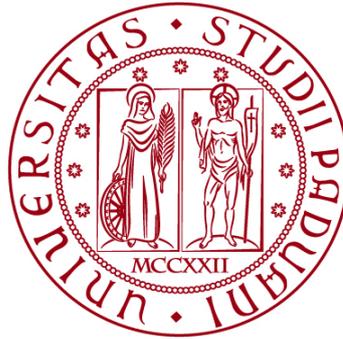


Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Biologia

Corso di Laurea in Biotecnologie



Elaborato di Laurea

**VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI IN VIVO ED IN VITRO
DEL FENTANYL MEDIANTE
INDAGINI TRASCRITTOMICHE (RNA-SEQ)**

Tutor: Prof.ssa Mery Giantin

Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione

Laureanda: Laura Gavioli

Anno Accademico 2023/2024

ABSTRACT

L'oppioide sintetico fentanyl è uno dei principali responsabili dell'attuale crisi di dipendenza da oppioidi. È uno degli analgesici oppioidi più comunemente somministrati a pazienti sottoposti a interventi chirurgici o per la gestione del dolore cronico. Sebbene siano noti gli effetti collaterali dell'abuso cronico di fentanyl (ad esempio dipendenza, tolleranza, compromissione delle funzioni cognitive e inibizione della nocicezione, dell'eccitazione e della respirazione), rimane poco chiaro quali e come i cambiamenti nell'attività cerebrale dovuti all'uso cronico di fentanyl influenzino i rispettivi risultati comportamentali. Il disturbo da uso di oppioidi (OUD) è inoltre coinvolto in importanti patologie ostetriche, provocando danni al feto ancora in periodo prenatale. Questo elaborato di tesi presenta due studi che vanno entrambi ad investigare gli effetti tossici del fentanyl analizzando il trascrittoma mediante RNA-Seq. In particolare, uno studio utilizza un approccio *in vitro* analizzando co-culture di cellule neuronali, e l'altro valuta la tossicità *in vivo* su trofoblasti umani. Alcuni risultati ottenuti sono promettenti e gettano le basi per studi futuri, mentre altri necessitano di ulteriori approfondimenti vista l'importanza della tematica in questione.

INDICE

1. STATO DELL'ARTE	4
1.1 STORIA	4
1.2 FARMACOLOGIA	5
1.3 TOSSICITÀ	7
2. MATERIALI E METODI	8
2.1 STUDIO 1 (Lam et al., 2022)	8
2.1.1 Tecnologia Brain-on-a-Chip	8
2.1.2 Reagente chimico	9
2.1.3 Registrazione elettrofisiologica	9
2.1.4 Analisi della vitalità	9
2.1.5 Immunocitochimica	9
2.1.6 Sequenziamento e analisi bioinformatica dei dati	10
2.1.7 Analisi statistica	10
2.2 STUDIO 2 (Sadovsky et al., 2023)	11
2.2.1 Partecipanti allo studio e biopsie placentari	11
2.2.2 Colture cellulari	11
2.2.3 Estrazione dell'RNA e sequenziamento	12
2.2.4 Quantitative Real-Time PCR	13
2.2.5 Analisi statistica	13
3. RISULTATI	13
3.1 STUDIO 1 (Lam et al., 2022)	13
3.1.1 Effetti sull'attività della rete neurale	13
3.1.2 Effetti sulla vitalità	15
3.1.3 Effetti sul trascrittoma	16
3.2 STUDIO 2 (Sadovsky et al., 2023)	18
4. DISCUSSIONE	22
5. BIBLIOGRAFIA	24

1. STATO DELL'ARTE

Con il termine “fentanyl” si intende un oppioide sintetico ampiamente utilizzato in medicina umana, principalmente come anestetico e analgesico. In particolare, è stato approvato dalla FDA (Food and Drug Administration) nel 1968 come coadiuvante nel mantenimento dell’anestesia totale e locale e per la gestione del dolore cronico persistente, soprattutto in ambito oncologico e a scopo palliativo (Stanley, 2014).

Gli oppioidi comprendono sia peptidi endogeni che sostanze sintetiche aventi proprietà simili agli oppiacei, composti naturali (come morfina e codeina) isolati dai papaveri. Gli oppioidi si legano ad uno dei recettori oppioidi accoppiati a proteine G (Raffa et al., 2018).

