



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
**Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute**

Corso di laurea magistrale a ciclo unico in  
MEDICINA VETERINARIA

L'IMPORTANZA DELL'IMAGING DIAGNOSTICO IN  
SPERIMENTAZIONE ANIMALE NELL'OTTICA DI  
FAVORIRE LA REDUCTION: ANALISI DELL'UTILIZZO  
DELLA RISONANZA MAGNETICA

Relatore: Prof. Alessandro Zotti  
Correlatrice: Dott. ssa Elena Nicolato

Laureando Luca Morando  
Matricola n. 1205833

ANNO ACCADEMICO 2023/2024



## Riassunto

Lo scopo di questa tesi è quello di mettere in evidenza l'importanza dell'impiego delle tecniche di imaging nel campo della sperimentazione animale, in particolar modo della risonanza magnetica, volte a migliorare la "Reduction". Il concetto delle 3R ("Reduction, Refinement & Replace"), introdotto da Russel e Burch già nel 1959, si sta affermando come punto cardine nel rispetto del benessere degli animali soggetti a sperimentazione. Esistono svariati metodi per riuscire a favorire le 3R e in questo lavoro di tesi mi sono soffermato su come le tecniche di imaging abbiano la capacità di favorire in modo rilevante la "Reduction". Con questo termine, si fa riferimento alla riduzione del numero di animali utilizzati nei vari protocolli sperimentali. Le tecnologie a disposizione sono molteplici, tra queste abbiamo la tomografia computerizzata (TC), la bioluminescenza (BLI), la tomografia ad emissione di positroni (PET), l'ecografia e la risonanza magnetica (MRI). Grazie all'appoggio all'Università degli Studi di Verona, in particolare alla collaborazione con la dottoressa Elena Nicolato, ho potuto apprendere e approfondire la mia conoscenza rispetto all'utilità dell'imaging in "Reduction". L'Università degli Studi di Verona possiede, infatti, un tomografo a risonanza magnetica per piccoli animali utilizzato per la sperimentazione. Da qui, ho avuto la possibilità di ricavare alcuni lavori sperimentali effettuati negli anni precedenti, con le rispettive immagini di risonanza magnetica. Analizzando questi lavori risulta evidente quanto sia importante l'utilizzo delle tecnologie di imaging nel campo della sperimentazione animale, in questo caso particolare della MRI. Questa tecnica permette di effettuare studi longitudinali, ossia di osservare lo stesso animale durante tutto l'esperimento e offrendo quindi molti vantaggi, per esempio: valutare lo sviluppo di una massa tumorale sullo stesso soggetto in diversi step temporali o l'efficacia di un nuovo trattamento terapeutico, ma soprattutto di garantire la sopravvivenza dell'animale per tutta la durata dell'esperimento. In un futuro non troppo distante sarà quindi necessario implementare l'utilizzo di queste tecniche di imaging per riuscire a rispettare il benessere degli animali utilizzati per la sperimentazione.



## **Abstract**

The purpose of this thesis is to highlight the importance of using imaging techniques in animal experimentation, with a focus on magnetic resonance imaging (MRI), to enhance “Reduction.” The 3R concept (“Reduction, Refinement & Replacement”), introduced by Russell and Burch in 1959, is becoming a cornerstone for respecting the welfare of experimental animals. Various methods can promote the 3Rs, and in this thesis, I have focused on how imaging techniques can significantly favor “Reduction”, which refers to the reduction in the number of animals used in various experimental procedures. Numerous technologies, including computed tomography (CT), bioluminescence (BLI), positron emission tomography (PET), ultrasound, and MRI, are available. With the support of the University of Verona, particularly through collaboration with Dr. Elena Nicolato, I have been able to deepen my knowledge of the benefits of imaging for “Reduction”. The University of Verona has a magnetic resonance tomograph for small animals used in experimentation. This allowed me to access experimental work conducted in previous years, along with the respective MRI images. Analyzing these works reveals the critical importance of imaging technologies in animal experimentation, particularly MRI. This technique enables longitudinal studies, allowing observation of the same animal throughout the entire experiment. This offers numerous advantages, such as evaluating the development of a tumor mass in the same subject at different time points or assessing the efficacy of a new therapeutic treatment, while ensuring the animal's survival for the entire duration of the experiment. In the near future, it will be essential to implement these imaging techniques to respect the welfare of experimental animals.



## Indice

Riassunto.....	3
Abstract.....	5
1. Introduzione.....	9
2. Principio delle 3R: Replacement, Refinement, Reduction.....	11
2.1 Replacement .....	11
2.2 Refinement .....	12
2.3 Reduction .....	13
2.4 Interazioni tra le 3R.....	15
3. Tecniche di Imaging diagnostico volte a favorire la Reduction .....	17
3.1 Tomografia computerizzata (TC) .....	17
3.2 Bioluminescenza (BLI) .....	19
3.3 Tomografia a emissione di positroni (PET) .....	21
3.4 Ecografia .....	23
3.5 Imaging a risonanza magnetica (MRI) .....	25
4. MRI come principale strumento di Reduction e tecniche associate .....	29
4.1 Neuroimaging strutturale .....	29
4.2 Risonanza magnetica funzionale (fMRI) .....	30
4.3 Risonanza magnetica spettroscopica (MRS).....	33
4.4 Angio-MRI (MRA) .....	35
4.5 Diffusion Tensor Imaging (DTI) .....	37
5. Casi studio .....	40
5.1 Materiali e metodi .....	40
5.1.1 Monitoraggio della crescita tumorale pancreaticca tramite risonanza magnetica e bioluminescenza .....	40
5.1.2 Magnetosomi estratti da <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> utilizzati come agenti teranostici in un modello sperimentale di glioblastoma.....	41
5.1.3 La pressione negativa di un espansore interno a spirale genera nuovo tessuto adiposo sottocutaneo in un modello animale in vivo .....	42
5.1.4 Valutazione in vivo dell'attività antiangiogenica di SU6668 in un modello sperimentale di carcinoma del colon .....	43
5.2 Risultati .....	44

6. Discussione e conclusioni .....	56
7. Bibliografia .....	59
8. Webgrafia.....	67



## 1. Introduzione

Ogni anno, in tutta Europa, vengono utilizzati all'incirca 10 milioni di animali nei laboratori di ricerca, per l'Italia il dato è circa 550.000 per ogni anno ([www.salute.gov.it](http://www.salute.gov.it)). Il progresso medico e scientifico deve molto all'utilizzo di questi animali, tuttavia con il passare degli anni, in Europa, si sta cercando di ridurre sempre più il numero di animali utilizzati nella sperimentazione. Questo perché è aumentata la consapevolezza e l'intenzione di tutelare il benessere di topi, di ratti e di tutti gli animali utilizzati a scopo scientifico. Ne è un esempio il Decreto legislativo 4 Marzo 2014, n.26 come attuazione della Direttiva n. 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici, il quale inoltre definisce i compiti dell'OPBA (Organismo preposto al benessere degli animali). Ma già nel 1959 il benessere degli animali utilizzati per la sperimentazione era un punto importante. Infatti, in questo anno, dagli accademici britannici Burch e Russel fu introdotto il principio delle 3R, ripreso nella direttiva 2010/63/UE. Questo principio riassume in tre semplici parole tutte quelle attività necessarie per migliorare il benessere degli animali da laboratorio, le quali sono "Refinement", "Replace" e "Reduction". Dopo un breve riassunto di questi tre importanti concetti mi sembra opportuno soffermarmi sull'importanza di quella che è la "Reduction", prendendo in considerazione le varie tecniche diagnostiche di imaging che ne implementano il suo sviluppo. Con il termine "Reduction" si fa riferimento alla riduzione del numero di soggetti utilizzati in un determinato protocollo sperimentale, tale da ottenere comunque una quantità di dati numericamente significativi e di sufficiente precisione. È infatti possibile, tramite alcune informazioni come gli effetti di una certa manipolazione sperimentale e il grado di variazione estranea all'esperimento che può influenzare i risultati ottenuti, calcolare con precisione il numero di soggetti sperimentali necessari all'ottenimento di risultati significativi. Durante un determinato protocollo sperimentale, per esempio in uno studio riguardante lo sviluppo di una massa tumorale, potrebbe essere necessario sopprimere l'animale per valutare questa massa in differenti stadi di sviluppo. Per evitarlo, sarebbe ideale poter visualizzare i tessuti e gli organi interni dell'animale vivo senza ricorrere alla soppressione, ed è proprio qui che entrano in gioco le molteplici tecnologie di imaging a nostra disposizione. La TC (tomografia computerizzata), è una tecnica diagnostica che genera immagini tridimensionali, basate su raggi x. In seguito, abbiamo la PET (tomografia

ad emissione di positroni), tecnica diagnostica di medicina nucleare che comporta la somministrazione EV di una sostanza normalmente presente nell'organismo (glucosio nella maggior parte dei casi), la quale è marcata con una molecola radioattiva. Il tomografo PET rileva la distribuzione di queste sostanze e poiché i tumori sono particolarmente avidi di glucosio risulta utile nell'individuare un tumore. La BLI (bioluminescenza) è una tecnica di imaging molecolare che consente lo studio dei processi biologici in corso in vivo. Questa forma di imaging ottico facilita l'analisi in tempo reale dei processi patologici a livello molecolare, basandosi sul rilevamento sensibile della bioluminescenza prodotta grazie alla luciferasi. È una tecnica semplice da eseguire e consente il monitoraggio durante tutto il corso della malattia, consentendo la localizzazione e la quantificazione dei processi biologici senza sopprimere l'animale da sperimentazione. L'ecografia viene generalmente usata in sperimentazione per valutare e studiare le funzioni cardiache, è una tecnica che si basa su ultrasuoni ad alta frequenza per creare immagini in tempo reale degli organi interni. Ultima ma non per importanza è la MRI (imaging a risonanza magnetica) la quale produce immagini di tipo tomografico digitale utilizzando campi magnetici e radiofrequenze, basandosi sulla ricezione e successiva elaborazione di segnali provenienti dai protoni d'idrogeno presenti in grande quantità nell'organismo. Queste tecniche di imaging sopra citate risultano essere molto importanti e utili per quanto concerne l'obiettivo "Reduction" nei vari protocolli sperimentali, in quanto negli ultimi anni ha acquisito sempre più importanza la salvaguardia delle vite degli animali da sperimentazione. Tra queste tecniche di egual importanza, mi sembra doveroso soffermarsi sulla MRI, sulle rispettive tecniche e sulla sua utilità in campo sperimentazione. Grazie alla collaborazione con l'Università degli Studi di Verona è stato possibile conoscere il macchinario per risonanza magnetica utilizzato per i loro studi di sperimentazione. Inoltre, ho potuto confrontarmi con il personale di laboratorio capendo l'importanza e l'utilità di questa tecnica di imaging. Tra le varie tecniche di risonanza magnetica utilizzate a Verona sono presenti, il neuroimaging, la risonanza magnetica funzionale, la spettroscopica, il tensore di diffusione e infine l'angioMR o angiografia a risonanza magnetica. Grazie alla MRI e alle rispettive tecniche è possibile utilizzare un minor numero di animali da laboratorio, portandoli fino alla fine dell'esperimento e valutando sempre sullo stesso animale l'evoluzione di una determinata patologia o effetto di un farmaco.

## **2. Principio delle 3R: Replacement, Refinement, Reduction**

Con il passare degli anni l'utilizzo degli animali da sperimentazione ha acquisito sempre più importanza, in particolar modo riguardo le preoccupazioni etiche e la gestione del benessere animale. Nel 1959 Rex Burch e William Russell, come membri della UFAW (University Federation of Animal Welfare), associazione ancora molto attiva nel salvaguardare il benessere animale, pubblicarono un libro intitolato "The principles of humane experimental technique". Con questo libro vollero esortare i ricercatori a seguire una sperimentazione animale più attenta al benessere degli animali da laboratorio, introducendo così le 3R. Il "Principio delle 3R" fa riferimento a tre fondamentali concetti metodologici: rimpiazzare ("Replacement"), rifinire ("Refinement") e ridurre ("Reduction"). Secondo Russel e Burch, qualsiasi procedura è da considerarsi alternativa se è volta verso: la sostituzione di una determinata procedura con un'altra che possa provocare minor stress agli animali ("replacement"); quando questo non è possibile, la riduzione del numero di animali richiesti ("reduction"); e se anche questo non possibile, migliorare la procedura al fine di ottimizzare il benessere animale durante la stessa ("refinement"). Il "Replacement" viene inoltre distinto in assoluto, dove gli animali non vengono minimamente usati, e in relativo, l'animale viene usato per un determinato scopo (es. prelievo di un organo o tessuto) per poi essere soppresso. Ad oggi questo principio è ampiamente diffuso ed è incluso in linee guida e normative, tuttavia c'è ancora molto lavoro da fare per quanto riguarda la sua messa in pratica, come, validare nuovi metodi alternativi per rimpiazzare gli animali (es. colture cellulari in vitro), migliorare i protocolli sperimentali eliminando tutte quelle attività che compromettono il benessere animale e ridurre il numero di animali utilizzati sfruttando la tecnologia a nostra disposizione (es. tecniche diagnostiche di imaging).

### **2.1 Replacement**

Rimpiazzare indica la possibilità di sostituire il modello animale con un modello alternativo (computazionale, cellulare, organoidi, tessuti ingegnerizzati e studi volontari su umani). Con la definizione originale del termine, Russell e Burch, intendevano l'utilizzo

di materiale “non senziente” al posto dei modelli animali. I due autori infatti, in “The principles of humane experimental technique”, descrissero diversi metodi alternativi, tra questi per esempio l’utilizzo di piante, micro-organismi, sistemi chimici e fisici non viventi. Tuttavia, col passare degli anni questo concetto si è evoluto, acquisendo diversi aspetti. Oggi, infatti, si differenzia tra “partial replacement” e “absolute replacement”, concetti in realtà già indicati da Russell e Burch nel libro del 1959.

Secondo il concetto di “partial replacement”, il modello animale dovrebbe essere sostituito da un modello rappresentato da una specie caratterizzata da una minor complessità del sistema nervoso, per esempio un topo al posto di una scimmia, un pesce per un topo, un invertebrato al posto di un pesce, ecc. Il rimpiazzo parziale comprende anche la possibilità che il modello animale venga sostituito da un modello non animale, dopo alcuni step iniziali del protocollo sperimentale. Secondo l’“absolute replacement” invece, il modello animale deve essere completamente eliminato dal protocollo sperimentale. Tuttavia, questo principio genera un elevato numero di complessità riguardanti l’alternativa all’esperimento animale. Questa, deve garantire di poter ottenere gli stessi risultati che si otterrebbero con il modello animale. Quindi l’utilizzo o meno di un modello alternativo dovrebbe sempre preservare la scientificità dell’esperimento originario e il suo specifico fine.

## **2.2 Refinement**

Secondo Russel e Burch rifinire i protocolli sperimentali voleva dire non solo occuparsi del benessere animale durante un esperimento, ma soprattutto migliorare la qualità di vita di un individuo durante tutte le procedure che accompagnano la vita di un animale in cattività. Con il passare degli anni anche questo principio si è evoluto, nel 2005 fu introdotta una nuova definizione di Refinement “Any approach which avoids, alleviates or minimises the actual or potential pain, distress and other adverse effects suffered at any time during the life of the animals involved, or which enhances their well-being as far as possible”. Questa definizione fa riferimento a uno sforzo necessario per il miglioramento dello stato di benessere dell’animale sperimentale, dove benessere non è semplicemente assenza di malessere. Infatti, questa definizione è stata adottata dal testo della Direttiva

2010/63/EU. Ne è un esempio l'uso del rinforzo positivo dove tramite la somministrazione di premi, in genere alimentari, vengono ridotti i casi dove l'animale deve essere forzato a partecipare a un certo protocollo sperimentale. Un altro esempio è rappresentato dall'arricchimento ambientale, esplicitamente indicato nella Direttiva europea 2010/63, metodo efficace per stimolare la manifestazione dei comportamenti che sono inerenti all'etologia della specie utilizzata. È molto importante che l'arricchimento ambientale venga tarato su ogni singola situazione per garantirne la sua efficacia, ma deve essere fatta attenzione nel non creare condizioni ambientali troppo diverse per non andare ad intaccare quella che è la ripetibilità dei dati. Purtroppo, non sempre è possibile favorire le esigenze degli animali da laboratorio e spesso si deve trovare un equilibrio tra validità del dato scientifico e benessere degli animali utilizzati. Molto importante per misurare l'efficacia dell'arricchimento ambientale è valutarne il suo utilizzo, maggiore è il lavoro compiuto e maggiore ne sarà il beneficio tratto da parte dell'animale.

### **2.3 Reduction**

Con il termine "Reduction" ci si riferisce precisamente all'introduzione di metodi che riducono al minimo il numero di animali utilizzati per esperimento o studio, coerente con gli obiettivi scientifici per garantire risultati robusti e riproducibili. Russell e Burch sostenevano fermamente la riduzione degli animali utilizzati, tuttavia doveva essere tale da ottenere una quantità di dati numericamente significativi e di sufficiente precisione. Fin dal 1959 i due autori evidenziavano quanto fosse importante che il numero di soggetti inferiore non potesse determinare un'inefficace potenza statistica. Mediante uno studio pilota si possono evidenziare il numero di variabili estranee a un determinato protocollo sperimentale che influenzano la validità del risultato e tramite queste è possibile calcolare con precisione il numero di individui necessari per ottenere risultati significativi in quel particolare protocollo. Arrivati a questo punto risulta evidente quanto sia importante diminuire il numero degli animali da laboratorio utilizzati, per questo motivo nel corso degli anni si sono sviluppati diversi metodi per raggiungere questo obiettivo. Un modo per ridurre il numero di soggetti sperimentali utilizzati dai diversi laboratori, è quello di

accordarsi a livello internazionale sulle metodologie utilizzate nei vari protocolli sperimentali. Facendo ciò, verrebbe ridotta di molto la probabilità di ripetere gli stessi test in paesi differenti. Quindi il concetto di “Reduction” si evolve, applicabile non solo a livello del singolo esperimento ma anche a livelli più elevati. A questo proposito, si distinguono un livello intra-sperimentale, uno sovra-sperimentale e uno extra-sperimentale:

1. Riduzione intra-sperimentale: si intende la riduzione del numero di animali all'interno di un singolo esperimento, o dei singoli protocolli all'interno di un esperimento più articolato. In questo caso la riduzione può avvenire migliorando il disegno statistico, eseguendo studi pilota, mediante un'analisi retrospettiva di dati ottenuti in precedenza e calcolando il numero di soggetti strettamente necessario.
2. Riduzione sovra-sperimentale: la riduzione si attua cambiando il modo più generale di fare ricerca, investendo sui corsi di aggiornamento per il personale addetto all'applicazione del principio delle 3R, ai metodi statistici e sui vari tipi di disegni sperimentali. Inoltre, è fondamentale l'intervento dei comitati etici e la possibilità di interazione tra differenti gruppi di ricerca con la possibilità di scambio di informazioni.
3. Riduzione extra-sperimentale: ottenuta tramite l'evoluzione della pratica sperimentale a livello europeo ma anche mondiale, armonizzando le regole sperimentali tra i vari paesi (De Boo & Hendriksen, 2005).

