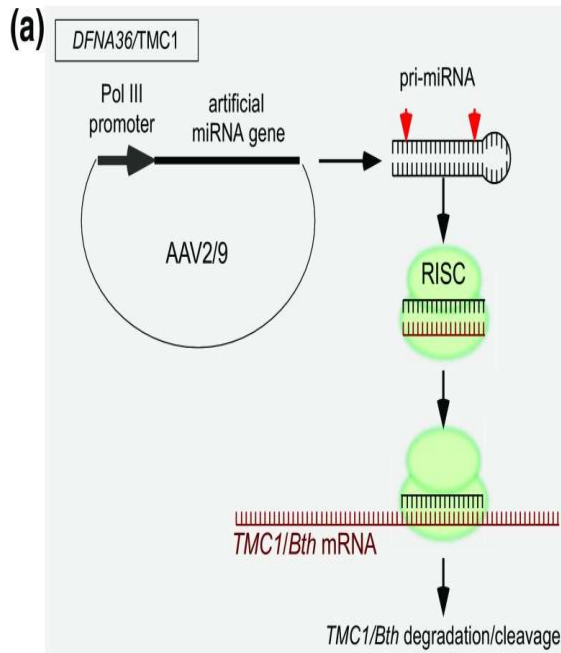
Le mutazioni nel gene *USH2A*, che codifica la proteina Uscherina, sono le cause più frequenti dell'Usher di tipo 2. Una mutazione, *USH2A* c.7595-2144A>G crea un nuovo sito di splice donatore nell'introne 40 del gene che risulta nello splicing di uno pseudoesone di 40 nucleotidi (PE40) nell'mRNA di *USH2A*. Gli ASO progettati per accoppiarsi alla regione del sito 3'accettore di splice di PE40 bloccano efficacemente lo splicing PE40 e ripristinano lo splicing appropriato di *USH2A* in fibroblasti derivati da pazienti e in un modello knockin umanizzato di zebrafish, sebbene lo splicing aberrante di PE40 fosse minimo in questi animali.

Un'ulteriore analisi del gene *USH2A* in individui con Usher di tipo 2, come determinato dall'identificazione di una mutazione eterozigote nel gene, ha identificato 3 ulteriori profonde mutazioni introniche nel gene, che portano alla formazione di siti di splice de novo e all'inclusione di pseudoesoni. L'efficacia degli ASO splice-switching nel bloccare lo splicing di pseudoesoni è stata dimostrata *in vitro* usando un oligonucleotide morfolino antisenso per bloccare lo splicing aberrante causato da 1 delle mutazioni c.9959-4159A>G.

Le mutazioni dell'esone 13 di *USH2A*, come c. 2299delG, si trovano in un'ampia percentuale di pazienti con Usher di tipo 2. Molte di queste mutazioni introducono codoni di terminazione prematura (PTC) o frameshift che portano alla perdita della proteina Uscherina. L'eliminazione completa dell'esone 13 non distrugge il frame di lettura della proteina e, quindi, inducendo lo skipping dell'esone con gli ASO splice-switching si dovrebbero eliminare le mutazioni non senso, correggendo essenzialmente il frame di lettura e recuperando l'espressione della proteina Uscherina, nonostante un'isoforma priva dei 214 aminoacidi codificati dall'esone 13. L'analisi dei pazienti ha rivelato che quelli con 2 mutazioni troncanti *USH2A* sviluppavano un deterioramento dell'udito più grave rispetto ai pazienti con solo 1 mutazione troncante o 2 mutazioni non troncanti, suggerendo che l'uso di ASO per indurre lo skipping, per essenzialmente cambiare una mutazione troncante in una non troncante, potrebbe essere un approccio terapeutico fattibile. Una logica simile è alla base di un ASO terapeutico per la distrofia muscolare di Duchenne, EXONDYS 51. Questo approccio per

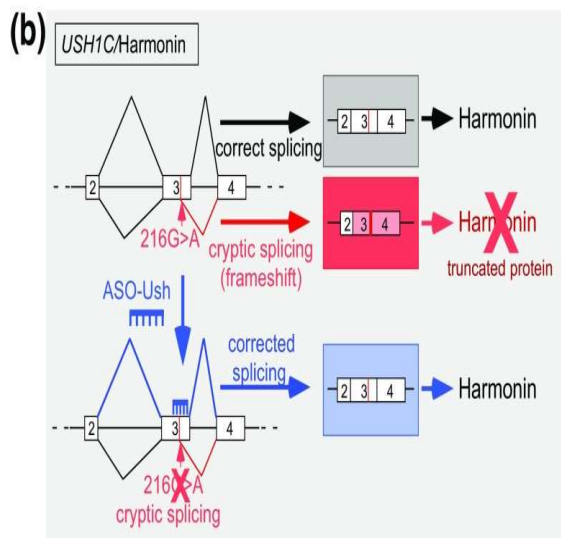
l'*USH2A* è perseguito da ProQR con QR-421a, che recentemente ha ricevuto la denominazione di fast-track dalla FDA, per il trattamento della perdita della vista in pazienti USH con mutazioni dell'esone 13 di *USH2A* (<http://www.proqr.com>; brevetto n. US 10,131,910 B2).