1.1 STORIA

Il fentanyl è stato sintetizzato per la prima volta nel 1960 dal dottor Paul Janssen e la sua azienda (Janssen Pharmaceutica), in Belgio. La sua idea era produrre analgesici più potenti e specifici di quelli già esistenti, avendo allo stesso tempo minori effetti collaterali e maggiori indici terapeutici (IT). Janssen e i suoi colleghi sono partiti dal farmaco meperidina, analgesico già noto dal 1939: hanno pensato che il responsabile dell’effetto analgesico fosse l’anello piperidinico, presente nella molecola di partenza e anche nella morfina (Fig. 1) (Raffa et al., 2018).

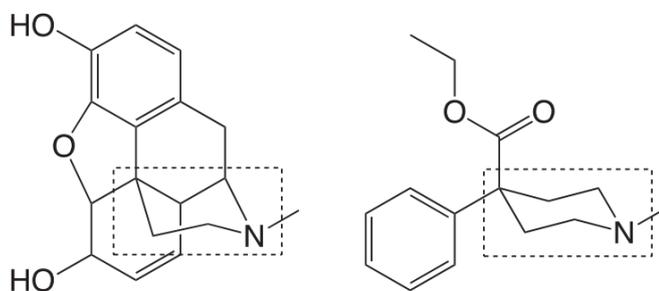


Figura 1: Struttura chimica della morfina (a sinistra) e della meperidina (a destra), con l’anello piperidinico in evidenza

Morfina e meperidina risultano poco efficaci poiché non riescono a penetrare la barriera emato-encefalica e raggiungere il sistema nervoso centrale (SNC). Il gruppo di ricercatori comincia quindi a produrre molecole più lipofile, aggiungendo sostituenti quali anelli benzenici, gruppi metilici, ammine, ecc. Tra i due analgesici Janssen ha preferito modificare la meperidina perché è una molecola meno complessa della morfina, e quindi più facile da manipolare (Raffa et al., 2018). Per avere una maggiore potenza era necessario che i composti si legassero al recettore corretto, all’epoca noto come “recettore del dolore” e oggi chiamato recettore μ -oppioide (MOR, *Mu Opioid Receptor*); sono stati aggiunti quindi ulteriori sostituenti che migliorassero l’affinità di legame (Stanley, 2014).

Seguendo questa strategia Janssen insieme al suo team ha sintetizzato numerose molecole, arrivando al fentanyl (Fig. 2).

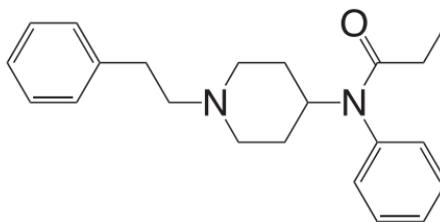


Figura 2: Struttura chimica del fentanyl

All'epoca della sua creazione era l'oppiode più potente (100 volte più della morfina) e liposolubile, con l'insorgenza dell'effetto farmacologico più rapida e l'IT più elevato. Successivamente, variando i sostituenti, ne sono stati creati diversi analoghi (Raffa *et al.*, 2018).

1.2 FARMACOLOGIA

Ad oggi il fentanyl è classificato come agonista oppioide: i recettori oppioidi consistono in 7 eliche transmembrana e sono accoppiati a proteine G inibitorie (G_i). Vengono divisi in 4 sottoclassi, di cui il fentanyl lega prevalentemente i μ , venendo definito di conseguenza oppioide μ -selettivo. Questi recettori sono presenti nei circuiti neurali nocicettivi, in particolare nelle vie discendenti responsabili della modulazione della trasmissione del dolore a livello del midollo spinale. Sono presenti anche in zone mesencefaliche, limbiche e corticali. I recettori oppioidi sono espressi anche in zone del SNC coinvolte nel meccanismo di reward e aree cerebrali legate alle emozioni (Al-Hasani *et al.*, 2011). Qui il legame con oppioidi porta all'insorgenza di effetti collaterali che verranno esaminati successivamente.

Il meccanismo d'azione analgesico del farmaco prevede l'intervento delle proteine G_i , a livello delle quali il GDP viene scambiato con GTP in seguito all'attivazione dei recettori. La subunità $G_i\alpha$ -GTP provoca una sottoregolazione dell'adenilato ciclasi e quindi una riduzione della concentrazione di AMPc; questa riduce a sua volta il flusso di ioni calcio all'interno della cellula. In contemporanea vengono attivati i canali del potassio, provocando una fuoriuscita dello ione dalla cellula. Si instaura quindi una generale condizione di iperpolarizzazione nella cellula, che porta ad un'inibizione dell'attività neurale. Questa si traduce in un'inibizione della trasmissione del dolore nel midollo spinale (Al-Hasani *et al.*, 2011).