Negli ultimi decenni l'applicazione delle tecnologie di Imaging in campo sperimentale ha dimostrato e sta dimostrando di essere molto importante per implementare la riduzione degli individui sperimentali utilizzati. Durante tutte queste procedure l'animale viene anestetizzato affinché non si muova e non soffra, al termine dell'esame l'animale viene attentamente monitorato e quindi riportato al suo box con gli altri animali. Alcuni esempi di queste tecnologie di imaging includono la risonanza magnetica (MRI), la tomografia a emissione di positroni (PET), la bioluminescenza (BLI), l'ecografia e la tomografia computerizzata (TC). Queste tecniche ci consentono di osservare i tessuti e gli organi interni degli animali da sperimentazione, valutando come reagiscono a una determinata patologia o come evolvono in seguito alla somministrazione di nuovi farmaci. Grazie all'imaging, si riescono ad ottenere informazioni più dettagliate da un singolo animale,

migliorando la qualità degli studi di ricerca, ma non solo, anche il benessere di questi animali migliora. Con l'introduzione dell'imaging risulta più semplice evidenziare anche un minimo indice di sofferenza rendendo possibile una migliore e più rapida assistenza. Infatti, se l'imaging non fosse stato introdotto, ad ogni step di un determinato protocollo sperimentale un numero preciso di animali verrebbe soppresso, consentendo di valutare la progressione di una patologia o l'efficacia di un nuovo farmaco. L'imaging ha drasticamente migliorato la qualità degli studi sugli animali ed è un traguardo importante nella riduzione del numero di animali impiegati nella ricerca scientifica, ma non solo, questa, favorisce direttamente anche il benessere dell'animale (grazie all'utilizzo di tecniche non invasive che riducono lo stress sull'animale e permettono di individuare precocemente per es. masse che comprimono altri organi che possono causare disagio nell'animale).

## **2.4 Interazioni tra le 3R**

I tre fondamenti introdotti da Russell e Burch non possono essere considerati separatamente, infatti non sono indipendenti tra loro ma interagiscono, sia in maniera positiva che negativa. Molteplici sono le situazioni nelle quali l'applicazione di una delle tre R può favorire una o due altre R. Per esempio l'introduzione di programmi educativi e specie-specifici per personale addetto alla gestione degli animali da laboratorio, può portare a un miglioramento della cura di questi ultimi e a una maggiore consapevolezza nell'individuare problemi legati al benessere (concetto "Refinement"). Da questo, ne deriva una riduzione della variabilità dei risultati sperimentali ottenuti, dovuta agli effetti stressanti della manipolazione degli animali e quindi dall'esperimento stesso. Il decremento della variabilità dei risultati porta a una minor richiesta di soggetti sperimentali necessari a raggiungere un risultato scientifico significativo (concetto "Reduction"). In questo caso in contemporanea si sono ottimizzate le condizioni di benessere e si è ridotto il numero di soggetti sperimentali utili all'ottenimento di dati scientificamente attendibili. Ne è un altro esempio, la sostituzione di animali aventi un complesso sviluppo neurofisiologico con altri meno sviluppati. Un topo potrebbe rimpiazzare una scimmia in quanto il SNC è meno sviluppato, tuttavia sarebbe più

opportuno utilizzare organismi ancora meno evoluti, come invertebrati oppure organismi unicellulari. Rappresenta quindi una strategia di miglioramento delle tecniche sperimentali per ridurre il grado di sofferenza degli individui utilizzati (“Replacement” e “Refinement”). Infine, l’armonizzazione a livello globale dei protocolli sperimentali può stabilire un’importante riduzione dei singoli esperimenti svolti nei diversi paesi. Di conseguenza si ridurranno complessivamente anche il numero di animali sperimentali utilizzati in suddetti test. Inoltre, il confronto tra i diversi paesi porta all’individuazione di test obsoleti che verranno sostituiti da tecniche avanzate (“Refinement” e “Reduction”). Tuttavia, sono presenti anche alcuni casi nei quali le 3R entrano in conflitto. Questo succede quando si devono convalidare nuovi metodi alternativi, dove è necessario comparare il nuovo metodo con quello corrispondente e tradizionale. Ciò rappresenta un conflitto tra “Replacement” e “Reduction”.



### **3. Tecniche di Imaging diagnostico volte a favorire la Reduction**

Le tecnologie di imaging non invasive e non dolorose, come quelle che utilizzano i raggi x, gli ultrasuoni o i campi magnetici, permettono ai ricercatori di osservare lo scheletro degli animali da sperimentazione, le loro funzioni cerebrali, il loro cuore pulsante e gli altri organi interni, tutto questo con l'animale in vita. Quindi, senza ricorrere alla soppressione, è possibile studiare come l'organismo dell'animale reagisce allo sviluppo di una patologia e come risponde alle cure in tempo reale. L'imaging è ampiamente utilizzato nella ricerca sugli animali attraverso l'utilizzo di attrezzature adattate alle dimensioni di topi e ratti. Durante le diverse procedure gli animali vengono completamente sedati per evitare che si muovano e che si spaventino in quanto vengono collocati in un ambiente non conosciuto per essere sottoposti ad imaging. La possibilità di visualizzare la struttura interna e la funzione degli organi interni permette ai ricercatori di ottenere informazioni più dettagliate da un singolo animale, migliorando la qualità dei loro studi di sperimentazione. È un traguardo importante nella riduzione del numero di animali impiegati nella ricerca, soprattutto per il fatto che queste tecnologie aiutano a comprendere meglio la fisiologia dell'organismo animale. Di conseguenza risulterà più chiaro come le funzioni dell'organismo degli animali utilizzati possono essere influenzate dalle procedure sperimentali alle quali sono sottoposti. In definitiva l'imaging favorisce il benessere dell'animale e riduce il numero di animali necessari alla sperimentazione sia perché permette una longitudinalità degli studi, ovvero l'utilizzo di uno stesso animale in tempi diversi ("Reduction") sia perché diminuisce le variabili sperimentali.

#### **3.1 Tomografia computerizzata (TC)**

Uno dei metodi di imaging più utilizzati nel campo della sperimentazione animale è chiamato tomografia computerizzata. La TC è una tecnica molto avanzata che si avvale dell'effetto delle radiazioni ionizzanti (raggi X) sui tessuti, esattamente come avviene per la radiologia classica. Essa consente di esaminare diversi parti del corpo (encefalo, polmone, fegato, pancreas, reni, utero, vasi arteriosi e venosi, muscoli, ossa e articolazioni). I ricercatori possono quindi sottoporre il soggetto sperimentale a questa

tecnica per valutare i diversi organi e la reazione di questi ad una determinata patologia. La TC è quindi un esame radiologico che prevede la raccolta di dati relativi al passaggio di vari fasci di raggi X nell'area interessata e la loro rielaborazione da parte di un computer, che grazie all'impiego di un software dedicato è in grado di ricostruire i diversi tipi di tessuto analizzati in un'immagine tridimensionale. La TC fornisce una migliore differenziazione tra varie densità dei tessuti molli rispetto alla radiologia convenzionale, viene quindi preferita a quest'ultima perché fornisce molte informazioni riguardanti le strutture endocraniche, della testa, del collo, spinali, toraciche e addominali. In sperimentazione animale è molto comune l'utilizzo delle micro-TC, più adatte alle dimensioni delle specie utilizzate nei protocolli sperimentali (Hao Li et al., 2008). Come supplemento a questa tecnica si può eseguire l'esame tomografico somministrando un mezzo di contrasto. Il mezzo di contrasto (m.d.c.) è un fluido radio-opaco che viene inoculato all'animale per via endovenosa. Dal momento del suo ingresso nel circolo sanguigno, il m.d.c. si diffonde nell'organismo e, una volta raggiunto l'organo o il distretto interessato, ne consente una migliore visualizzazione aumentando il contrasto con le strutture circostanti. In questo modo è possibile evidenziare con maggiore dettaglio la morfologia dell'organo e gli eventuali processi patologici in corso grazie alla cattura di immagini più nitide. L'impiego del mezzo di contrasto è richiesto soprattutto per le indagini a carico degli organi addominali e toracici ma può essere indicato anche per lo studio dell'apparato muscolo-scheletrico. Importanti applicazioni moderne per la micro-TC con mezzo di contrasto includono l'imaging del sistema vascolare, del cuore, dell'addome e dei tumori. Attualmente, i mezzi di contrasto iodati sono disponibili per vari scopi di imaging preclinico. Nel campo della sperimentazione animale negli ultimi anni sono stati sviluppati agenti di contrasto basati su nanoparticelle metalliche. Queste nanoparticelle producono un maggior potenziamento della TC rispetto agli agenti di contrasto iodati, possedendo eccellenti proprietà di assorbimento dei raggi X. La natura non invasiva della TC aggiunge efficienza agli studi longitudinali in vivo poiché è possibile condurre molteplici spot temporali su singoli gruppi, riducendo così l'uso di animali ed evitando procedure sperimentali che richiedono più tempo. Con questa tecnica i tessuti come il polmone, il tessuto adiposo e il cervello possono essere facilmente visualizzati (Ashton et al., 2015). Malattie delle vie aeree tra cui tumore, enfisema e fibrosi sono state rilevate e descritte nei topi utilizzando la TC. Altri tessuti invece si affidano all'ausilio di

agenti di contrasto per consentirne la visualizzazione, come il sistema vascolare, il fegato, il sistema renale e il tratto gastrointestinale (Wathen CA et al., 2013). Durante l'esecuzione dell'esame tomografico l'animale non prova alcun dolore, in ogni caso si rende sempre necessario mantenerlo in anestesia. Nonostante la rapidità di esecuzione, per ottenere immagini diagnostiche è necessaria la completa immobilità del paziente e un corretto posizionamento, impossibile quando il soggetto è cosciente. Grazie all'impiego dell'anestesia gassosa e ai tempi di anestesia brevi, i rischi generici per un individuo sperimentale sono minimi.

### **3.2 Bioluminescenza (BLI)**

Negli ultimi anni la Bioluminescenza in vivo (BLI) viene sempre più utilizzata come tecnica per la moderna ricerca biologica, a causa del suo basso costo, dell'elevata produttività e della relativa facilità di visualizzazione di un'ampia varietà di eventi cellulari. Questa tecnica prevede l'analisi non invasiva di animali vivi utilizzando come punto di riferimento la luce emessa da cellule bioreporter che esprimono luciferasi. L'imaging bioluminescente permette ai ricercatori di evitare il sacrificio dei soggetti da sperimentazione nelle diverse fasi del protocollo sperimentale, inoltre la capacità di monitorare continuamente un singolo individuo diminuisce la quantità di variazione tra animali, riducendo gli errori e portando a un risultato più significativo. La BLI viene applicata per studiare un'ampia gamma di funzioni biomolecolari come la funzione genetica, la scoperta e lo sviluppo di farmaci, la genesi dei tumori, la loro progressione e il loro trattamento (Close et al., 2011). La bioluminescenza si riferisce alla generazione enzimatica della luce visibile da parte degli organismi viventi (comprese specie di batteri, funghi, creature marine e insetti). In natura, i geni della luciferasi codificano per proteine che agiscono su diversi substrati tra cui la D-luciferina per la luciferasi della lucciola (FLuc), la celenterazina per la luciferasi di *Renilla reniformis* (RLuc), mentre la luciferasi batterica (Lux) non richiede la presenza di un substrato. Il più comunemente usato nella sperimentazione è il gene appartenente alla lucciola (FLuc). La luciferasi ossida la luciferina in presenza di ATP e ossigeno molecolare per formare ossi-luciferina eccitata elettronicamente. La luce visibile dal giallo-verde al giallo-arancione viene emessa in seguito al rilassamento dell'ossi-

luciferina eccitata al suo stato fondamentale (O'Neill et al., 2009). Il DNA che codifica per la proteina luminescente viene incorporato nell'animale da laboratorio tramite un vettore virale o creando un animale transgenico. Tutti gli approcci di imaging bioluminescente in vivo si basano sul rilevamento esterno di questa chemiluminescenza generata internamente consentendo quindi l'analisi non invasiva dei processi biologici all'interno dei soggetti da sperimentazione. La sensibilità di rilevamento della sorgente luminosa interna dipende da diversi fattori, tra cui il livello di espressione della luciferasi, la profondità delle cellule marcate all'interno del corpo (distanza che i fotoni devono percorrere attraverso i tessuti) e la sensibilità del sistema di rilevamento (Sadikot & Blackwell, 2005). I fotoni vengono rilevati da telecamere specializzate che li convertono in elettroni generando un'immagine bioluminescente. Con il passare degli anni sono state sviluppate telecamere sempre più sensibili e in grado di acquisire immagini in tempo reale di soggetti coscienti e in movimento. Tuttavia, il principale svantaggio dei sistemi di imaging di bioluminescenza in vivo è la sua limitata penetrazione in profondità all'interno del tessuto, che è all'incirca 1-2 cm. Le proteine bioluminescenti richiedono l'iniezione di un substrato per produrre un segnale bioluminescente e solo dopo l'ossidazione di uno di questi composti il segnale luminoso viene prodotto, tuttavia il metodo di iniezione può avere effetti influenti sull'emissione del segnale luminescente. L'iniezione può essere intraperitoneale, intravenosa o sottocutanea (Close et al., 2011).

1. Iniezione intraperitoneale: opzione interessante per la maggior parte dei ricercatori, tuttavia, seguendo questa via di iniezione il substrato deve essere assorbito attraverso il peritoneo per raggiungere le cellule che esprimono il bersaglio. Qualsiasi variazione nel tasso di assorbimento può portare a variazioni nel segnale luminescente risultante, rendendo difficile la riproducibilità dei risultati.
2. Iniezione intravenosa: con questa via di somministrazione il substrato si diffonde rapidamente in tutto il soggetto, ma il segnale luminescente risultante ha una durata molto più breve di quella osservata utilizzando vie alternative.
3. Iniezione sottocutanea: può essere utilizzata in alternativa alla via intraperitoneale, provoca un danno minimo al sito di iniezione e può fornire ai ricercatori segnali bioluminescenti equivalenti al sito intraperitoneale.

La BLI su animali da sperimentazione è diventata una tecnica preziosa per il monitoraggio non invasivo, la quale oltre a permettere un'efficiente sviluppo della "Reduction", ha prodotto contributi di inestimabile valore nel campo scientifico. La maggior parte degli esperimenti BLI sfruttano le proteine luciferasi FLuc o RLuc, che se utilizzate insieme a tecnologie di imaging alternative, possono fornire set di dati estremamente completi e sofisticati, ma soprattutto aiutare nella riduzione del numero di animali utilizzati, evitando la loro soppressione.

### **3.3 Tomografia a emissione di positroni (PET)**

L'imaging preclinico è diventato un pilastro per tutti i campi della ricerca biologica e un punto centrale per la maggior parte della ricerca sui tumori. Queste tecnologie di imaging permettono ai ricercatori di analizzare internamente l'organismo dei loro animali, osservando longitudinalmente la progressione della malattia. La PET fa parte di queste tecniche di imaging e come tutte possiede i suoi punti di forza. Applicata alla sperimentazione animale i suoi punti di forza sono le sue capacità di imaging quantitativo, la sua capacità di tracciare processi funzionali/biochimici all'interno del corpo dell'animale, la sua capacità di ottenere immagini utili con concentrazioni solo da nano a pico molar dei composti somministrati e la possibilità di studiare gli animali in serie nel tempo, evitando la loro soppressione (Miyaoaka & Lehnert, 2020). La tomografia ad emissione di positroni è una tecnologia di imaging funzionale non invasiva e altamente sensibile. Rilevando raggi gamma emessi da un tracciante immesso nell'organismo, marcato con radioisotopi, è possibile ricostruire immagini tridimensionali per mostrare la posizione e la concentrazione del tracciante corrispondente alle bio-attività. Può essere utilizzata per monitorare la perfusione, il tasso metabolico, l'espressione genica, l'espressione proteica e molte altre attività. L'importante influenza dell'imaging PET nell'uso preclinico ha motivato i ricercatori a sviluppare una versione miniaturizzata chiamata micro-PET, ottimale per le dimensioni dei piccoli modelli animali, come topi e ratti. Gli scanner micro-PET hanno svolto e svolgono tuttora un ruolo cruciale nella biologia, nella ricerca scientifica e nello sviluppo di farmaci. Hanno permesso ai ricercatori di seguire di pari passo il principio delle 3R, ottimizzando la riduzione del numero di

animali utilizzati in sperimentazione. Attualmente, la PET è ampiamente utilizzata per studi preclinici per lo sviluppo di farmaci e la caratterizzazione di modelli di malattie cardiovascolari, neurologiche e oncologiche (Ma & Cheng, 2020). Questa tecnica si basa sulla somministrazione di radiofarmaci, caratterizzati dall'emissione di particelle chiamate positroni. Il radiofarmaco è composto da una molecola che mappa il processo patologico di interesse e da un atomo radioattivo che emette positroni, a breve emivita. Il radiofarmaco quindi, "illumina" le cellule a cui si lega, evidenziando così la presenza di eventuali patologie e permettendo una loro completa e precisa caratterizzazione. Ciascuno dei farmaci utilizzati per la PET è composto da specifiche molecole che vengono riconosciute solamente da tessuti interessati dall'analisi. Negli ultimi anni sono stati sintetizzati e sviluppati molti tipi di traccianti. Tra i più importanti il  $^{18}\text{F}$ -FDG (analogo del glucosio marcato con  $^{18}\text{F}$ , ossia fluoro) in grado di monitorare il metabolismo del glucosio, il quale ha svolto un ruolo di fondamentale importanza negli studi preclinici, in particolare nello studio dei tumori. Grazie anche all'introduzione delle nanoparticelle in questo campo, i radiofarmaci sono in continuo aumento, implicati nell'evidenziare processi biologici come l'angiogenesi, la proliferazione cellulare, l'apoptosi e la senescenza (Ma & Cheng, 2020 – Cherry & Gambhir, 2001). L'imaging PET può quindi studiare quantitativamente e funzionalmente i processi biochimici. Le scansioni sono in grado di evidenziare patologie in anticipo e di monitorarne il progresso misurando i cambiamenti nell'assorbimento del radiotracciante. Grazie all'imaging di specifici recettori, questa tecnica è un'alternativa alla biopsia per la stima del livello di espressione di importanti biomarkers in vivo. Questa tecnologia verrà coinvolta in sempre più nuove applicazioni biologiche, ne sono un esempio le integrazioni di sistemi di imaging multimodali: PET/TC, PET/MRI, PET/ottico e PET/SPECT (Miyaoaka & Lehnert, 2020 – Vaquero & Kinahan, 2015).