Questi approcci di ASO per l'Usher di tipo 2 causati da mutazioni in *USH2A* non hanno ancora dimostrato di avere effetti terapeutici sull'udito, a causa della mancanza di modelli animali adeguati, ma dimostrano comunque che gli ASO possono indurre l'effetto desiderato sullo splicing. Data la dimostrazione di un rilascio dell'ASO terapeuticamente rilevante nell'orecchio interno per prevenire il deterioramento dell'udito e la disfunzione vestibolare nei topi Usher con la mutazione USH1C, come descritto sopra, c'è un forte precedente che gli ASO con caratteristiche simili potrebbero essere efficaci *in vivo*.



**Figura 7: Esempi di approcci antisense per il trattamento della perdita dell'udito e della disfunzione vestibolare.**

(a) Un miRNA-mediato knockdown dell'allele semi-dominante gain-of-function TMC1/Bth da RNAi. Un gene artificiale miRNA targeting TMC1/Bth espresso da una cassetta con all'interno il vettore del virus adeno-associato (AAV2/9) dopo la trasduzione virale viene elaborato per generare un breve RNA di 21-23-nt a doppio filamento che è legato al complesso di silenziamento indotto dall'RNA (RISC). Un filamento del duplex viene rimosso e il restante RNA antisense a singolo filamento di base si accoppia all'mRNA TMC1/Bth, che inizia la scissione o la degradazione, con conseguente diminuzione dell'abbondanza complessiva dell'mRNA.



(b) Schema di un splice-switching ASO per la correzione dello splicing. Una mutazione (216G>A) nell'esone 3 di USH1C crea un sito di splicing criptico che risulta in mis-splicing sia la creazione di una lettura aperta frameshift sia la perdita di Armonina a lunghezza intera, causando così la sindrome di Usher di tipo 1C. L'ASO (mostrato in blu) come coppie di basi attraverso il sito di splicing criptico, blocca lo splicing aberrante, riorientando così al sito di splicing wild-type e ripristinando il frame di lettura USH1C e l'armonina a piena lunghezza. Le caselle rappresentano gli esoni e le linee sono introni. Linee diagonali indicano il percorso di splicing.

Immagine di (Hastings and Jones, 2019)



# 5. CAPITOLO 5

## 5.1. CONCLUSIONI

Sviluppare una terapia farmacologica per l'ipoacusia dell'orecchio interno, richiede di affrontare molte questioni, tra cui il design specifico del farmaco, la sua via di somministrazione e di rilascio, l'età per il trattamento, il tessuto ed il tipo di cellule bersaglio. Molte sono le opportunità d'uso di questa tecnologia.

Per esempio, nelle mutazioni missenso, che sono responsabili della maggior parte dei casi di ipoacusia autosomica-dominante (AD) non sindromica, l'eliminazione del trascritto di RNA mutante tramite RNAi o tramite scissione mediata da RNAsi H, utilizzando molecole antisense, è un approccio ampiamente applicabile, per eliminare gli RNA associati a prodotti proteici gain-of-function tossici tipici nella NSHL AD. Inoltre, la NSHL AD è tipicamente postlinguale e progressiva, offrendo una finestra terapeutica relativamente lunga di opportunità per l'intervento.

Per altri tipi di mutazioni, gli ASO splice-switching, simili a quello descritto per colpire la mutazione Ush1c c.G216A, sono promettenti come molecole terapeutiche. Un esempio di altre mutazioni di splicing, che si manifestano in una forma di sindrome di Usher, è l'Usher 3A. Qui, una mutazione *CLRN1* (*USH3A*) che crea un nuovo sito di splicing, attiva lo splicing di uno pseudoesone aberrante, con conseguente frameshift e un codone di terminazione prematura nell'mRNA. Oltre a bloccare l'uso di siti di splicing criptici o de novo attivati da mutazioni, gli ASO splice-switching possono anche essere progettati per indurre eventi di splicing che potrebbero correggere il frame di lettura nei casi di frameshift e di mutazioni di stop.

Le dimostrazioni finora raggiunte, che gli oligonucleotidi antisense e altre forme di terapie con acidi nucleici possono modulare con successo

l'espressione genica, sono un risultato importante che stabilisce un precedente per l'ulteriore sviluppo di questa forma di terapia per la perdita dell'udito.