Il fentanyl determina l'insorgenza dell'effetto farmacologico dopo 30 secondi dall'assunzione e ha una durata d'azione di 30-60 minuti dopo una somministrazione di 100 mcg per via endovenosa. È considerato un farmaco a breve durata d'azione se viene assunto per un periodo di tempo limitato: si verifica una redistribuzione e un accumulo nel grasso e nel muscolo scheletrico

che porta ad una diminuzione della concentrazione plasmatica di fentanyl. Se usato nel lungo periodo diventa un farmaco a lunga durata d'azione: i depositi si saturano, quindi si forma un accumulo sistemico che si traduce in una diminuzione più lenta della concentrazione plasmatica dell'oppioide (*Waldman, 2011*). Il fentanyl viene metabolizzato a livello epatico dal citocromo P450 3A4 (CYP3A4): il 99% viene N-dealchilato a norfentanyl, metabolita inattivo e non tossico, e il resto viene convertito principalmente in altri metaboliti inattivi. Nell'arco di 72 ore, una dose di farmaco viene escretata per il 75% nelle urine e per il 9% nelle feci, con una piccola porzione (<7%) escretata non metabolizzata nelle urine (*Ramos-Matos et al., 2023*).

A seconda dell'uso terapeutico il fentanyl può essere somministrato tramite diverse vie, elencate di seguito.

- Via endovenosa e intramuscolare: forma iniettabile utilizzata per l'analgesia a breve termine, nella gestione del dolore acuto o post-operatorio, e per il mantenimento dell'anestesia locale o totale. La concentrazione massima viene raggiunta rapidamente, e questo può portare ad una depressione respiratoria acuta. Data la breve durata d'azione del farmaco, una singola somministrazione parenterale non è adatta per la gestione del dolore cronico (*Waldman, 2011*). Costituisce la via di somministrazione più invasiva.
- Via transcutanea: si tratta spesso di cerotti transdermici a rilascio prolungato, utilizzati per il trattamento del dolore cronico. La biodisponibilità del farmaco si aggira attorno al 92% (*Waldman, 2011*).
- Via transmucosa orale: compresse sublinguali o pastiglie buccali (poste tra le gengive e le guance) che si dissolvono lentamente e vengono assorbite rapidamente dalla mucosa orale. Vengono utilizzate per la gestione del dolore episodico intenso (*breakthrough pain*) che si manifesta di frequente nei pazienti oncologici, che necessitano di un controllo del dolore ventiquattrore su ventiquattro. La biodisponibilità di questo tipo di somministrazione è compresa tra il 50% e il 65% (*Nardi-Hiebl et al., 2021*).
- Via intranasale: farmaco assunto sotto forma di spray, è indicata per lo stesso uso terapeutico della via transmucosale. Anche con questo tipo di somministrazione l'assorbimento è rapido, e quindi l'insorgenza dell'effetto è paragonabile a quella dell'iniezione endovenosa. Studi hanno dimostrato che il fentanyl intranasale presenta una biodisponibilità molto elevata (fino ad 89%) e un periodo più breve per raggiungere la massima concentrazione plasmatica, e di conseguenza un sollievo dal dolore più rapido, rispetto alle altre vie di somministrazione non invasive (*Nardi-Hiebl et al., 2021*).

Non viene sfruttata la somministrazione orale perché la biodisponibilità del farmaco sarebbe troppo bassa (32%) a causa dell'effetto di primo passaggio. Il filtro epatico viene invece evitato con gli altri tipi di somministrazione: l'efflusso delle mucose e attraverso la cute confluisce direttamente nella circolazione sistemica (*Nardi-Hiebl et al., 2021*).