1. PET/TC: la combinazione di queste due tecniche di imaging permette di ottenere informazioni più precise, individuando un'attività metabolica anomala e correlandola a specifiche informazioni anatomiche. Sebbene siano diventate sempre più integrate tra loro, le immagini PET e TC vengono acquisite in sequenza e non simultaneamente. Ciò porta a discrepanze tra le immagini prodotte dovute a leggeri movimenti degli animali tra le scansioni.
2. PET/MRI: l'acquisizione in simultanea di questa tecnologia offre un prezioso guadagno in termini di accuratezza della coregistrazione delle due immagini,

soprattutto quando il movimento del soggetto non è trascurabile. Infatti, la PET/MRI offre le più dettagliate immagini dell'interno del corpo attualmente disponibili.

3. PET/ottico: sono stati studiati sistemi che combinano PET con bioluminescenza e con fluorescenza. Tuttavia, le informazioni che forniscono sono simili e non complementari come per la PET/TC e per la PET/MRI.
4. PET/SPECT: questa tipologia di imaging detta multitracciante, permette la presenza simultanea di più radiotraccianti, consentendo di acquisire immagini di più processi fisiologici nello stesso soggetto, in un breve lasso di tempo. Inoltre la PET/SPECT può essere ulteriormente combinata con la CT permettendo la localizzazione precisa di questi radiofarmaci.

Dai vantaggi sopra descritti, la PET dovrebbe essere in grado di espandersi in modo significativo in futuro, dando nuove opportunità nel campo della sperimentazione e facilitando la riduzione al minimo del numero di animali utilizzati.

### **3.4 Ecografia**

L'imaging ecografico è una tecnica ormai consolidata che fornisce informazioni anatomiche e fisiologiche in tempo reale negli organismi viventi. La mancanza di radiazioni ionizzanti e i relativi bassi costi di acquisto e manutenzione ne fanno una delle tecniche di imaging più frequentemente utilizzate nel campo della medicina. Fino a 20 anni fa in realtà, la conversione delle pratiche cliniche ecografiche in applicazioni precliniche rappresentava una sfida tecnologica significativa a causa delle dimensioni ridotte e della rapida frequenza cardiaca del topo (400-600bpm), richiedendo un aumento della risoluzione spaziale per ottenere informazioni significative. Grazie alle innovazioni tecnologiche queste sfide sono state superate e i nuovi ecografi hanno consentito di intraprendere studi longitudinali sulla progressione delle patologie nei piccoli modelli animali. Ratti, topi e pesci possono ora essere scansionati con risoluzioni fino a 30 micron e con una risoluzione temporale sufficiente per consentire l'identificazione di anomalie organiche (cardiache, renali, epatiche, uterine...). Inoltre, tramite la funzione Doppler può essere misurato il flusso sanguigno all'interno delle

camere cardiache, dei vasi renali, epatici ed uterini. Negli studi di ricerca la scelta della frequenza del trasduttore è importante, per l'imaging preclinico vengono generalmente utilizzate frequenze comprese tra 20 e 55 MHz, con 15-20 MHz per ratti adulti (profondità dell'immagine 3-4cm), 30-40 MHz per topi adulti (profondità dell'immagine 10-20mm) e frequenze più elevate per studi su topi neonati e imaging di zebrafish. Per la scansione ecografica preclinica il trasduttore è montato in un portasonda che permette movimenti 3D orientando la sonda verso qualsiasi angolo desiderato ed evitando i minimi movimenti umani, i quali, comprometterebbero la qualità dell'acquisizione dell'immagine. Per quasi tutte le immagini ecografiche precliniche i modelli animali vengono anestetizzati. Prima della scansione avviene una tricotomia dell'area interessata e a causa della fragilità fisica dei modelli preclinici, durante la scansione il trasduttore non tocca l'animale ma esegue la scansione attraverso un sottile strato di gel tra la testa del trasduttore e la cute dell'animale. Esistono varie tecniche di imaging ecografico, la più comunemente utilizzata è la B-mode, dove le immagini in sezione 2D vengono visualizzate in tempo reale sullo schermo. Un'altra importante tecnica di imaging ecografico è la M-mode, utilizzato principalmente per studiare strutture in rapido movimento come quello della parete cardiaca. I dati della M-mode vengono visualizzati sullo schermo come una funzione continua del tempo che scorre sullo schermo con la profondità sull'asse y e il tempo sull'asse x. Inoltre, è possibile la misurazione del flusso sanguigno sui modelli animali tramite le tecniche Doppler. Tra queste il Doppler spettrale, il color Doppler (particolarmente utile per le applicazioni precliniche per la rapida localizzazione dei vasi) e il power Doppler (non dà informazioni direzionali sul flusso sanguigno ma è utile nel rilevamento di piccoli vasi contenenti un flusso sanguigno più lento). Tutte queste tecniche vengono quindi utilizzate nei molteplici studi preclinici in atto, permettendo di evitare la soppressione di un numero elevato di animali per valutare la progressione della malattia. L'imaging ecografico nel campo della sperimentazione possiede numerose applicazioni (Moran & Thomson, 2020).

1. Cardiache: il cuore è probabilmente l'organo più difficile da visualizzare all'interno del roditore a causa delle sue piccole dimensioni e del suo movimento rapido. Tuttavia i modelli di malattie cardiache e di infarto miocardico nei roditori forniscono preziose informazioni sui cambiamenti



anatomici e fisiologici cardiaci, fornendo opportunità per valutare nuovi approcci e interventi terapeutici.

2. Renali: entrambi i reni possono essere scansionati nel roditore tramite la B-mode. Con il color Doppler è possibile misurare il flusso sanguigno renale, ma la vascolarizzazione renale può essere studiata anche utilizzando mezzi di contrasto, iniettati attraverso la vena della coda.
3. Epatiche: utili per valutare i 4 lobi epatici dei roditori, la vena porta e l'arteria epatica. Importanti anche per la stadiazione della steatosi epatica non alcolica e la determinazione della fibrosi epatica.
4. Iniezioni guidate: l'ecografia viene utilizzata per guidare le iniezioni in aree specifiche. Inoltre, l'approccio mini-invasivo di indurre un'infezione uterina di un topo utilizzando iniezioni di lipopolisaccaride eco-guidato piuttosto che attraverso una mini-laparotomia, si allinea con i principi di "Reduction", "Replace" e "Refinement", che sono considerazioni centrali per la ricerca sugli animali.
5. Linfonodi: l'imaging ecografico è molto importante per individuare i linfonodi sentinella nei modelli di tumore.
6. Craniche: consente studi longitudinali sullo sviluppo cerebrale postnatale con immagini riguardanti la vascolarizzazione cerebrale e l'attivazione della corteccia.

L'imaging ecografico grazie alle sue caratteristiche è un elemento vitale all'interno di un laboratorio di imaging preclinico. La gamma di applicazioni precliniche per le quali l'imaging ecografico è in grado di fornire informazioni significative aumenterà nel prossimo decennio e diventeranno una tecnologia incorporata nei laboratori di sperimentazione.

### **3.5 Imaging a risonanza magnetica (MRI)**

L'utilizzo della risonanza magnetica su animali da laboratorio è aumentato vertiginosamente negli ultimi due decenni. Questa tecnica ha svolto un ruolo significativo

nella ricerca, fornendo approfondimenti importanti nelle neuroscienze, ma non solo. Essendo una tecnologia non invasiva e consentendo l'acquisizione delle stesse sequenze in diverse specie in vivo ha portato a un upgrade per quanto riguarda il concetto di "Reduction". Inizialmente gli animali da laboratorio erano importanti per lo sviluppo della tecnica MRI stessa ma da allora hanno fornito informazioni utili per le indagini precliniche e neuroscientifiche. Con il passare degli anni nuove tecniche sempre più potenti si sono sviluppate. Studi su specie di piccole dimensioni, come i roditori, hanno potuto beneficiare di sistemi MRI specializzati, con intensità di campo ultraelevata, offrendo una straordinaria risoluzione spaziale e potenza del segnale in vivo (Schaeffer et al., 2020). In particolare, la risonanza magnetica, utilizzata principalmente come strumento diagnostico nella ricerca preclinica, ha un'eccellente risoluzione anatomica, una profondità di penetrazione illimitata e un contrasto intrinseco dei tessuti molli. Grazie allo sviluppo tecnologico, la risonanza magnetica è in grado di fornire non solo informazioni anatomiche, ma anche funzionali, biofisiche e molecolari. La MRI è basata sui principi di risonanza magnetica nucleare, grazie ai quali misura l'assorbimento di radiazioni elettromagnetiche in molecole immerse in un forte campo magnetico, imposto da un grande magnete (Busato, 2016). Le immagini vengono generate grazie alle informazioni ricavate osservando il comportamento dei nuclei atomici. In particolare, poiché il corpo degli organismi viventi (ivi compresi gli animali da sperimentazione) è composto principalmente da acqua, la risonanza magnetica sfrutta l'abbondanza di atomi di idrogeno per produrre le immagini. Tutti i nuclei atomici sono costituiti da protoni e neutroni, alcuni, come l'H (idrogeno) o il P (fosforo), possiedono una proprietà detta "spin" (percepito come il nucleo che ruota attorno al proprio asse), questo gli permette di indurre un momento magnetico. In assenza di un campo magnetico esterno i momenti magnetici dei nuclei di H sono orientati casualmente. All'interno della RM il soggetto sperimentale viene sottoposto a un campo magnetico molto potente, il quale sortisce l'effetto fisico desiderato: gli atomi di H si allineano secondo il campo magnetico applicato ( $B_0$ ). Nella fase successiva, bobine a radiofrequenza investono il corpo dell'animale con un breve impulso, si tratta di un'azione mirata che modifica l'equilibrio con l'immissione di energia dall'esterno. Interrotto l'impulso a RF, gli spin tenderanno a tornare alla condizione di equilibrio, cedendo energia che può essere rilevata come segnale RM. La rilevanza del fenomeno sta nel fatto che sia il tempo impiegato per

ripristinare l'equilibrio (T di rilassamento) sia quello durante il quale viene emesso il segnale elettromagnetico sono caratteristici del nucleo ma anche del microambiente che lo circonda. Quindi, una volta cessato l'impulso RF si verifica un ripristino della magnetizzazione dei protoni secondo il campo magnetico B0 ed un loro ritorno ad un livello energetico basso. In ambedue i casi si parla di rilassamento durante il quale si generano degli impulsi misurabili tramite la bobina. Tale rilassamento avviene con due costanti di tempo distinte:

1. T1 o tempo di rilassamento longitudinale: indica il tempo necessario per recuperare il 63% della magnetizzazione longitudinale, ossia il progressivo aumento dei protoni che si orientano parallelamente a B0
2. T2 o tempo di rilassamento trasversale: indica il tempo richiesto alla magnetizzazione trasversale per decadere al 37% del valore iniziale, diverso a seconda del tipo di molecola

Algoritmi computerizzati analizzano questi segnali e producono immagini anatomiche dettagliate. Alcuni programmi informatici producono specifiche sequenze di impulsi che determinano come l'immagine è ottenuta e come appaiono i diversi tessuti per es. immagini pesate in T1 o T2. Inoltre, con la RM può essere usato un mezzo di contrasto per evidenziare strutture vascolari, infiammazioni e tumori. Gli agenti più comunemente usati sono derivati del gadolinio. Con queste tecniche, è quindi possibile effettuare studi sofisticati su sistemi viventi, ma soprattutto permettono una longitudinalità di questi, riducendo al minimo il numero di animali utilizzati per ogni esperimento. Gli animali da sperimentazione durante la procedura di risonanza magnetica vengono anestetizzati, tuttavia, negli ultimi anni sono stati condotti numerosi studi su metodi e applicazioni della risonanza magnetica nucleare in condizioni di veglia in diverse specie. Applicare studi di risonanza magnetica su animali svegli consente di approfondire la conoscenza della funzione cerebrale (Ferris, 2022). Una delle tecnologie più avanzate in questo ambito è la risonanza magnetica a campo elevato che, grazie alla maggiore risoluzione spaziale e spettrale, permette un più elevato rapporto tra segnale e rumore, garantendo una migliore caratterizzazione dei tessuti, sia dal punto di vista anatomico che patologico. Risulta quindi essere un promettente strumento per migliorare la ricerca, soprattutto per il monitoraggio di patologie in animali da sperimentazione. Nel corso degli anni si sono sviluppate molteplici tecniche avanzate di imaging, come la spettroscopia RM, la

risonanza magnetica funzionale e strutturale, l'angiMRI e la diffusion tensor imaging (DTI). Queste tecniche permettono ai ricercatori di migliorare la "Reduction", consentendo il rispetto del principio delle 3R.

## **4. MRI come principale strumento di Reduction e tecniche associate**

### **4.1 Neuroimaging strutturale**

Il neuroimaging è una disciplina scientifica di grande rilevanza nell'ambito delle neuroscienze. È una tecnica di imaging medico che consente di visualizzare e studiare il sistema nervoso centrale. Questo campo di ricerca si basa sull'utilizzo di varie tecniche di visualizzazione per ottenere immagini dettagliate del SNC in diverse condizioni, fornendo informazioni preziose sulla sua struttura e attività. Il neuroimaging è fondamentale per comprendere i meccanismi sottostanti a molte patologie neurologiche, nonché permette di approfondire la nostra conoscenza delle funzioni cerebrali, basandosi su modelli animali. L'MRI strutturale fornisce immagini ad alta risoluzione della morfologia cerebrale, fondamentali per la ricerca sulla neuroanatomia, permettendo di visualizzare anomalie strutturali e fornendo una mappa precisa della morfologia del cervello. In particolare, gli sviluppi nell'uso del contrasto MRI in immagini del cervello permettono di espandere l'uso della risonanza magnetica strutturale nel campo della ricerca neuroscientifica. Grazie a sistemi MRI a campi magnetici ultraelevati e attraverso meccanismi di contrasto migliorati, siamo in grado di visualizzare in modo non invasivo il cervello con dettagli senza precedenti. Il signal-to-noise ratio (SNR) aumentato e il contrasto potenziato consentono l'imaging anatomico e vascolare con una risoluzione più elevata, in grado di rilevare sottili anomalie anatomiche associate a un'ampia gamma di patologie neurologiche. Il signal-to-noise ratio funge da punto di riferimento per valutare l'efficacia di un sistema MRI. Infatti, un'immagine MRI non è creata da puri segnali di risonanza magnetica, ma da una combinazione di questi con un inevitabile rumore di fondo. La presenza di questo "rumore" non permette una generazione ottimale dell'immagine. Il "rumore" nella risonanza magnetica deriva da due fonti principali: il movimento molecolare, dove le particelle cariche nell'organismo creano un "rumore" elettromagnetico e dalla resistenza elettrica, ossia resistenza delle bobine riceventi, dei cavi dati e dei componenti elettronici del sistema di misurazione (<https://mrimaster.com/snr/>). Sono, infatti, due i principali determinanti della qualità dell'immagine in risonanza magnetica, SNR e il contrasto, entrambi aumentano con l'intensità di campo, migliorando il rilevamento delle lesioni, la caratterizzazione di

queste, lo studio di una determinata patologia e chiarendo i meccanismi alla sua base. L'MRI strutturale fornisce informazioni quantitative e qualitative descrivendo la forma, la dimensione e l'integrità del cervello discriminando tra materia grigia e bianca. Il segnale di risonanza varia a seconda del tipo di tessuto, in questo caso la materia grigia contiene più corpi cellulari (ad esempio neuroni e cellule della glia) rispetto alla materia bianca, che è composta principalmente da fibre nervose (ad esempio assoni mielinizzati), insieme alle cellule gliali di supporto. Diverse sequenze di impulsi sono disponibili, le quali evidenziano differenti aspetti del tessuto cerebrale normale o patologico (<http://fmri.ucsd.edu/Howto/3T/structure.html>). Con il passare degli anni nuove sequenze di risonanza magnetica sono state sviluppate, permettendo ai ricercatori di studiare e caratterizzare in modo sempre più dettagliato l'anatomia e le patologie legate al SNC su modelli animali. Inoltre, questa continua innovazione ha permesso di implementare, dove prima non era possibile, studi preclinici longitudinali evitando la soppressione di un numero elevato di animali da sperimentazione. Risulta ora chiaro come la combinazione di imaging a RM strutturale, spettroscopica e funzionale ad alta risoluzione ha il potenziale per costituire un potente set di strumenti non invasivi utilizzabili nell'ambito della ricerca sperimentale, consentendo di ridurre il numero di animali utilizzati.