La somministrazione di farmaci all'orecchio interno ha una serie di vantaggi rispetto ad altri organi, come il potenziale di accesso alla coclea e/o all'organo vestibolare attraverso una serie di diverse vie di iniezione dirette, inoltre, c'è la prova che gli ASO possono accedere alla coclea se consegnati per via sistemica o anche nella cavità amniotica.

Gli sviluppi futuri nel delivery di ASO beneficeranno probabilmente dello sviluppo di ulteriori trattamenti per l'orecchio interno. Per esempio, la somministrazione di ASO in nanoparticelle, come il PLGA usato nel rilascio dei siRNA che prendono di mira HES1, descritto sopra, potrebbe aiutare il trattamento dell'orecchio interno, anche se in questo caso la nanoparticella viene iniettata attraverso la membrana della finestra rotonda.

C'è stata una ricerca limitata fino ad oggi sulle nanoparticelle mirate, somministrate sistematicamente all'orecchio interno o attraverso la finestra rotonda, inoltre il delivery tessuto-specifico degli ASO, sebbene non ancora esplorato per il targeting dell'orecchio interno, si è sviluppato rapidamente, prevedendo modifiche alle molecole antisenso stesse che massimizzeranno la consegna del farmaco alle cellule di interesse.

Complessivamente, gli approcci terapeutici con antisenso offrono una serie di diverse opzioni terapeutiche, molte delle quali si sono rivelate promettenti in modelli animali di sordità umana, offrendo basi importanti per lo sviluppo futuro della tecnologia per il trattamento della disfunzione uditiva e vestibolare dell'orecchio interno.



## 6. CAPITOLO 6

### 6.1. BIBLIOGRAFIA

Butz, M. *et al.* (2020) 'Development and Validation of a Next-Generation Sequencing Panel for Syndromic and Nonsyndromic Hearing Loss', *The journal of applied laboratory medicine*, 5(3), pp. 467–479. doi:10.1093/jalm/jfaa021.

Depreux, F.F. *et al.* (2016) 'Antisense oligonucleotides delivered to the amniotic cavity in utero modulate gene expression in the postnatal mouse', *Nucleic acids research*, 44(20), pp. 9519–9529. doi:10.1093/nar/gkw867.

Dhuri, K. *et al.* (2020) 'Antisense oligonucleotides: An emerging area in drug discovery and development', *Journal of Clinical Medicine*, 9(6), pp. 1–24. doi:10.3390/JCM9062004.

Fawcett, T.J. *et al.* (2020) 'Automated classification of acoustic startle reflex waveforms in young CBA/CaJ mice using machine learning', *Journal of Neuroscience Methods*, 344(May), p. 108853. doi:10.1016/j.jneumeth.2020.108853.

Guasti, M.T. *et al.* (2014) 'The effect of language structure on linguistic strengths and weaknesses in children with cochlear implants: Evidence from Italian', *Applied Psycholinguistics*, 35(4), pp. 739–764. doi:10.1017/S0142716412000562.

Hastings, M.L. and Jones, T.A. (2019) 'Antisense Oligonucleotides for the Treatment of Inner Ear Dysfunction', *Neurotherapeutics*, 16(2), pp. 348–359. doi:10.1007/s13311-019-00729-0.

Homepage Hereditary Hearing Loss (2019) *Welcome to the Hereditary Hearing Loss Homepage*. Available at: <https://hereditaryhearingloss.org/> (Accessed: 2 June 2022).

Lammens, F. *et al.* (2013) 'Aetiology of congenital hearing loss: A cohort review of 569 subjects', *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 77(9), pp. 1385–1391. doi:10.1016/j.ijporl.2013.06.002.

Lentz, J.J. *et al.* (2020) 'Direct Delivery of Antisense Oligonucleotides to the Middle and Inner Ear Improves Hearing and Balance in Usher Mice', *Molecular Therapy*, 28(12), pp. 2662–2676. doi:10.1016/j.ymthe.2020.08.002.

Rauterkus, G. *et al.* (2022) 'Conversations in Cochlear Implantation : The Inner Ear Therapy of Today', pp. 1–18.

Renauld, J.M. and Basch, M.L. (2021) 'Congenital Deafness and Recent Advances Towards Restoring Hearing Loss', *Current Protocols*, 1(3), pp. 1–37. doi:10.1002/cpz1.76.

Ritter, K.E. and Martin, D.M. (2019) 'Neural crest contributions to the ear: Implications for congenital hearing disorders', *Hearing Research*, 376, pp. 22–32. doi:10.1016/j.heares.2018.11.005.

Wang, L. *et al.* (2020) 'Fetal antisense oligonucleotide therapy for congenital deafness and vestibular dysfunction', *Nucleic Acids Research*, 48(9), pp. 5065–5080. doi:10.1093/nar/gkaa194.