1.3 TOSSICITÀ

Sfortunatamente le ottime proprietà farmacocinetiche e farmacodinamiche del fentanyl aumentano il rischio di dipendenza e abuso: l'oppioide costituisce uno stimolante dell'umore provocando euforia (similmente all'eroina) e attiva i pathway dopaminergici centrali del reward. Se questi vengono attivati in assenza di dolore portano all'uso ripetuto di fentanyl solo ed esclusivamente per provare piacere. Il reward system (o sistema di ricompensa), una volta attivato, genera dei segnali in una parte del cervello denominata area tegmentale ventrale (VTA) che portano al rilascio di dopamina in un'altra parte del cervello detta nucleus accumbens (NAc). Questo provoca una sensazione di piacere. La necessità di assumere oppioidi aumenta nel tempo ed è legata alla dipendenza e alla tolleranza: quest'ultima si verifica perché le cellule cerebrali dotate di recettori oppioidi diventano via via meno sensibili e reattive alla stimolazione di oppioidi, portando un individuo ad assumerne dosi sempre più elevate. Se questo non avviene si manifestano sintomi di astinenza, tipici della tossicodipendenza (*Kosten e George, 2002*).

I recettori oppioidi, oltre a reward e dipendenza, sono coinvolti anche in meccanismi di depressione e ansia. In caso di abuso cronico del farmaco, si possono avere compromissioni delle funzioni cognitive, sonnolenza, nausea, delirio, rigidità muscolare, bradicardia e depressione respiratoria (*Kosten e George, 2002*), che se non trattata può portare ad arresto cardiaco.

Il disturbo da consumo di oppioidi (OUD, Opioid Use Disorder) è una condizione psicopatologica caratterizzata da un uso cronico di oppioidi che causa compromissioni clinicamente significative. Le diagnosi di OUD sono aumentate del 500% negli Stati Uniti dal 2010 al 2016, e hanno ricominciato a salire negli ultimi anni. Secondo indagini statistiche effettuate dal National Center of Health Statistics, le morti da overdose negli US hanno subito un aumento notevole dal 2019 al 2022. In particolare, quelle causate da overdose di oppioidi sintetici (principalmente fentanyl) sono state 73.838, molte più di quelle causate da cocaina, metanfetamina ed eroina.

Questo elaborato di tesi si pone l'obiettivo di analizzare gli effetti tossici del fentanyl sull'uomo, sintetizzando e presentando due studi aventi approcci diversi ma stessa tecnica di sequenziamento. Lo "Studio 1" è stato condotto in vitro su co-culture neuronali di ratto e ha esaminato i cambiamenti funzionali e molecolari dell'attività della rete neurale corticale mediante analisi trascrittomiche. Lo "Studio

2” è stato condotto in vivo su trofoblasti umani e ha esaminato l’espressione dei recettori oppioidi sulle cellule in questione e gli effetti del fentanyl sul trascrittoma placentare.

2. MATERIALI E METODI

2.1 STUDIO 1 (Lam et al., 2022)

Se da un lato gli effetti collaterali del fentanyl sono ormai noti da decenni, dall’altro rimane ancora da approfondire come l’uso cronico del farmaco alteri l’attività neurale del cervello, e come a sua volta questa alterazione influenzi le funzioni cognitive e comportamentali. Per cercare di chiarire questi aspetti, il presente studio ha utilizzato colture primarie complesse di cellule di ratto costituite da neuroni corticali (Lonza, Walkersville, MD, Stati Uniti), astrociti (Lonza) e precursori di oligodendrociti (ScienCell, Carlsbad, CA, Stati Uniti). L’utilizzo di colture complesse è fondamentale per riprodurre al meglio la complessità e la funzionalità del cervello umano *in vivo* e per replicare in modo accurato la risposta ai farmaci (Enright et al., 2020).

2.1.1 Tecnologia Brain-on-a-Chip

Le piattaforme Brain-on-a-Chip (BoC) sono dei modelli cerebrali *in vitro* in grado di ricreare le interazioni biochimiche e meccanobiologiche presenti *in vivo*. Quelle più recenti combinano colture cellulari murine o umane con MEA (Multi-Electrode Arrays) andando a registrare i potenziali d’azione extracellulari di neuroni primari. I dispositivi BoC permettono di monitorare l’attività elettrochimica delle cellule e quindi la funzionalità della rete neurale; questo li rende particolarmente adatti a valutare gli effetti farmacologici e tossicologici di composti.