#### **4.2 Risonanza magnetica funzionale (fMRI)**

La risonanza magnetica funzionale, abbreviata fMRI, è una tecnica di imaging biomedico che consiste nell'uso di imaging a risonanza magnetica per valutare la funzionalità di un organo o apparato, in maniera complementare all'imaging morfologico. Sebbene risonanza magnetica funzionale sia una terminologia generica, ovvero applicabile a qualsiasi tecnica di imaging a RM che dia informazioni aggiuntive rispetto alla semplice anatomia (ad esempio imaging metabolico, quantificazione del flusso sanguigno, imaging dei movimenti cardiaci etc.), essa è spesso usata come sinonimo di risonanza magnetica funzionale neuronale, una delle tecniche di neuroimaging funzionale di sviluppo più recente. Questa tecnica è in grado di visualizzare la risposta emodinamica correlata all'attività neuronale del cervello in modelli animali. Il metodo fMRI più comunemente

utilizzato è basato sul contrasto BOLD (blood oxygen level dependent). Questo metodo di contrasto si basa sui cambiamenti nel contenuto di deossiemoglobina (dHb) all'interno dei vasi sanguigni, il quale agisce come un agente di contrasto paramagnetico endogeno. Cambiamenti nel contenuto locale di dHb a livello cerebrale portano ad alterazioni nell'intensità del segnale delle immagini di risonanza magnetica. Durante i periodi di attivazione neuronale, il flusso sanguigno cerebrale aumenta più della richiesta di ossigeno del cervello. Questo fenomeno provoca un aumento dell'ossiemoglobina e una diminuzione della deossiemoglobina, le quali possiedono proprietà magnetiche differenti, producendo il cosiddetto segnale BOLD. Sebbene il contrasto BOLD sia il più utilizzato per la fMRI, sono disponibili metodi alternativi che forniscono dati quantitativi misurando direttamente il volume sanguigno cerebrale (CBV) e le variazioni di flusso cerebrale (CBF). Il CBV può essere misurato attraverso l'uso di agenti di contrasto esogeni a base di ossido di ferro, somministrati per via endovenosa. L'ossido di ferro possiede proprietà superparamagnetiche, generando un forte contrasto che altera il segnale in relazione al CBV. Per quanto riguarda il CBF, può essere misurato in modo non invasivo con l'"Arterial Spin Labeling" (ASL), che utilizza impulsi a radiofrequenza per marcare magneticamente l'acqua del sangue, nelle arterie principali, come tracciante endogeno (Seong-Gi Kim, 2018). L'attività neurovascolare è influenzata dagli anestetici, modulando i singoli domini dell'unità neurovascolare e inibendo le reciproche interazioni. Trovare il miglior agente anestetico che influenzi minimamente l'attività neuronale e interferisca minimamente con l'accoppiamento neurovascolare è stata una ricerca attiva nel campo della fMRI animale. Ciascun agente ha i propri limiti e nessuno è ideale, tra questi l'isoflurano e l'alfa-cloralosio sono quelli più ampiamente applicati. Nonostante i progressi in questo campo, l'anestesia impone ancora importanti restrizioni nel rendere la fMRI una tecnica di imaging di routine. Questi metodi richiedono un monitoraggio fisiologico e anestetico dettagliato, inoltre l'anestesia altera l'attività neurale e quindi potrebbe alterare i risultati di imaging. A tal fine, è diventato sempre più comune eseguire l'imaging funzionale con l'animale sveglio. La fMRI eseguita su roditori svegli può essere facilmente ottenuta ed è una valida alternativa alla fMRI di soggetti anestetizzati, con grandi potenzialità nella ricerca sulle neuroscienze e sul neuroimaging. Inoltre, offre un'importante opportunità di miglioramento nell'applicazione del concetto delle 3R. Il continuo sviluppo di nuove tecniche di imaging all'avanguardia permette una sostanziale riduzione del numero di

animali utilizzati nelle fasi sperimentali (Choi et al., 2020 – Xifan Chen et al., 2019). Tuttavia, come citato prima, la fMRI non si applica solo al campo delle neuroscienze ma è molto utile anche per quanto riguarda lo studio della funzione e delle patologie renali, cardiache, placentari, polmonari ma non solo. Rispetto ad altre tecniche non invasive, la fMRI consente una valutazione multiparametrica della funzione renale. Molti studi hanno suggerito che questa tecnica consente di effettuare misurazioni accurate e non invasive delle funzioni renali negli animali da sperimentazione. L'ambito delle fMRI renale si estende oltre quello della fMRI cerebrale, poiché può far uso della maggior parte delle sequenze MRI non anatomiche, come BOLD, DTI, ASL e molte altre. La fMRI renale può essere applicata in molti aspetti della sperimentazione animale, ne sono un esempio gli studi preclinici di masse renali, di disfunzione renale (CDK), trapianto renale e molte altre nefropatie (Zhou JY et al., 2018 – Zöllner et al., 2014). Per quanto riguarda gli studi sul cuore, la fMRI cardiaca, effettuata su roditori, è uno strumento prezioso per la diagnosi e la prognosi di patologie cardiache. La fMRI cardiaca fornisce un'eccellente risoluzione spaziale e temporale ed è adatta per studi longitudinali, consentendo il rispetto per il concetto "Reduction". Questa tecnologia consente di valutare l'entità dell'infarto miocardico, del rimodellamento, della perfusione e dell'edema (Ku et al., 2018 – Meßner et al., 2014). I recenti progressi negli studi di fMRI sulla funzione placentare su modelli animali hanno contribuito in modo significativo alla nostra comprensione della struttura placentare, del flusso sanguigno correlato, dello stato di ossigenazione, del profilo metabolico e delle possibili complicanze in gravidanza (Avni et al., 2015). La fMRI polmonare consente di eseguire i test di funzionalità polmonare, molto preziosi nel contesto sperimentale. I modelli animali sono cruciali per ottenere una visione più approfondita dei meccanismi coinvolti nella patogenesi delle malattie polmonari. L'imaging funzionale polmonare con MRI comprende misurazioni della ventilazione, perfusione, nonché del movimento e della meccanica respiratoria (Ahookhosh et al., 2023 – Gammon et al., 2014).



### 4.3 Risonanza magnetica spettroscopica (MRS)

La spettroscopia di risonanza magnetica, nota anche come spettroscopia di risonanza magnetica nucleare, è una tecnologia non invasiva che utilizza la RM per analizzare la composizione chimica dei tessuti ed è in grado di fornire, in vivo, informazioni utili sul metabolismo e sulla funzionalità dei tessuti di interesse in una serie di processi patologici. Consente di identificare piccole molecole esistenti in concentrazioni millimolari (mM) come acidi grassi, amminoacidi e zuccheri. È una tecnica analitica strumentale che permette di ottenere informazioni dettagliate sulla struttura molecolare osservando il comportamento dei nuclei atomici in un campo magnetico. Si identificano quindi i livelli di alcuni metaboliti in specifiche strutture anatomiche, sulla base del loro caratteristico spettro di risposta a sequenza di impulsi di risonanza magnetica. Dato che l'alterazione metabolica precede quella strutturale, questa tecnica rappresenta uno strumento in grado di individuare precocemente i cambiamenti fisiologici o patologici che avvengono nell'organismo, consentendo ai ricercatori di migliorare sempre più gli studi sperimentali evitando la soppressione degli individui nei diversi step di ogni protocollo sperimentale. La legge chimico-fisica su cui verte la metodica si basa sul principio secondo cui una determinata specie chimica presenta diverse frequenze di risonanza in rapporto all'ambiente molecolare a cui è chimicamente legata. Il segnale viene rappresentato da un insieme di "picchi" che identificano le diverse molecole e il grafico che si ottiene viene chiamato spettro. L'ampiezza del segnale RM è direttamente correlata alla concentrazione del metabolita e, in combinazione con tecniche adeguate, la MRS in vivo consente lo studio non invasivo del metabolismo di vari tessuti. In questo campo, i modelli animali hanno contribuito notevolmente sia ai progressi tecnologici, sia allo sviluppo di applicazioni per seguire la progressione della patologia studiata e la risposta ai trattamenti. In particolare, la produzione di topi transgenici ha fornito informazioni importanti sul ruolo di geni e di proteine specifiche in determinate patologie (Chatham & Blackband, 2001 – Lee & Marcinek, 2009 – Öz et al., 2013). Negli studi sperimentali applicati su topi e ratti possono essere utilizzati diversi nuclei sensibili alla RM ed i più comuni in questo campo sono fosforo-31 ( $^{31}\text{P}$ ), idrogeno anche detto prozio ( $^1\text{H}$ ) e carbonio-13 ( $^{13}\text{C}$ ).  $^1\text{H}$  è il nucleo più sensibile rilevabile dalla RM e la modalità MRS  $^1\text{H}$  è quella dominante, in quanto ha svolto un ruolo importante negli studi su modelli animali.

In particolare sulle patologie cerebrali, sui tumori e nello studio del metabolismo dei lipidi. In vivo  $^1\text{H}$  MRS è diventata uno strumento prezioso per gli studi metabolici del sistema nervoso centrale. I principali metaboliti rilevabili da  $^1\text{H}$  MRS includono: N-acetilaspargato (NAA), un marcatore per il tessuto neuronale vitale; creatina (Cr) e fosfocreatina (PCr), metaboliti riferibili alla bioenergetica delle cellule neuronali e gliali; composti contenenti colina (Cho), che possono aumentare a causa di un aumento del turnover della membrana cellulare o della demielinizzazione; lattato (Lac), prodotto durante il consumo di glucosio in seguito a ischemia o ipossia; glutammato (Glu) e glutamina (Gln), neurotrasmettitori eccitatori; ed acido gamma-aminobutirrico (GABA), neurotrasmettitore inibitorio. L'applicazione della  $^1\text{H}$  MRS nelle patologie cerebrali è stata dimostrata in numerosi modelli di malattie su topi e ratti, tra cui ischemia e ipossia cerebrale, sclerosi multipla, morbo di Parkinson, sclerosi laterale amiotrofica, sindrome di Down, trauma cranico, tumori cerebrali primari, epilessia e molti altri. Nella ricerca sul cancro  $^1\text{H}$  MRS ha un grande ruolo nello stabilire il profilo metabolico dei tumori in modo non invasivo. Le cellule tumorali sono caratterizzate da alti tassi di assorbimento e utilizzo del glucosio, elevata produzione di Lac e di metaboliti fosfolipidici della colina (Cheng & Glunde, 2018). La longitudinalità degli studi sperimentali su modelli animali risulta quindi sempre più importante, non solo per la riduzione del numero di animali utilizzati nei diversi protocolli sperimentali ma anche perché ha permesso e permette tutt'ora di stabilire nuovi biomarcatori tumorali e di monitorare le risposte a nuove terapie antitumorali. Inoltre,  $^1\text{H}$  MRS ha dimostrato di essere uno strumento prezioso anche per la quantificazione in vivo del contenuto lipidico nei muscoli scheletrici, nel fegato e anche nel cuore.  $^{31}\text{P}$  MRS viene utilizzata nei modelli animali per studiare il metabolismo energetico del muscolo scheletrico. L'introduzione di questa tecnica ha permesso di eliminare procedure chirurgiche molto invasive, diminuendo così il numero di animali utilizzati. Per quanto riguarda  $^{13}\text{C}$  MRS è spesso impiegata per studiare il metabolismo del glucosio a livello cerebrale. Tuttavia, possono essere utilizzati anche substrati iperpolarizzati marcati con  $^{13}\text{C}$ , in modo tale da aumentare temporaneamente il segnale MRS di  $^{13}\text{C}$ . Questa tecnica viene utilizzata su modelli animali in studi sul metabolismo energetico del miocardio e di tumori (Bakermans et al., 2015 – Prompers et al., 2011). In poche parole, l'uso della spettroscopia a RM come parte di un programma di ricerca può ridurre significativamente il numero di animali richiesti per un progetto specifico.

Utilizzando la RM come strumento di imaging non invasivo, è possibile selezionare punti temporali specifici che forniranno le informazioni necessarie, evitando la soppressione dei soggetti sperimentali. Inoltre, quando si utilizzano metodi di risonanza magnetica, le misurazioni vengono effettuate ripetutamente sullo stesso individuo; quindi, anche il potere statistico dello studio migliora, limitando le differenze interindividuali.

#### **4.4 Angio-MRI (MRA)**

Per quanto riguarda gli studi preclinici sperimentali sulle malattie vascolari, le tecniche di imaging non invasive sono sempre più utilizzate, in quanto permettono di monitorare l'evoluzione di una determinata patologia o la risposta di questa a una specifica terapia. Tradizionalmente, per valutare queste differenze venivano applicati metodi istologici, tale approccio era tuttavia associato a un numero relativamente elevato di animali richiesti, poiché lo sviluppo della malattia non poteva essere studiato longitudinalmente. Per quanto riguarda l'imaging non invasivo, l'angiografia a risonanza magnetica (MRA) risulta essere un'importante tecnica di imaging preclinico che permette di visualizzare l'apparato cardiocircolatorio e di valutare eventuali cambiamenti vascolari, dando quindi importanti informazioni sull'anatomia e sulla funzionalità dei vasi analizzati. Negli ultimi anni la MRA è migliorata significativamente, dando vita a diversi tipi di tecniche RM angiografiche, includendo metodiche con contrasto (CE-MRA) e senza contrasto (NC-MRA), entrambe con i loro vantaggi e svantaggi specifici (Reimann et al., 2019 – Lefrancois et al., 2011 – Laviña, 2016). La CE-MRA consiste nella somministrazione di un agente di contrasto endovenoso (più frequentemente agenti di contrasto a base di Gadolinio), che permette un aumento del segnale risultante nelle sequenze pesate in T1. CE-MRA permette di eseguire scansioni ad elevata risoluzione spaziale e temporale, consentendo l'imaging multifasico con la separazione del sistema arterioso e venoso e la valutazione dinamica del flusso. A differenza dell'imaging TC, l'imaging MRA non visualizza direttamente l'agente di contrasto ma, misura l'accorciamento di T1 in seguito alla somministrazione di agenti di contrasto a base di Gadolinio (GBCA). Il Gd ha proprietà paramagnetiche che creano un campo magnetico locale influenzando il protone H<sup>+</sup> presente nel sangue. Quando viene somministrato un GBCA, il tempo T1 nel sangue può abbassarsi di molto e

la forza dell'amplificazione del segnale è proporzionale all'accorciamento di T1. Inoltre, il grado di miglioramento del contrasto è correlato ai tempi di acquisizione (correlati al territorio vascolare di interesse), alla velocità di iniezione e all'emodinamica dell'individuo (Nagpal & Grist, 2023). Sebbene la CE-MRA fornisca informazioni eccellenti sull'anatomia vascolare, vi è stata una crescente attenzione sullo sviluppo di tecniche MRA senza contrasto. Questi sviluppi sono motivati dalla riduzione dei costi e dalla eliminazione del mezzo di contrasto per fornire una metodica completamente non invasiva e ovviamente priva dei rischi per l'animale associati alla sua somministrazione. Inoltre, l'angio-RM senza mezzo di contrasto è indipendente dalla tempistica del bolo di contrasto e, pertanto, può essere ripetuta più volte, anche se a costo di un aumento del tempo necessario per la generazione dell'immagine. Nonostante questi vantaggi, questa tecnica è storicamente poco utilizzata, a causa della minore risoluzione spaziale, rapporto segnale-rumore, tempi di scansione più lunghi e maggiori artefatti. Tuttavia, ad oggi, molteplici sviluppi nella tecnologia consentono scansioni NC-MRA accettabili. In questa metodica la visualizzazione dei vasi sanguigni è basata sull'utilizzo delle proprietà e della velocità del flusso sanguigno (es. tempo di volo-TOF o intervallo quiescente a scatto singolo-QISS) o sui tempi di rilassamento T1 e T2 intrinsecamente elevati del sangue (es. precessione libera allo stato stazionario bilanciato-bSSFP). L'MRA a tempo di volo (TOF) è una tecnica che sfrutta l'effetto di afflusso di protoni nel sangue. L'eccitazione ripetuta a radiofrequenza del tessuto adiacente al vaso sottoposto ad imaging porta alla sua saturazione, con conseguente segnale dell'immagine più basso. Tuttavia, i protoni nel sangue che fluiscono in quella fetta di immagine sono insaturi, poiché non sono stati soggetti ai ripetuti impulsi di RF. Questi spin insaturi producono un'elevata intensità di segnale, consentendo il contrasto tra il vaso ed i tessuti adiacenti che risulteranno più scuri. L'angio-RM a intervallo quiescente a scatto singolo (QISS) è una tecnica basata sull'afflusso sanguigno controllato dall'ECG per l'imaging arterioso periferico. È simile alla TOF-MRA ma in seguito alla saturazione dei tessuti adiacenti al vaso, viene emesso un impulso di soppressione venosa. Infine, la precessione libera allo stato stazionario bilanciato è un'altra tecnica NC-MRA che utilizza rapporti di imaging T2/T1 per contrastare i vasi sanguigni dal tessuto adiacente. (Wheaton & Miyazaki, 2012 – Panda et al., 2023 – Saini et al., 2018). Il vantaggio principale delle tecniche angiografiche RM con contrasto è che, grazie all'elevato contrasto intravascolare, è possibile ottenere

un'elevata risoluzione spaziale in breve tempo, mentre per quanto riguarda le tecniche angio-RM senza mezzo di contrasto il vantaggio principale è che il contrasto viene generato senza la necessità di m.d.c., quindi, senza la necessità di prendere un accesso venoso, molte volte difficile da stabilire. Appare quindi evidente come l'angio-MR possa rappresentare un'importante tecnica, basata sulla risonanza magnetica, per garantire la riduzione del numero di animali utilizzati in sperimentazione. La MRA permette di limitare la soppressione degli animali negli studi sperimentali sull'apparato cardiocircolatorio, in quanto il sacrificio degli individui sperimentali sarebbe inevitabile per ottenere risultati significativi.