In questo studio sono stati utilizzati dei dispositivi Multi-channel System MEA a 6 pozzetti (Multichannel Systems, Reutlingen, Germania), i quali sono stati rivestiti con 0.1 mg/mL di poli-D-lisina (Millipore-Sigma) e lavati con acqua deionizzata. Le cellule di ratto sono state seminate sui dispositivi ad una concentrazione di 3.031 cellule/mm², con percentuali di semina diverse: 79% di neuroni, 16% di astrociti e 5% di precursori di oligodendrociti. La composizione del sistema è stata stabilita basandosi su rapporti pubblicati in studi precedenti effettuati durante il periodo postnatale dei roditori. Le cellule sono state mantenute nel terreno di coltura PNGM™ (Lonza) in un incubatore umidificato e sono state alimentate ogni 3-4 giorni mediante un cambio di terreno pari al 50% del volume utilizzato.

2.1.2 Reagente chimico

Lo studio 1 è partito da una soluzione concentrata di fentanyl (150 μM , Henry Schein, Melville, NY, Stati Uniti): questa è stata diluita con il terreno di coltura fino ad ottenere una soluzione madre di lavoro di 0.15 μM . Questa è stata ulteriormente diluita per ottenere una concentrazione finale di 0.02 μM . In alternativa, la soluzione concentrata può essere diluita direttamente ad una concentrazione di 20 μM . Al 24° giorno *in vitro* (DIV, *days in vitro*) è stato effettuato un cambio di terreno pari al 50% del volume utilizzato, per cui nel singolo pozzetto di coltura la concentrazione finale di fentanyl era di 0.01 o 10 μM . Alle colture non trattate è stato aggiunto esclusivamente terreno di coltura. Due giorni dopo l'esposizione iniziale al fentanyl è stato effettuato un ulteriore cambio di terreno pari al 50% del volume utilizzato con fentanyl o terreno a seconda della condizione di trattamento. Le colture cellulari sono state esposte all'oppioide per un periodo di 4 giorni.

2.1.3 Registrazione elettrofisiologica

I dispositivi MEA sono stati posizionati all'interno di una camera regolata del sistema di registrazione MEA2100 a 256 canali (Multichannel Systems). Per poter monitorare l'attività della rete neurale, ogni dispositivo è stato registrato per 30 minuti ad una frequenza di campionamento di 10 kHz due volte alla settimana, partendo dal 7 DIV. Era stato dimostrato in precedenza che l'attività neurale delle colture complesse utilizzate nel presente studio si stabilizza entro 21-32 DIV (Enright *et al.*, 2020). Di conseguenza, a 24-26 DIV le colture sono state esposte al fentanyl e le registrazioni sono state effettuate entro la prima ora di esposizione e 24, 48, 72 e 96 ore dopo l'esposizione.

2.1.4 Analisi della vitalità

Il saggio CyQUANT™ Lactate Dehydrogenase (LDH) (Thermo Fisher Scientific) in questo studio viene utilizzato per misurare la citotossicità mediata dal fentanyl. È stato eseguito il quarto giorno di esposizione all'oppioide: il procedimento prevede innanzitutto la raccolta del surnatante da colture non trattate (0 μM) e trattate con fentanyl (0.01 o 10 μM). Questo viene poi processato in piastre a 96 pozzetti, secondo le istruzioni del kit. Successivamente sono state lette le assorbanze a 490 e 680 nm utilizzando il lettore di micropiastre multimodale Synergy H1 (BioTek). I dati di assorbanza relativi al trattamento con fentanyl sono stati normalizzati rispetto alla condizione non trattata.

2.1.5 Immunocitochimica

Una parte delle colture primarie di ratto è stata seminata su una piastra a 96 pozzetti (Corning), fissata con paraformaldeide al 4%, lavata con buffer PBS (3X), permeabilizzata con Triton X-100 allo 0.2% e bloccata con siero di capra al 10% in PBS. Le colture sono poi state lavate nuovamente con PBS (3X) per rimuovere eventuali residui cellulari prima dell'applicazione dell'anticorpo

primario. Ne sono stati utilizzati tre diversi tipi: un anticorpo anti- β -tubulina di classe III per i neuroni (Tuji, pollo, 1:200, Neuromics, Edina), uno anti-proteina acida fibrillare gliale per gli astrociti (GFAP, coniglio, 1:500, Sigma-Millipore) e uno anti-fattore di trascrizione oligodendrocitario per gli oligodendrociti (Olig2, topo, 1:500, Sigma-Millipore). Dopo l'incubazione overnight dell'anticorpo primario, le cellule sono state lavate con PBS (3X) e incubate con anticorpi secondari. Sono stati utilizzati un anti-topo di capra legato ad Alexa Fluor 488, un anti-capra di pollo legato ad Alexa Fluor 647 e un anti-capra di coniglio legato ad Alexa Fluor 594 (Life Technologies, Eugene, OR, Stati Uniti). Dopo l'incubazione dell'anticorpo secondario le cellule sono state lavate con PBS (4X) e incubate con il colorante nucleare DAPI (1:3000, ThermoFisher).