#### **4.5 Diffusion Tensor Imaging (DTI)**

L'imaging del tensore di diffusione (DTI) è una tecnica di risonanza magnetica che permette l'analisi delle proprietà diffusive delle molecole d'acqua all'interno dei tessuti in vivo, e si presenta come un importante strumento per lo studio della micro-architettura delle strutture cerebrali in condizioni sia fisiologiche che patologiche su modelli animali. Diversi studi condotti negli anni hanno dimostrato che la DTI è una tecnica che consente di valutare l'orientamento dei tratti della sostanza bianca e l'organizzazione microstrutturale, fornendo informazioni dettagliate sull'integrità dei tessuti biologici. Questa tecnica è in grado di rilevare sottili cambiamenti nella microstruttura cellulare grazie a modelli di misurazione di diffusione dell'acqua che non possono essere quantificati utilizzando le sequenze MRI tradizionali. Permette quindi di identificare i primi segni di degenerazione che precedono le alterazioni macroscopiche nell'anatomia del cervello. In assenza di ostacoli il moto delle molecole di acqua è uniforme in tutte le direzioni e viene definito "isotropo". Nei tessuti biologici l'auto-diffusione delle molecole di acqua non è libera, ma è ostacolata e limitata dalla presenza di vari tipi di barriere come le membrane cellulari, le fibre e la mielina. In questo caso la diffusione sarà maggiore in una direzione rispetto ad altre, e quindi sarà definita "anisotropica". Questa condizione si riscontra nei fasci di materia bianca in quanto la loro organizzazione è altamente direzionale e stretta. Infatti, la diffusività dell'acqua nella materia bianca è maggiormente ostacolata dalle membrane assonali e dalle guaine mieliniche.

Introducendo dei gradienti di campo magnetico che variano nello spazio, è possibile ottenere sequenze di risonanza magnetica sensibili alla diffusione dell'acqua lungo una certa direzione, ottenendo le immagini pesate in diffusione (DWI). Le principali correlazioni con le alterazioni a livello cerebrale sono una diffusione anisotropica ridotta, che riflette una discontinuità delle membrane assonali, ed un aumento della diffusività media che riflette una rarefazione delle membrane cellulari e di altre strutture che ostacolano la diffusione. Si può notare, quindi, come il DTI racchiuda più informazioni sulla materia bianca. La sua sensibilità permette di rilevare cambiamenti nella morfologia a livello cellulare, negli assoni e nella mielina, diventando così uno strumento per lo studio di lesioni cerebrali. Il DTI è diventato uno strumento importante per studiare l'anatomia del cervello in vivo su soggetti sperimentali (topi, ratti e primati) e la sua natura non invasiva consente studi longitudinali grazie ai quali è possibile ridurre il numero di soggetti sperimentali al minimo. Questa tecnica è stata spesso applicata nella ricerca di base per esaminare il cervello di topi da laboratorio, ma anche per caratterizzare lesioni della materia bianca in modelli murini di malattie neurologiche, come ad esempio lesioni cerebrali traumatiche, sclerosi multipla e ictus. La DTI è stata utilizzata anche per studiare lo sviluppo cerebrale e i suoi meccanismi di controllo genetico attraverso vari modelli murini transgenici (Erokwu et al., 2011 – Mori & Zhang, 2006 – Müller et al., 2019 – Müller et al., 2020). L'acquisizione di immagini ad alta risoluzione tramite questa tecnica richiede tempi elevati, limitando l'uso del DTI in animali che non sopravviverebbero a lunghe scansioni. Tuttavia, l'avvento di sonde a campi più elevati e di sonde criogeniche hanno permesso di migliorare significativamente il SNR in questa tecnica, aprendo nuove opportunità per migliorare sia la risoluzione che la velocità di acquisizione DTI cerebrale di topi in vivo, permettendo quindi la longitudinalità degli studi sperimentali (Wu et al., 2013 – Yon et al., 2020). Gli studi su modelli animali hanno un ruolo cruciale nelle neuroscienze e le immagini basate su DTI hanno contribuito in modo sostanziale alla comprensione di diverse malattie neurodegenerative. Gli studi longitudinali in questi casi diventano importanti non solo per una riduzione del numero di individui utilizzati ma anche per una miglior analisi della patologia neurodegenerativa, la quale può essere studiata per tutta la durata della vita dell'animale. Negli ultimi anni il DTI ha trovato nuovi campi di applicazione, in quanto nuovi studi hanno valutato il suo utilizzo per caratterizzare patologie neoplastiche,

cardiache, renali, epatiche e dei muscoli scheletrici (Strijkers et al., 2009 – Wang et al., 2021 – Lee & Kim, 2015 – Oudeman et al., 2016). La diffusione e il miglioramento di questa tecnica all'interno di laboratori di sperimentazione animale rappresenta uno strumento in più per migliorare la "Reduction" nei vari protocolli sperimentali.

## **5. Casi studio**

Le varie tecniche di imaging illustrate nei capitoli precedenti, più nello specifico la MRI, non sono solo una risorsa essenziale per la ricerca scientifica ma risultano essere molto importanti nel salvaguardare il benessere degli animali all'interno dei laboratori di sperimentazione. Le direzioni future europee mirano alla riduzione del numero di animali utilizzati in sperimentazione, tuttavia la completa eliminazione di questi dalla ricerca scientifica è un traguardo ancora lontano, in quanto rappresentano un passaggio chiave in tutti gli studi scientifici. Di seguito verranno esposti alcuni lavori svolti nel laboratorio di Verona, il quale ho visitato più volte per poter recuperare le immagini di risonanza magnetica. L'obiettivo è quello di evidenziare l'importanza di questa tecnica nell'ottica delle 3R in particolare della "Reduction", in quanto se non venisse applicata, molti più animali dovrebbero essere sottoposti alla sperimentazione e di conseguenza alla soppressione.

### **5.1 Materiali e metodi**

Per quanto riguarda la parte di imaging, in tutti i seguenti esperimenti, è stato utilizzato il medesimo macchinario. Trattasi di un tomografo a risonanza magnetica (Bruker Biospec) per piccoli animali. Il sistema MRI è dotato di un magnete orizzontale operante ad un campo di 4,7 T, con un bore da 33 cm (Oxford), elettronica e sistema di gradienti Bruker. Per le acquisizioni in vivo, il sistema è dotato di apparecchiatura per anestesia gassosa, misurazione dei parametri vitali e riscaldamento per animali.

#### **5.1.1 Monitoraggio della crescita tumorale pancreaticata tramite risonanza magnetica e bioluminescenza**

In questo studio vengono utilizzate due tecniche di imaging, MRI e BLI, per il monitoraggio della crescita e metastatizzazione tumorale, rendendo possibile la caratterizzazione di un modello sperimentale di tumore pancreatico. Questo lavoro è stato possibile grazie



all'iniezione di cellule tumorali pancreatiche umane PANC-1-Luc+ (luciferasi +) nel pancreas di topi. Gli esperimenti sono stati condotti secondo le normative nazionali in seguito all'approvazione del Comitato Etico. Successivamente all'anestesia dei topi (usando ketamina e xilazina) è stata eseguita un'incisione a livello addominale per esteriorizzare il pancreas e iniettare le cellule tumorali pancreatiche. Così, sono stati creati due distinti gruppi di topi:

-gruppo n.1, 13 topi a cui erano stati iniettate  $5 \cdot 10^6$  PANC-1 Luc+ cellule

-gruppo n.2, 10 topi a cui erano stati iniettate  $2 \cdot 10^6$  PANC-1 Luc+ cellule

Ogni topo è stato sottoposto alle due tecniche di imaging a uno, due e tre mesi dall'iniezione delle cellule tumorali. Per quanto riguarda l'acquisizione delle immagini di risonanza magnetica, i topi sono stati anestetizzati tramite l'inalazione di una miscela di aria e O<sub>2</sub> contenente 0,5%-1% di isoflurano. Nell'ultima sessione di imaging è stato eseguito anche un DCE-MRI (Dynamic Contrast Enhancement), ossia l'acquisizione di immagini prima e dopo l'iniezione di un agente di contrasto endovena a base di Gd (Gadolinio). Al termine di questo esperimento, 3 mesi dopo l'iniezione delle cellule tumorali, gli animali sono stati soppressi tramite lussazione cervicale e sottoposti a necropsia per l'escissione del tumore. Questa procedura è necessaria in quanto, dopo essere state fissate in formalina e incluse in paraffina, le masse tumorali sono state analizzate a livello istologico (Ritelli et al., 2015).

### **5.1.2 Magnetosomi estratti da *Magnetospirillum gryphiswaldense* utilizzati come agenti teranostici in un modello sperimentale di glioblastoma**

Il presente studio si basa su uno strumento terapeutico risultato essere promettente per il trattamento del cancro. Questo strumento viene identificato come ipertermia a fluido magnetico (MHF), il quale fornisce energia termica alla regione target mediante nanoparticelle di ossido di ferro esposte a un campo magnetico alternato (AMF). Le nanoparticelle vengono iniettate nel tumore e quando viene applicato il campo magnetico, i tessuti tumorali raggiungono una temperatura in grado di causare un'ablazione termica estremamente selettiva del tumore. In questo studio, la risonanza magnetica rappresenta un punto importante in quanto viene utilizzata sia per visualizzare

le nanoparticelle, sia per valutare l'andamento della massa tumorale prima e dopo il trattamento. Per la parte di esperimento in vivo sono stati utilizzati 32 topi maschi ai quali, in seguito ad anestesia, sono state iniettate cellule tumorali (glioblastoma-astrocitoma umano) a livello sottocutaneo nel fianco destro. Al raggiungimento del volume tumorale prestabilito è stata eseguita una risonanza magnetica per valutare la massa neoplastica. Da questo momento in poi i topi sono stati divisi randomicamente in tre gruppi:

-10 animali sottoposti a iniezione intra-tumorale di soluzione salina

-10 animali sottoposti a iniezione intra-tumorale di magnetosomi diluiti in PBS (tampone fosfato salino)

-12 animali sottoposti a iniezione intra-tumorale di magnetosomi diluiti in PBS ed esposti ad AMF a giorni alterni per una settimana dopo l'iniezione

Tutti i topi sono stati sottoposti a RM prima, 24h, una settimana e due settimane dopo l'iniezione di magnetosomi/soluzione salina. Al termine dell'osservazione con risonanza magnetica i topi sono stati soppressi e i tumori asportati per le analisi istologiche (Mannucci et al., 2018).

### **5.1.3 La pressione negativa di un espansore interno a spirale genera nuovo tessuto adiposo sottocutaneo in un modello animale in vivo**

L'obiettivo di questo esperimento è quello di approfondire la conoscenza sulla funzionalità degli espansori tissutali come protesi, in particolar modo per la ricostruzione del seno. È stato utilizzato un modello animale sperimentale per valutare la possibile applicazione clinica di un espansore interno. In quanto, forze di trazione meccanica interna sarebbero in grado di stimolare sia la proliferazione che la differenziazione cellulare, in particolar modo del tessuto adiposo. Il dispositivo conico DCE (dynamic conic expander) viene inserito con un intervento chirurgico minimamente invasivo nella zona dorsale sinistra di ciascun coniglio. Nove conigli femmine di 6 mesi d'età sono stati utilizzati per questo studio. Gli animali sono stati disposti in un ambiente che rispettasse i loro bisogni e il loro benessere, con accesso all'acqua e al cibo. In tutto l'arco temporale dell'esperimento nessun animale ha sviluppato né una reazione infiammatoria né effetti

avversi causati dalla presenza del dispositivo. Durante tutte le procedure di RM gli animali sono stati anestetizzati mediante l'inalazione di una miscela di ossigeno e isoflurano. Cinque animali su nove sono stati monitorati tramite RM subito dopo l'inserimento chirurgico dell'espansore, poi a 2 settimane, a 6 mesi e a 12 mesi. In due di questi, il dispositivo è stato rimosso a distanza di 6 mesi dall'impianto. Nei restanti 4 conigli le acquisizioni sono state eseguite fino al sesto mese dopo l'impianto. Al termine dell'esperimento gli espansori sono stati rimossi chirurgicamente e gli animali sono stati sottoposti ad eutanasia per poter prelevare il tessuto adiposo dalle aree d'interesse. In seguito, i campioni sono stati fissati in formaldeide e glutaraldeide per essere osservati rispettivamente con microscopio e microscopio elettronico (Rigotti et al., 2020).

#### **5.1.4 Valutazione in vivo dell'attività antiangiogenica di SU6668 in un modello sperimentale di carcinoma del colon**

L'angiogenesi è uno dei più importanti "hallmarks of cancer" in quanto pone le basi per lo sviluppo della massa tumorale. Il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) viene prodotto durante condizioni ipossiche ed è considerato una delle molecole proangiogeniche più potenti. In questo esperimento viene testata una molecola che inibisce selettivamente i recettori deputati all'angiogenesi tumorale, chiamata SU6668. Per questo esperimento, la risonanza magnetica risulta essere molto utile in quanto consente una valutazione morfologica e funzionale della componente vascolare neoplastica in vivo. Questo grazie anche all'utilizzo di un mezzo di contrasto che ha permesso di evidenziare le caratteristiche microvascolari del tumore. Inoltre, grazie all'MRI è stato possibile eseguire studi longitudinali mantenendo in vita gli animali in tutta la durata dell'esperimento. L'obiettivo di questo studio è stato quello di verificare che l'utilizzo della RM con mezzo di contrasto fosse in grado di rilevare l'efficacia della terapia con SU6668 in vivo. Gli animali sono stati osservati tramite MRI in diversi momenti dopo la terapia per comprendere più chiaramente i processi antiangiogenici. Sono in totale 30 i topi utilizzati per questo esperimento, ai quali sono state impiantate cellule di un adenocarcinoma umano del colon. Le cellule tumorali sono state impiantate a livello sottocutaneo nel fianco di ogni animale. Al raggiungimento del peso di voluto gli animali

sono stati suddivisi in tre gruppi in base alla durata della terapia. Ognuno di questi gruppi è stato ulteriormente diviso in due, dove a una parte degli animali è stata somministrata la terapia mentre all'altra solo il veicolo (Cremophor-based vehicle). La sola somministrazione del veicolo ha avuto lo scopo di creare un gruppo di controllo. Gli animali sono stati così divisi andando a formare 3 gruppi:

-una sola dose di SU6668 (5 animali) o di veicolo-Cremophor (5 animali), sono stati monitorati tramite MRI prima e 24h dopo il trattamento

-somministrazione giornaliera di SU6668 (5 animali) o di veicolo-Cremophor (5 animali) per 3 giorni, sono stati monitorati tramite MRI prima e 72h dopo il trattamento

-somministrazione giornaliera di SU6668 (5 animali) o di veicolo-Cremophor (5 animali) per 14 giorni, sono stati monitorati tramite MRI al giorno 0, 7 e 14.

Prima di ogni procedura di imaging gli animali sono stati sottoposti ad anestesia mediante l'inalazione di una miscela contenente alotano. Le immagini sono state acquisite prima e dopo la somministrazione del mezzo di contrasto (a base di gadolinio) per via endovenosa a livello della coda. Durante l'esperimento tutti gli animali hanno reagito bene al farmaco senza presentare alcun effetto collaterale e al termine degli esami i topi sono stati soppressi per il prelievo del tumore. Successivamente, le masse neoplastiche ricavate sono state fissate con un fissativo di Zinco per poter avanzare con l'analisi istologica (Marzola et al., 2004).

## **5.2 Risultati**

La programmazione e l'organizzazione degli esperimenti precedenti ci aiuta a comprendere meglio l'utilità e quindi l'importanza della RM in sperimentazione animale. Questa tecnica di imaging permette di caratterizzare patologie, descrivere meccanismi d'azione di nuove molecole ma soprattutto di implementare la longitudinalità negli studi sperimentali.

Nel primo esperimento riguardante il monitoraggio della crescita tumorale, i due gruppi di topi creati sono stati sottoposti ad imaging a uno, due e tre mesi di distanza dall'induzione del tumore. Nel gruppo n.1 le masse tumorali sono risultate rilevabili in tutti e tre i momenti. Al contrario, nel secondo gruppo le masse non erano rilevabili nella

maggior parte degli animali specialmente nel primo mese. In Figura 5.1 è possibile osservare lo sviluppo della massa tumorale.

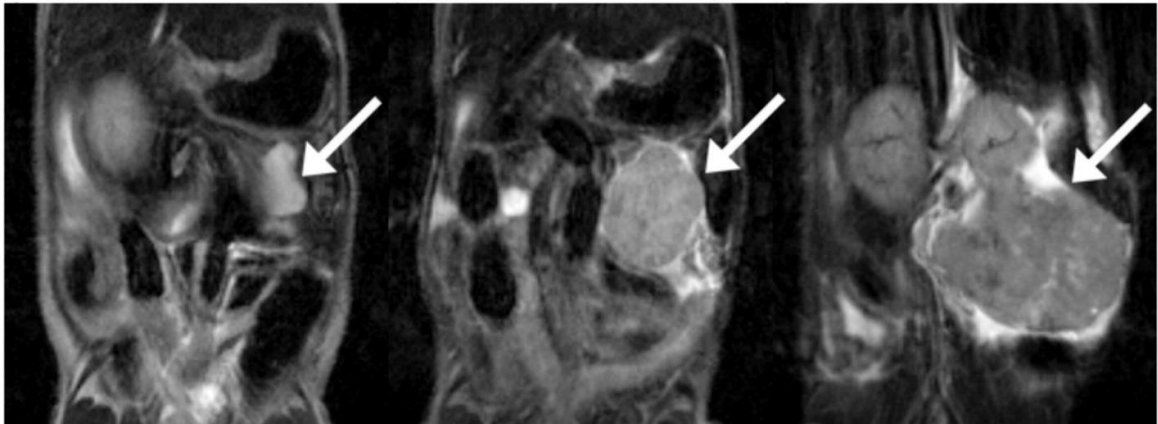


Figura 5.1 Immagini rappresentative di RM acquisite in un soggetto appartenente al gruppo n.1 in diversi step temporali. Da sx a dx si può osservare lo sviluppo della massa tumorale a 1, 2 e 3 mesi dopo l'iniezione delle cellule tumorali. La massa è indicata dalla freccia bianca.

Per quanto riguarda la DCE-MRI, questa parte dell'esperimento è risultata utile nel quantificare l'intensità di segnale dipendente dal tempo, in tre diverse regioni di interesse, ossia nella parte interna, esterna del tumore e nel muscolo scheletrico, per valutarne la vascolarizzazione. Nell'immagine sottostante Figura 5.2 sono rappresentate le scansioni DCE-MRI.



Figura 5.2 Le immagini rappresentano la massa tumorale di uno dei soggetti appartenenti al gruppo sperimentale n.1 nell'ultimo mese. Da sx verso dx le immagini sono state acquisite prima dell'iniezione del mezzo di contrasto, dopo l'iniezione del mezzo di contrasto mentre nella terza immagine sono rappresentate le tre regioni di interesse utilizzate per valutare la vascolarizzazione.

In questo esperimento la risonanza magnetica ha permesso di individuare le masse tumorali nella maggior parte degli animali in esame, dando prova di quanto questa tecnica sia di grande aiuto per riuscire a diminuire il numero di animali utilizzati. Facendo una piccola supposizione si può calcolare il numero di animali che sarebbero stati impiegati. Ogni animale è stato osservato tramite RM per ben tre volte (dopo 1,2 e 3 mesi). Quindi, senza RM il numero di soggetti sperimentali necessari avrebbe dovuto essere il triplo. Sono 23 i topi utilizzati in questo esperimento ma senza RM avrebbero dovuto essere teoricamente 69 poiché ad ogni step temporale di osservazione gli animali verrebbero soppressi per poter osservare la crescita tumorale. Ovviamente questa è solo una presupposizione e non è una regola precisa. Si può quindi affermare che la RM in questo caso, grazie anche alla complementarità con la BLI, risulta essere una tecnica di imaging in vivo ampiamente applicabile in svariati protocolli sperimentali permettendo la "Reduction". Ma non solo, questo esperimento dimostra che l'utilizzo di modelli preclinici riproducibili risulta essere un'importante risorsa per la caratterizzazione dei tumori (Ritelli et al., 2015). In particolare, lo sviluppo e l'impiego di nuove tecniche di imaging a livello preclinico, specialmente l'MRI, rappresentano un passo importante per implementare da una parte la conoscenza su queste patologie e dall'altra per ridurre sempre più il numero di animali utilizzati in sperimentazione.

Nel secondo esperimento riguardante i magnetosomi (MN), le immagini di RM sono state acquisite prima dell'iniezione dei MN, 24h, 1 settimana e 2 settimane dopo l'iniezione. Nelle immagini seguenti (Figura 5.3, 5.4 e 5.5) si può notare come, grazie al trattamento con AMF, la massa tumorale è andata incontro ad una significativa riduzione, al contrario non applicando il campo magnetico alternato i magnetosomi sono risultati inerti (Mannucci et al., 2018). Anche in questo esperimento si è in grado di percepire quanti animali in più dovrebbero essere stati sacrificati senza l'utilizzo della risonanza magnetica. Facendo un breve calcolo i topi utilizzati in totale in questo esperimento sono 32 e ognuno di questi è stato sottoposto ad imaging per ben quattro volte. Senza l'applicazione della risonanza magnetica, facendo una supposizione, ben 128 topi dovrebbero esser stati utilizzati, sopprimendo ad ogni step temporale 32 individui. Questo è un calcolo teorico e non rispecchia l'esatta realtà, ma ci fa capire quanto sia importante introdurre nei protocolli sperimentali tecniche di imaging, come la risonanza

magnetica. Infatti, l'utilizzo di questa tecnica diagnostica preclinica ha permesso una notevole "Reduction" mantenendo l'accettabilità dei dati ottenuti. Osservando la Figura 5.3, 5.4 e 5.5, si può notare il dettaglio delle immagini di RM acquisite in questo esperimento che permettono sia di ottenere dati di elevato valore scientifico ma soprattutto garantiranno in un futuro l'evoluzione della "Reduction".

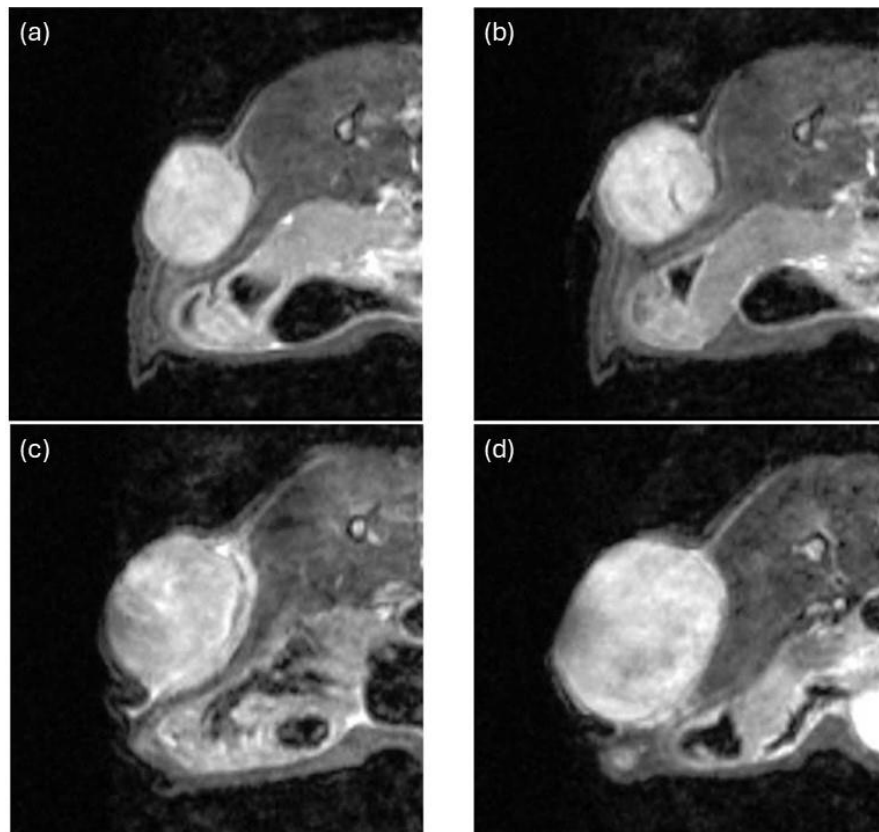


Figura 5.3 In queste quattro immagini RM è riportata la crescita della massa tumorale nel gruppo a cui è stata somministrata la soluzione salina. Le immagini riportano l'animale prima dell'iniezione (a), appena dopo (b), dopo una settimana (c) e dopo due settimane (d). Si può infatti notare come a 2 settimane la massa è aumentata notevolmente.

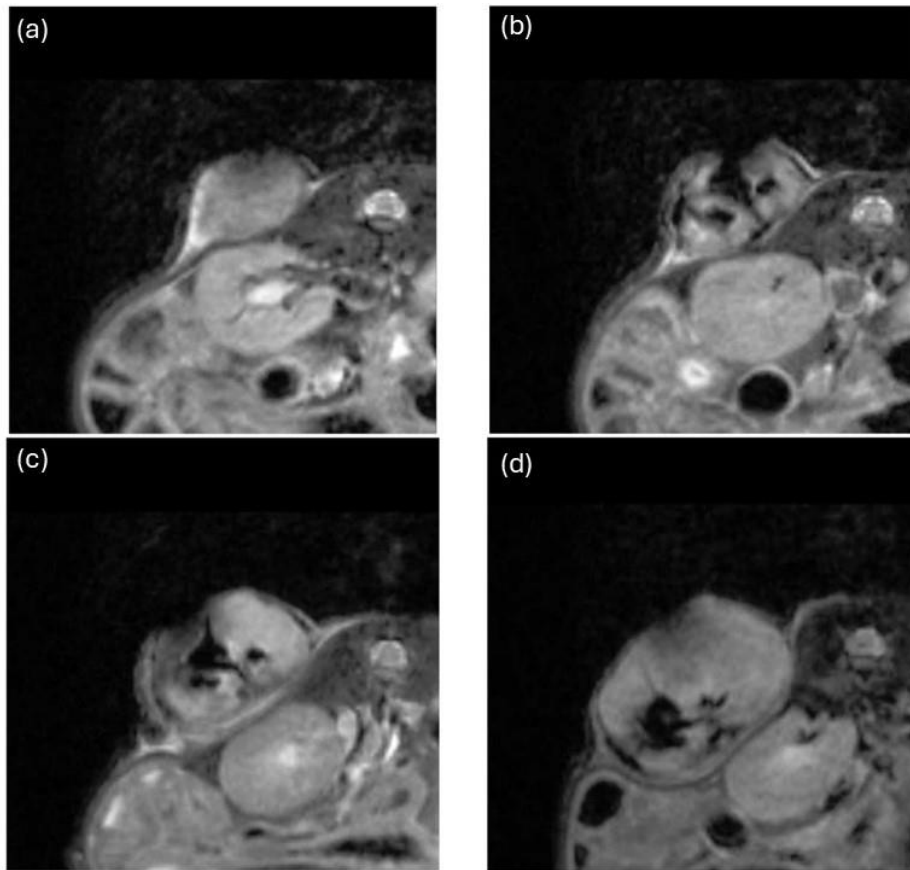


Figura 5.4 In queste quattro immagini viene riportata la progressione del tumore nel gruppo al quale erano stati iniettati i MN senza però eseguire la terapia AMF. Le immagini rappresentano la massa tumorale prima dell'iniezione dei MN (a), appena dopo (b), dopo una settimana (c) e dopo due settimane (d). I MN sono rilevabili all'interno della massa tumorale come aree più scure.



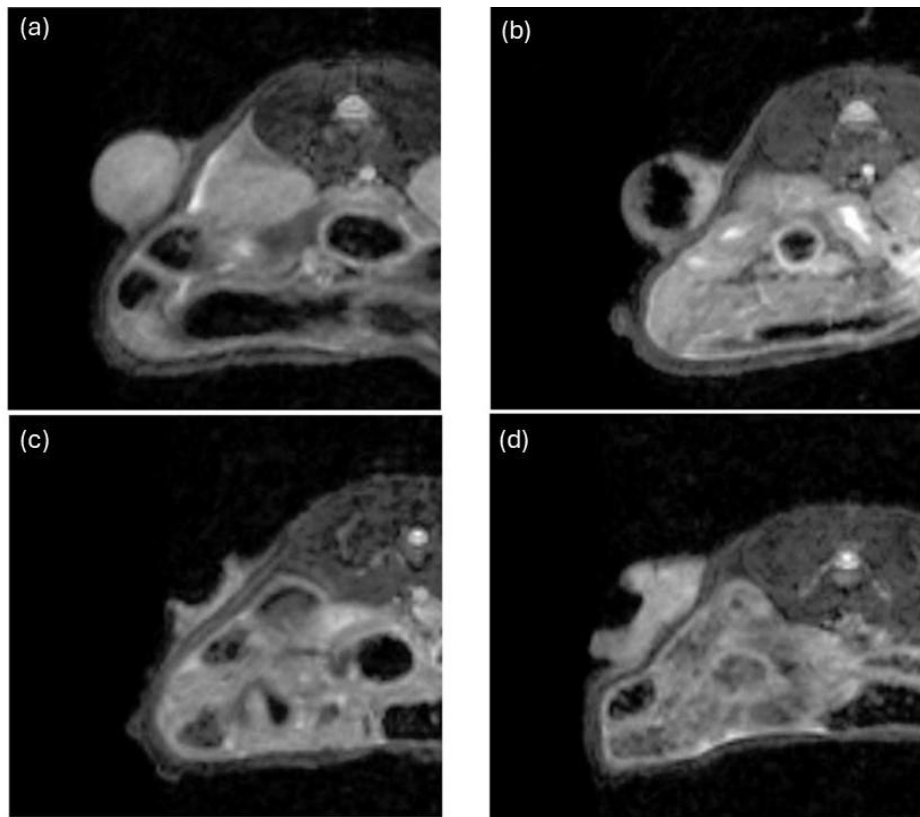


Figura 5.5 In queste quattro immagini viene mostrata l'evoluzione della massa tumorale nel gruppo al quale sono stati iniettati i MN e in seguito trattati con AMF. Nelle quattro immagini possiamo notare la massa neoplastica prima dell'iniezione dei MN (a), appena dopo (b), dopo una settimana (c) e dopo due settimane (d). Già una settimana dopo il trattamento è possibile notare la regressione della massa tumorale.

Nel terzo esperimento riportato, l'impianto di un espansore tissutale ha portato ad importanti risultati. Già dopo due settimane (Figura 5.6 e 5.7) è possibile notare la formazione dell'edema al di sotto dell'impianto, il quale rappresenta un'importante fattore proadipogenetico. In alcuni casi già dopo una settimana l'edema era presente. Dopo 6 mesi (Figura 5.7) si è potuto osservare un importante sviluppo di tessuto adiposo bianco sottocutaneo, il quale risulta essere ben formato dopo la rimozione dell'espansore a 12 mesi.

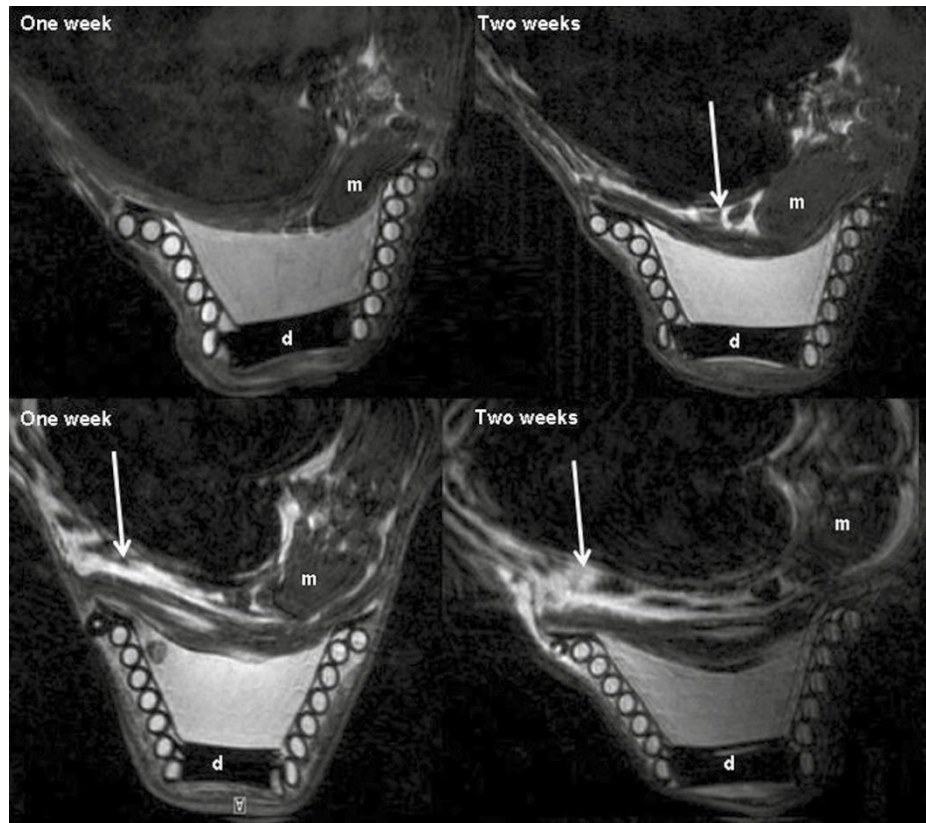


Figura 5.6 In queste quattro immagini sono rappresentati due animali, rispettivamente a una e a due settimane dopo l'impianto dell'espansore. Le frecce indicano la presenza di edema tra il dispositivo (d) e il muscolo (m).

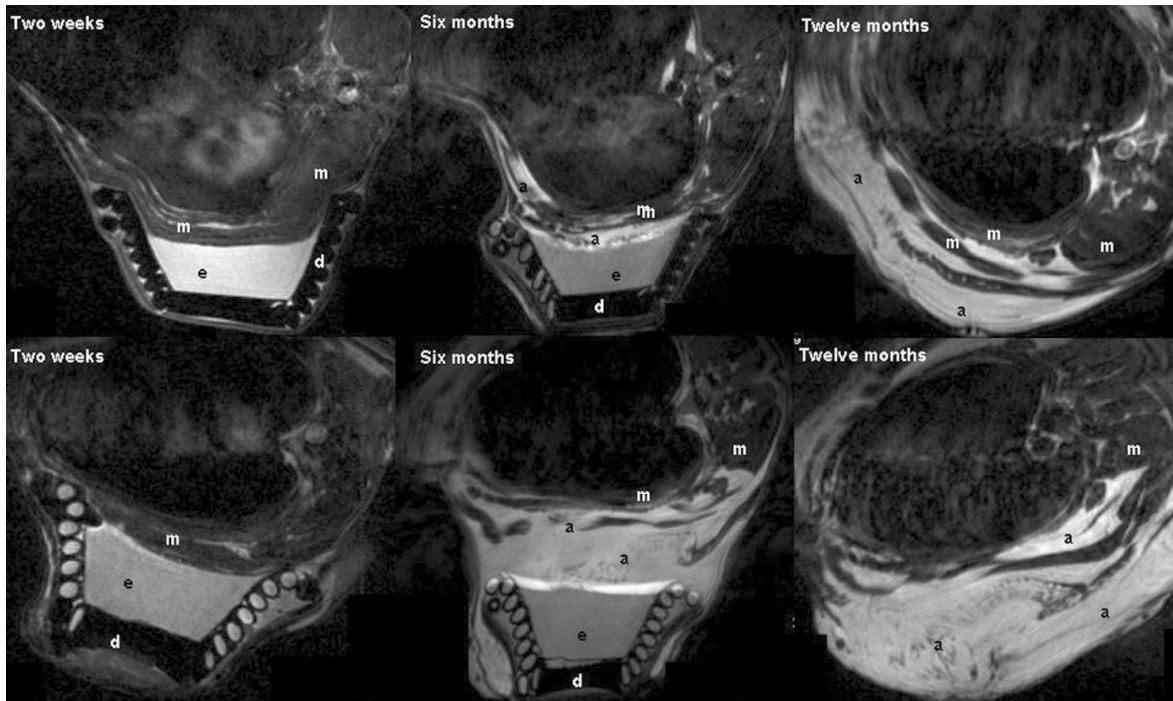


Figura 5.7 In queste immagini di RM sono rappresentati due animali a due settimane, sei e 12 mesi dall’impianto dell’espansore (d). Dal sesto mese inizia la formazione di nuovo tessuto adiposo (a) nelle aree d’interesse. (e) epidermide; (m) muscolo.

Con questo studio è stato dimostrato che grazie alle forze meccaniche di tensione generate da un espansore interno a spirale conico è possibile indurre la nuova formazione di tessuto adiposo. Risultati che appaiono promettenti per la ricostruzione anatomica del seno, in quanto si potrà evitare di dover ricorrere ad interventi chirurgici importanti o a filler artificiali (Rigotti et al., 2020). In questo esperimento, nonostante non siano stati utilizzati i classici animali da sperimentazione, risulta essere molto importante il tema della “Reduction”. Grazie all’utilizzo della risonanza magnetica è stato possibile eseguire uno studio longitudinale mantenendo in vita sempre gli stessi 9 animali. Le finestre di monitoraggio in questo protocollo erano ben quattro e gli animali che dovrebbero essere stati utilizzati avrebbero dovuto essere molti di più. Facendo sempre un breve calcolo teorico, 5 animali sono stati osservati/scannerizzati tramite RM per ben quattro volte (dopo l’impianto, 2 settimane, 6 mesi e 12 mesi dopo) mentre il restante degli individui è

stato osservato per tre volte (dopo l'impianto, 2 settimane e 6 mesi dopo). Senza l'ausilio dell'imaging a risonanza magnetica, teoricamente, 32 conigli sarebbero stati utilizzati per questa sperimentazione, quasi il quadruplo del numero utilizzato. Ormai è sempre più chiaro di come le tecniche di imaging, in questo caso la RM, siano molto importanti per un futuro più rispettoso verso la "Reduction" e verso il benessere degli animali da sperimentazione.

Infine, nell'ultimo esperimento citato grazie all'integrazione degli studi di risonanza magnetica è stato possibile rilevare l'effetto della molecola SU6668 sul sistema vascolare della neoplasia. Le immagini hanno evidenziato una significativa diminuzione dell'angiogenesi tumorale, osservabile in Figura 5.8, 5.9, 5.10 e 5.11. Dopo 14 giorni di trattamento era presente solo un sottile strato di cellule tumorali vitali, con un'inibizione della crescita tumorale del 60%. Si può quindi dire che è stata valutata in vivo l'efficacia antiangiogenica di SU6668 grazie all'utilizzo della risonanza magnetica (Marzola et al., 2004). Anche per questo esperimento è possibile effettuare un'ipotesi sul numero di animali che sarebbero stati necessari senza l'applicazione della risonanza magnetica. In questo caso, ognuno dei tre gruppi creati era composto da 10 individui. I primi due gruppi sono stati osservati due volte, mentre il terzo per ben tre volte, arrivando ad un numero di 70 animali potenzialmente utilizzati per questo esperimento senza l'utilizzo di tecniche di imaging. La RM offre quindi l'opportunità di poter tenere monitorato il tumore durante tutto lo studio ma soprattutto di valutare l'effetto della terapia implicata senza ricorrere alla soppressione degli animali, valutando la medesima massa tumorale sull'animale corrispondente. Questo studio non è molto recente, nonostante questo grazie all'applicazione della RM è stato possibile risparmiare un numero elevato di animali.

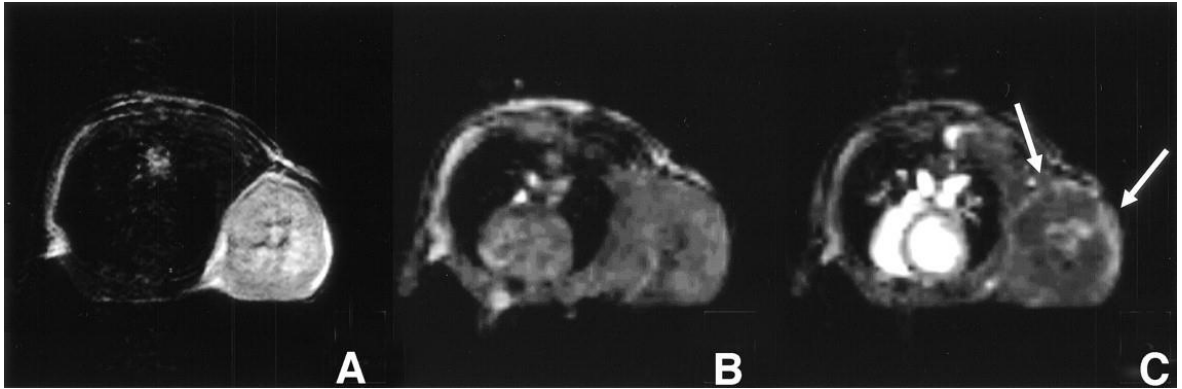


Figura 5.8 In figura possiamo notare le 3 immagini di RM che rappresentano la massa tumorale di uno dei soggetti sperimentali prima del trattamento con SU6668. La prima immagine T2w (A) mentre le successive entrambe T1w ma prima (B) e 50 minuti dopo (C) la somministrazione del mezzo di contrasto. Nella terza immagine le frecce bianche indicano una maggiore intensità di segnale dovuta alla maggior vascolarizzazione presente in quella regione

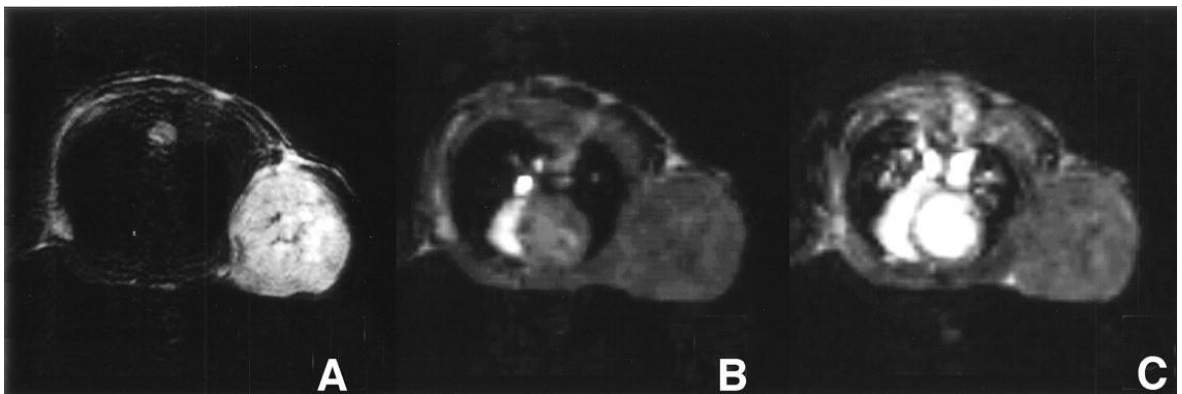


Figura 5.9 In questa figura possiamo osservare la massa tumorale dello stesso animale della figura precedente, ma 24h dopo la prima iniezione di SU6668. La prima immagine T2w (A) mentre le successive entrambe T1w ma prima (B) e 50 minuti dopo (C) la somministrazione del mezzo di contrasto. Non sono state notate differenze rilevanti ma il segnale indotto dal mezzo di contrasto è fortemente diminuito (C) se confrontato con l'immagine precedente.

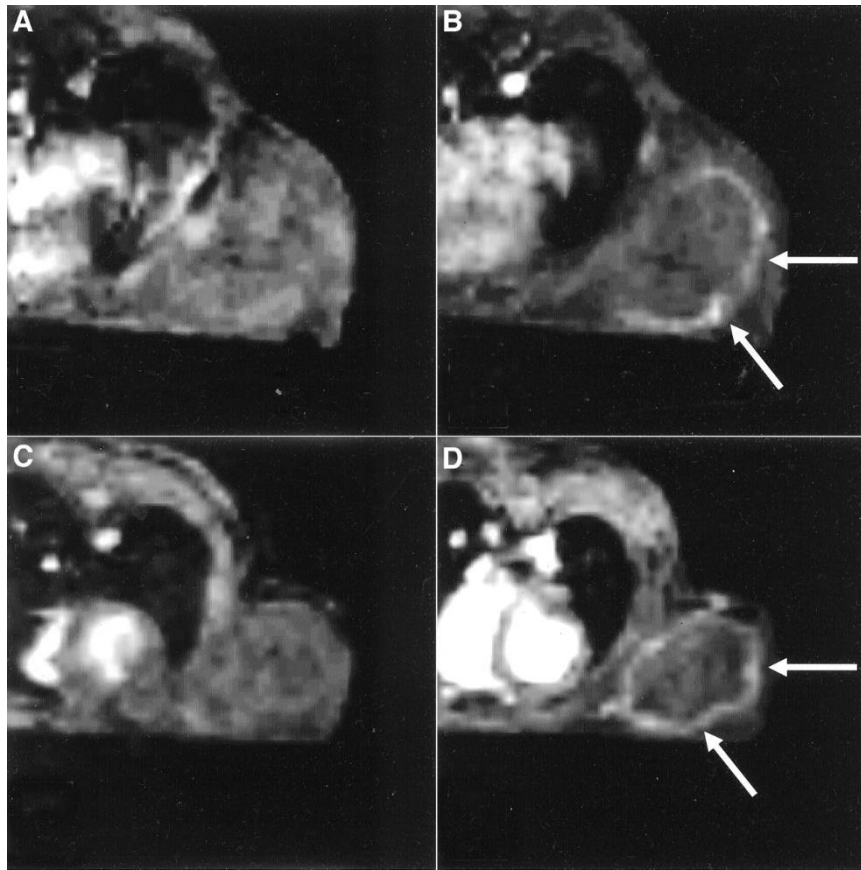


Figura 5.10 Nella figura sovrastante è rappresentata la massa tumorale di due dei soggetti sperimentali dopo 3 giorni dalla somministrazione della molecola SU6668. Le acquisizioni sono state eseguite T1w. Le immagini sono state acquisite prima (A e C) e dopo 50 minuti (B e D) dalla somministrazione del mezzo di contrasto. Le frecce in figura indicano l'evoluzione di una capsula peritumorale ben vascolarizzata che si è sviluppata dopo 3 giorni dal trattamento.

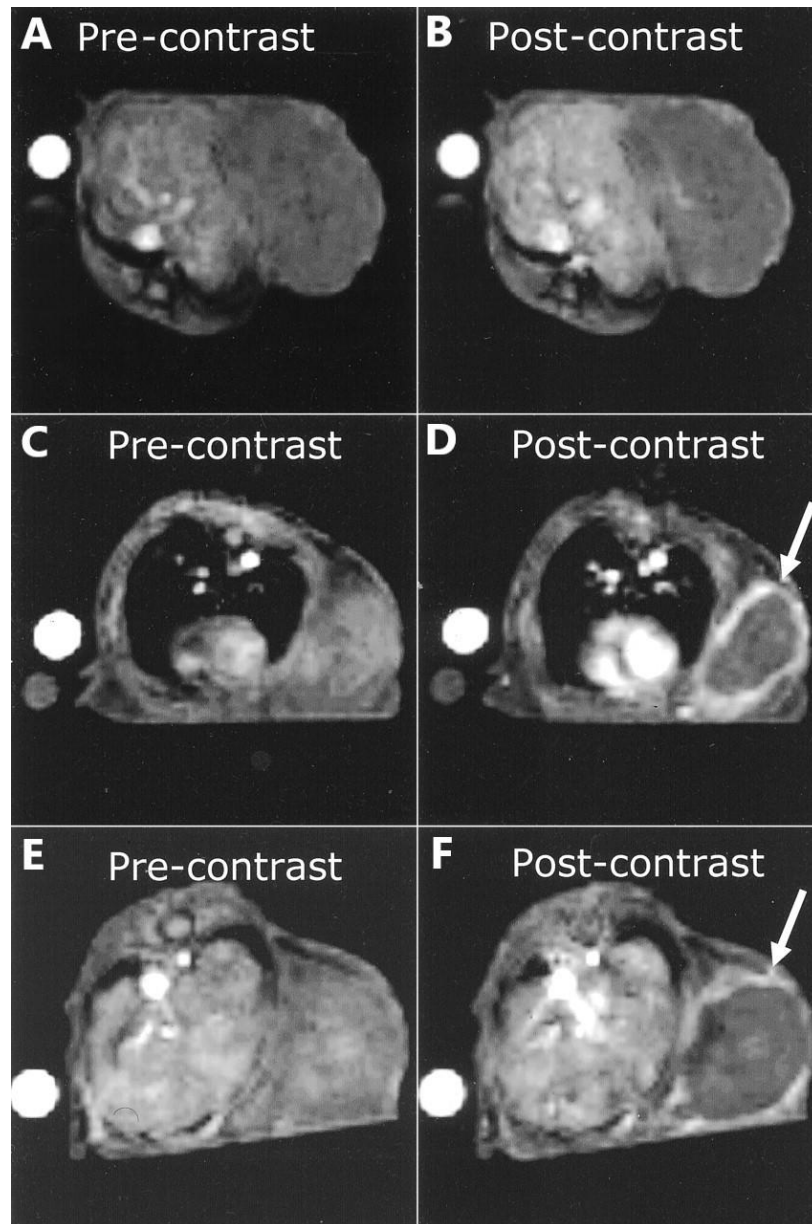


Figura 5.11 In quest'ultima figura sono presenti un animale non trattato (controllo) al settimo giorno (A e B) e due animali trattati con SU6668 al 7° (C e D) e al 14° (E e F) giorno di trattamento. Tutte le immagini di RM sono T1w. Risulta evidente la differenza tra la distribuzione del mezzo di contrasto tra il controllo e i soggetti trattati. Inoltre, l'aumento dello strato peritumorale, già osservato nelle immagini al terzo giorno, risulta essere ulteriormente pronunciato (indicato dalle frecce in bianco).

## 6. Discussione e conclusioni

Questo lavoro di tesi ha lo scopo di porre maggiore attenzione sull'utilizzo della risonanza magnetica nei vari protocolli sperimentali. L'introduzione di questa tecnica di imaging potrebbe essere il punto d'incontro tra il rispetto del benessere animale e l'inevitabile utilizzo di individui sperimentali. L'imaging di piccoli animali da laboratorio (come topi, ratti, criceti, gerbilli...), noto come imaging preclinico, risulta essere uno strumento molto importante per la ricerca biomedica preclinica. Le tecniche di imaging forniscono la possibilità di analizzare in modo non invasivo la struttura e la funzione biologica in vivo dei modelli animali. Ma soprattutto di eseguire più analisi lungo l'intera vita dell'animale, monitorando lo sviluppo di una determinata patologia o l'efficacia di un trattamento sullo stesso animale. Il rapido sviluppo che ha avuto la tecnologia di imaging preclinico negli ultimi decenni ha consentito di produrre immagini ad alta risoluzione, diventando fondamentale per tutti i campi della ricerca biomedica, in particolare nella ricerca preclinica sui tumori. Il topo è il modello sperimentale di scelta in quanto possiede un'omologia genetica elevata con l'uomo, un'elevata possibilità di manipolazione genetica e la possibilità di eseguire xenotrapianti. Ma anche il ratto rappresenta un animale importante, in particolare nelle neuroscienze, dovuto al fatto che sono disponibili numerosi modelli sperimentali consolidati e inoltre il cervello è di maggiori dimensioni (Cherry & Gambhir, 2001). L'imaging di piccoli animali consente quindi lo studio longitudinale dei modelli animali, sia per quanto riguarda le patologie sia per i trattamenti, diminuendo considerevolmente il numero di animali richiesti nei vari protocolli sperimentali e migliorando la qualità statistica dei dati. Inoltre, sono in corso molteplici studi per ridurre non solo il numero di animali utilizzati per singolo esperimento ma anche per ridurre il numero di studi in generale, cercando di standardizzare i protocolli di imaging. Diversi fattori come l'anestesia, la manipolazione degli animali, il digiuno o la somministrazione di agenti di contrasto, possono influenzare sia la riproducibilità che la comparabilità tra più gruppi di ricerca. Quindi, standardizzare le varie procedure di imaging permetterebbe una riduzione collettiva del numero di animali utilizzati in sperimentazione (Mannheim et al., 2018). Come illustrato nei capitoli precedenti le tecniche di imaging preclinico sono molteplici, tra le più importanti troviamo la risonanza magnetica, la tomografia computerizzata, la bioluminescenza,



l'ecografia e la tomografia ad emissione di positroni, ciascuna con i propri vantaggi e svantaggi. Negli anni ha assunto importanza la combinazione delle diverse tecniche di imaging, per esempio associando l'imaging anatomico della risonanza magnetica con l'imaging della PET, combinando due importanti informazioni: cosa sta avvenendo e in quale regione anatomica. Questa sinergia ha permesso di ottenere risultati sempre più completi, ma non solo, anche di ammortizzare sempre più il numero di animali necessari per la sperimentazione. La PET/MRI è stata ritenuta la modalità più sinergica da utilizzare per l'imaging preclinico. Con i continui miglioramenti negli anni, la PET/MRI dovrebbe essere considerata come il sistema di prima scelta per gli studi preclinici basati sull'imaging, in quanto è considerata la combinazione multimodale del futuro (Miyaoka & Lehnert, 2020). Per questo e per la natura non invasiva della risonanza magnetica preclinica, è considerata un'ottima alternativa alle tecniche convenzionali e invasive. Abbiamo visto nei capitoli precedenti solo alcune delle tecniche di risonanza magnetica, le quali risultano essere veramente efficaci nell'ottenere sempre più informazioni da un solo soggetto. È quindi di vitale importanza l'introduzione di tecniche minimamente invasive come la MRI nei laboratori sperimentali. Il continuo sviluppo e progresso che sta avendo la tecnologia, permetterà sempre più, di anno in anno, la nascita di tecniche di risonanza magnetica più accurate, che permetteranno in un futuro non troppo distante il completo rispetto del concetto delle 3R di Russel e Burch, in particolare della "Reduction". Ora risulta essere più chiaro del perché le 3R dovrebbero essere considerate sistematicamente quando si utilizzano animali per la ricerca scientifica, ma soprattutto del perché la RM sia un ottimo strumento per riuscire a rispettarle. Riuscire a unire tutte le informazioni riguardo la sperimentazione animale in particolar modo sulla "Reduction" non è stato facile. L'utilizzo di questi animali non è di certo vano, anzi, se molte malattie sono state rese curabili è proprio grazie all'utilizzo di questi animali. Perlomeno in Europa, è ormai superato quel periodo dove moltissimi animali venivano utilizzati e sacrificati in sperimentazione. Proprio per questo, in questa tesi ritengo importante sottolineare l'importanza dell'introduzione delle tecnologie di imaging, in particolare la MRI, nel campo della sperimentazione animale. Gli esperimenti sopra riportati ne sono un esempio. Grazie alla RM molti meno animali sono stati utilizzati, permettendo sia la loro sopravvivenza per tutta la durata dell'esperimento, sia di effettuare studi longitudinali. La traslazione dei dati acquisiti sugli animali non è perfettamente compatibile con l'uomo,

tuttavia i risultati ottenuti sono e saranno utili per lo sviluppo della medicina. La completa abrogazione dell'utilizzo di animali in sperimentazione non è possibile, almeno per ora, per questo dobbiamo puntare sul rispetto del benessere di questi animali e la risonanza magnetica ha tutte le capacità per poterlo fare. In quanto, l'introduzione di questa tecnica di imaging gioverebbe sia in ambito "Reduction" che in ambito "Refinement", andando quindi a ridurre il numero di animali ma anche riducendo in modo importante tutte le tecniche invasive che verrebbero utilizzate in assenza della MRI.

## 7. Bibliografia

Ahookhosh K., Vanoirbeek J., Vande Velde G., 2023. Lung function measurements in preclinical research: What has been done and where is it headed?. *Frontiers in Physiology*, volume 14. doi: 10.3389/fphys.2023.1130096.

Ashton J.R., West J.L., Badea C.T., 2015. In vivo small animal micro-CT using nanoparticle contrast agents. *Front Pharmacology*, volume 6. doi: 10.3389/fphar.2015.00256.

Avni R., Neeman M., Garbow J.R., 2015. Functional MRI of the placenta-From rodents to humans. *Placenta*, volume 36(6), pagine 615-622. doi: 10.1016/j.placenta.2015.04.003.

Bakermans A.J., Desiree Abdurrachim, Rik P.M. Moonen, Abdallah G. Motaal, Jeanine J. Prompers, Gustav J. Strijkers, Katrien Vandoorne, Klaas Nicolay, 2015. Small animal cardiovascular MR imaging and spectroscopy. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, volume 88–89, pagine 1-47. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2015.03.001>.

Busato A., Fumene Feruglio P., Parnigotto P.P., Marzola P., Sbarbati A., 2016. In vivo imaging techniques: a new era for histochemical analysis. *European Journal of Histochemistry*, volume 60(4). doi: 10.4081/ejh.2016.2725.

Chatham J.C., Blackband S.J., 2001. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Imaging in Animal Research. *ILAR Journal*, volume 42(3), pagine 189–208. doi: <https://doi.org/10.1093/ilar.42.3.189>.

Cheng M., Glunde K., 2018. Magnetic Resonance Spectroscopy Studies of Mouse Models of Cancer. *Preclinical MRI-Methods in Molecular Biology*, volume 1718, pagine 331-345. doi: 10.1007/978-1-4939-7531-0\_20.

Cherry S.R., Gambhir S.S., 2001. Use of Positron Emission Tomography in Animal Research. *ILAR Journal*, volume 42(3), page 219–232. doi: <https://doi.org/10.1093/ilar.42.3.219>.

Choi S., Takahashi K., Jiang Y., Köhler S., Zeng H., Wang Q., Ma Y., Yu X., 2020. Real-Time fMRI Brain Mapping in Animals. *Journal of Visualized Experiments*, volume 163. doi:10.3791/61463.

Close D.M., Xu T., Saylor G.S., Ripp S., 2011. In vivo bioluminescent imaging (BLI): noninvasive visualization and interrogation of biological processes in living animals. *Sensors*, volume 11(1), page 180-206. doi: 10.3390/s110100180.

De Boo J., Hendriksen C., 2005. Reduction strategies in animal research: a review of scientific approaches at the intra-experimental, supra-experimental and extra-experimental levels. *Alternatives to Laboratory Animals*, volume 33(4), page 369-377. doi: 10.1177/026119290503300404.

Erokwu B., Flask C., Gulani V., 2011. High Field Diffusion Tensor Imaging in Small Animals and Excised Tissue. *In vivo NMR Imaging-Methods in Molecular Biology*, volume 771, page 139-152. doi: [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-219-9\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-219-9_7).

Ferris Craig F., 2022. Applications in Awake Animal Magnetic Resonance Imaging. *Frontiers in Neuroscience*, volume 16. doi: 10.3389/fnins.2022.854377.

Gammon Seth T., Foje Nathan, Brewer Elizabeth M., Owers, Elizabeth, Downs Charles A., Budde Matthew D., Leevy W. Matthew, Helms My N., 2014. Preclinical anatomical, molecular, and functional imaging of the lung with multiple modalities. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, volume 306(10), page 897-914. doi: <https://doi.org/10.1152/ajplung.00007.2014>.

Hao Li, Hui Zhang, Zhiwei Tang, Guangshu Hu, 2008. Micro-computed tomography for small animal imaging: Technological details. *Progress in Natural Science*, volume 18(5), pagine 513-521. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2008.01.002>.

Ku M.C., Huelnhagen T., Niendorf T., Pohlmann A., 2018. Cardiac MRI in Small Animals. *Preclinical MRI-Methods in Molecular Biology*, volume 1718, pagine 269-294. doi: [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7531-0\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7531-0_16).

Laviña B., 2016. Brain Vascular Imaging Techniques. *International Journal of Molecular Sciences*, volume 18(1), pagina 70. doi: [10.3390/ijms18010070](https://doi.org/10.3390/ijms18010070).

Lee D., Marcinek D., 2009. Noninvasive in vivo small animal MRI and MRS: basic experimental procedures. *Journal of Visualized Experiments*, volume 32. doi: [10.3791/1592](https://doi.org/10.3791/1592).

Lee Y., Kim H., 2015. Assessment of diffusion tensor MR imaging (DTI) in liver fibrosis with minimal confounding effect of hepatic steatosis. *Magnetic Resonance in Medicine*, volume 73(4), pagine 1602-1608. doi: <https://doi.org/10.1002/mrm.25253>.

Lefrançois W., Thiaudière E., Ben Hassen W., Sanchez S., Franconi J.-M., Miraux, S., 2011. Fast whole-body magnetic resonance angiography in mice. *Magnetic Resonance in Medicine*, volume 66, pagine 32-39. doi: <https://doi.org/10.1002/mrm.22985>.

Ma X., Cheng Z., 2020. Positron Emission Tomography (PET) Imaging in Live Animals. *Handbook of In Vivo Chemistry in Mice*, volume 5, pagine 127-149. doi: <https://doi.org/10.1002/9783527344406.ch5>.

Mannheim J.G., F. Kara, J. Doorduyn, K. Fuchs, G. Reischl, S. Liang, M. Verhoye, F. Gremse, L. Mezzanotte, M.C. Huisman, 2018. Standardization of Small Animal Imaging—Current Status and Future Prospects. *Molecular Imaging and Biology*, volume 20, pagine 716–731. doi: <https://doi.org/10.1007/s11307-017-1126-2>.

Mannucci, Tambalo, Conti, Ghin, Milanese, Carboncino, Nicolato, Marinozzi, Benati, Bassi, Marzola, Sbarbati, 2018. Magnetosomes Extracted from *Magnetospirillum gryphiswaldense* as Theranostic Agents in an Experimental Model of Glioblastoma. *Contrast Media & Molecular Imaging*, vol. 2018. doi: <https://doi.org/10.1155/2018/2198703>.

Marzola, Degrassi, Calderan, Farace, Crescimanno, Nicolato, Giusti, Pesenti, Terron, Sbarbati, Abrams, Murray, Osculati, 2004. In Vivo Assessment of Antiangiogenic Activity of SU6668 in an Experimental Colon Carcinoma Model. *Clinical Cancer Research*, volume 10(2), pagine 739–750. doi: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-0828-03>.

Meßner N.M., Frank G. Zöllner, Raffi Kalayciyan, Lothar R. Schad, 2014. Pre-clinical functional Magnetic Resonance Imaging part II: The heart. *Zeitschrift für Medizinische Physik*, volume 24(4), pagine 307-322. doi: <https://doi.org/10.1016/j.zemedi.2014.06.008>.

Miyaoka R.S., Lehnert A.L., 2020. Small animal PET: a review of what we have done and where we are going. *Physics in Medicine & Biology*, volume 65(24). doi: [10.1088/1361-6560/ab8f71](https://doi.org/10.1088/1361-6560/ab8f71).

Moran Carmel M., Thomson Adrian J. W., 2020. Preclinical Ultrasound Imaging—A Review of Techniques and Imaging Applications. *Frontiers in Physics*, volume 8. doi: [10.3389/fphy.2020.00124](https://doi.org/10.3389/fphy.2020.00124).

Mori S., Zhang J., 2006. Principles of Diffusion Tensor Imaging and Its Applications to Basic Neuroscience Research. *Neuron*, volume 51(5), pagine 527-539. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.08.012>.

Müller H.S., Brenner D., Roselli F., Wiesner D., Abaei A., Gorges M., Danzer K. M., Ludolph A.C., Tsao W., Wong P.C., Rasche V., Weishaupt J.H., Kassubek J., 2019. Longitudinal diffusion tensor magnetic resonance imaging analysis at the cohort level reveals disturbed cortical and callosal microstructure with spared corticospinal tract in the TDP-43G298S ALS mouse model. *Translational Neurodegeneration*, volume 8. doi: <https://doi.org/10.1186/s40035-019-0163-y>.

Müller H.S., Roselli F., Rasche V., Kassubek J., 2020. Diffusion Tensor Imaging-Based Studies at the Group-Level Applied to Animal Models of Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Neuroscience*, volume 14. doi: [10.3389/fnins.2020.00734](https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00734).

Nagpal P., Grist T.M., 2023. MR Angiography: Contrast-Enhanced Acquisition Techniques. *Magnetic Resonance Imaging Clinics of North America*, volume 31(3), page 493-501. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mric.2023.04.007>.

Oudeman J., Nederveen A.J., Strijkers G.J., Maas M., Luijten P.R., Froeling, M., 2016. Techniques and applications of skeletal muscle diffusion tensor imaging: A review. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, volume 43(4), page 773-788. doi: <https://doi.org/10.1002/jmri.25016>.

O'Neill K., Lyons S.K., Gallagher W.M., Curran K.M., Byrne A.T., 2010. Bioluminescent imaging: a critical tool in pre-clinical oncology research. *J. Pathol.*, volume 220(3), page 317-327. doi: <https://doi.org/10.1002/path.2656>.

Öz G., Tkáč I., Uğurbil K., 2013. Animal models and high field imaging and spectroscopy. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, volume 15(3), page 263-278. doi: [10.31887/DCNS.2013.15.3/goz](https://doi.org/10.31887/DCNS.2013.15.3/goz).

Panda A., Christopher J. Francois, Candice A. Bookwalter, Abhishek Chaturvedi, Jeremy D. Collins, Tim Leiner, Prabhakar Shantha Rajiah, 2023. Non-Contrast Magnetic Resonance Angiography: Techniques, Principles, and Applications. *Magnetic Resonance Imaging Clinics of North America*, volume 31(3), pagine 337-360. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mric.2023.04.001>.

Prompers J.J., Gustav J. Strijkers, Klaas Nicolay, 2011. Magnetic resonance spectroscopy of in vivo tissue metabolism in small animals. *Drug Discovery Today: Technologies*, volume 8(2-4), pagine 95-102. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2011.11.009>.

Reimann C., Brangsch J., Adams L.C., Thöne-Reineke C., Hamm B., Makowski M.R., 2019. MR Angiography of the Head/Neck Vascular System in Mice on a Clinical MRI System. *Contrast Media & Molecular Imaging*, volume 2019. doi: [10.1155/2019/5461809](https://doi.org/10.1155/2019/5461809).

Rigotti, Chirumbolo, Cicala, Parnigotto, Nicolato, Calderan, Conti, Sbarbati, 2020. Negative Pressure From an Internal Spiral Tissue Expander Generates New Subcutaneous Adipose Tissue in an In Vivo Animal Model. *Aesthetic Surgery Journal*, volume 40(4), pagine 448-459. doi: <https://doi.org/10.1093/asj/sjz194>.

Ritelli, Ngaleu, Bontempi, Dandrea, Nicolato, Boschi, Fiorini, Calderan, Scarpa, Marzola, 2015. Pancreatic cancer growth using magnetic resonance and bioluminescence imaging. *Magnetic Resonance Imaging*, volume 33(5), pagine 592-599. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mri.2015.02.017>.

Russell W., Burch R., 1959. *The principles of humane experimental technique*.

Sadikot R.T., Blackwell T.S., 2005. Bioluminescence imaging. *Proceedings of the American Thoracic Society*, volume 2(6), pagine 537-540. doi: [10.1513/pats.200507-067DS](https://doi.org/10.1513/pats.200507-067DS).



Saini A., Wallace A., Albadawi H., Naidu S., Alzubaidi S., Knuttinen M.G., Panda A., Oklu R., 2018. Quiescent-Interval Single-Shot Magnetic Resonance Angiography. *Diagnostics*, volume 8(4), pagina 84. doi: 10.3390/diagnostics8040084.

Schaeffer D.J., Liu C., Silva A.C., Everling S., 2020. Magnetic Resonance Imaging of Marmoset Monkeys. *ILAR Journal*, volume 61(2-3), pagine 274-285. doi: 10.1093/ilar/ilaa029.

Seong-Gi Kim, 2018. Biophysics of BOLD fMRI investigated with animal models. *Journal of Magnetic Resonance*, volume 292, pagine 82-89. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2018.04.006>.

Strijkers G.J., Bouts A., Blankesteyn W.M., Peeters T.H.J.M., Vilanova A., Van Prooijen M.C., Sanders H.M.H.F., Heijman E., Nicolay K., 2009. Diffusion tensor imaging of left ventricular remodeling in response to myocardial infarction in the mouse. *NMR in Biomedicine*, volume 22(2), pagine 182-190. doi: <https://doi.org/10.1002/nbm.1299>.

Vaquero J.J., Kinahan P., 2015. Positron Emission Tomography: Current Challenges and Opportunities for Technological Advances in Clinical and Preclinical Imaging Systems. *Annual Review of Biomedical Engineering*, volume 17, pagine 385-414. doi: 10.1146/annurev-bioeng-071114-040723.

Wang B., Li J., Wang Y., 2021. Magnetic resonance diffusion tensor imaging applied to rat model of contrast-induced acute kidney injury. *PeerJ*, volume 9. doi: 10.7717/peerj.10620.

Wathen C.A., Foje N., Van Avermaete T., Miramontes B., Chapaman S.E., Sasser T.A., Kannan R., Gerstler S., Leevy W.M., 2013. In vivo X-ray computed tomographic imaging of soft tissue with native, intravenous, or oral contrast. *Sensors*, volume 13(6), pagine 6957-6980. doi: 10.3390/s130606957.

Wheaton A.J., Miyazaki M., 2012. Non-contrast enhanced MR angiography: Physical principles. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, volume 36(2), pagine 286-304. doi: <https://doi.org/10.1002/jmri.23641>.

Wu D., Xu J., McMahon M.T., van Zijl P.C., Mori S., Northington F.J., Zhang J., 2013. In vivo high-resolution diffusion tensor imaging of the mouse brain. *NeuroImage*, volume 83, pagine 18-26. doi: [10.1016/j.neuroimage.2013.06.012](https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.06.012).

Xifan Chen, Chuanjun Tong, Zhe Han, Kaiwei Zhang, Binshi Bo, Yanqiu Feng, Zhifeng Liang, 2020. Sensory evoked fMRI paradigms in awake mice. *NeuroImage*, volume 204(2), pagine 116-242. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2019.116242>.

Yon Maxime, Bao Qingjia, Chitrit Odélie Jacqueline, Henriques Rafael Neto, Shemesh Noam, Frydman Lucio, 2020. High-Resolution 3D in vivo Brain Diffusion Tensor Imaging at Ultrahigh Fields: Following Maturation on Juvenile and Adult Mice. *Frontiers in Neuroscience*, volume 14. doi: [10.3389/fnins.2020.590900](https://doi.org/10.3389/fnins.2020.590900).

Zhou J.Y., Wang Y.C., Zeng C.H., Ju S.H., 2018. Renal Functional MRI and Its Application. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, volume 48(4), pagine 863-881. doi: [10.1002/jmri.26180](https://doi.org/10.1002/jmri.26180).

Zöllner F.G., Raffi Kalayciyan, Jorge Chacón-Caldera, Fabian Zimmer, Lothar R. Schad, 2014. Pre-clinical functional Magnetic Resonance Imaging part I: The kidney. *Zeitschrift für Medizinische Physik*, volume 24(4), pagine 286-306. doi: <https://doi.org/10.1016/j.zemedi.2014.05.002>.

## **8. Webgrafia**

Dati statistici sulla sperimentazione animale [online] (ultimo aggiornamento 10/02/2022). Ministero della salute. [Consultato il 1 Giugno 2024]. Disponibile da: [www.salute.gov.it](http://www.salute.gov.it)

MRI Signal-to-Noise Ratio (SNR) and Image Quality [online] (senza data). MRI Master. [Consultato il 1 Giugno 2024]. Disponibile da: <https://mrimaster.com/snr/>

Structural MRI Imaging [online] (senza data). UC San Diego School of Medicine. [Consultato il 1 Giugno 2024].  
Disponibile da: <http://fmri.ucsd.edu/Howto/3T/structure.html>