2.1.6 Sequenziamento e analisi bioinformatica dei dati

Le colture primarie trattate e non trattate con fentanyl sono state lisate con buffer RLT contenente β -mercaptoetanolo ed è stato conservato il surnatante. Utilizzando delle RNAeasy Mini Spin Columns (Qiagen) l'RNA totale è stato estratto e purificato dal surnatante. Le librerie di sequenziamento sono state preparate utilizzando l'Illumina TruSeq RNA Library Preparation Kit v2 (Illumina, San Diego, CA, Stati Uniti). Questo kit permette di ottenere librerie di mRNA partendo dall'RNA totale: vengono utilizzate biglie magnetiche legate con degli oligo(dT) che andranno a purificare in modo selettivo le molecole di mRNA, sfruttando la coda di poli(A). Successivamente esse vengono frammentate con metodi chimici e retrotrascritte in cDNA a singolo filamento utilizzando come primer dei random esameri. Il secondo filamento di cDNA è stato poi sintetizzato tramite metodo a sostituzione. Per la costruzione delle librerie è necessario rendere *blunt* le estremità dei frammenti tramite l'azione combinata di esonucleasi e DNA polimerasi (frammento di Klenow). Al 5' di ogni filamento viene aggiunta una A, la quale si legherà alla T sporgente al 3' degli adattatori; questi contengono la sequenza complementare dei siti di ibridazione dei primer di sequenziamento e un *index* identificativo. Infine i frammenti vengono sottoposti a denaturazione ed amplificazione tramite PCR, che permette di ottenere la libreria di RNA. Le librerie sono poi state sequenziate mediante l'uso di Illumina NextSeq 500. Le *reads* ottenute sono state analizzate utilizzando diversi tools bioinformatici: inizialmente sono state mappate sul genoma di ratto (rn6) utilizzando STAR, poi sono stati individuati i geni differenzialmente espressi utilizzando edgeR. È stato utilizzato il tool analitico CIBERSORT per estrapolare l'abbondanza di ciascun tipo di cellula all'interno della coltura complessa partendo dai dati di RNA-Seq.

2.1.7 Analisi statistica

I dati riportati nello studio sono stati espressi come media \pm standard error (SE). La significatività statistica dei due gruppi di dati è stata analizzata utilizzando l'ANOVA, seguita dall'analisi post-hoc di Tukey. Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il software "GraphPad" versione 9 (GraphPad Software, San

Diego, CA, Stati Uniti). Un gene è stato considerato differenzialmente espresso in modo significativo quando il p-value del suo FDR (False Discovery Rate) è < 0.05 e il \log_2 fold change è > 0.5 .

2.2 STUDIO 2 (Sadovsky et al., 2023)

È stato affermato in precedenza che il fentanyl, grazie alla sua elevata lipofilia, è in grado di attraversare facilmente la barriera emato-encefalica. Questa stessa caratteristica gli conferisce anche la capacità di attraversare la placenta, aumentando il rischio di esiti avversi della gravidanza (restrizione della crescita fetale, parto prematuro, bambino nato morto). I neonati con esposizione prenatale agli oppioidi sono soggetti a malformazioni perinatali e postnatali, tra cui tassi più elevati di disturbi fisici e del neurosviluppo. Tuttavia, i meccanismi che spiegano l'effetto degli oppioidi sulla gravidanza rimangono sconosciuti. L'ipotesi che sta alla base del presente studio è che gli oppioidi influenzino l'espressione genica trofoblastica, e che l'effetto dipenda dallo stato di differenziazione dei trofoblasti. Queste cellule hanno un ruolo centrale nel mantenimento della salute della gravidanza poiché si trovano all'interfaccia materno-fetale e regolano tutti gli scambi.

2.2.1 Partecipanti allo studio e biopsie placentari

I protocolli di prelievo della placenta utilizzati in questo studio sono stati approvati dall'Institutional Review Board (IRB) dell'Università di Pittsburgh. Le partecipanti (protocollo #20040257) hanno partorito al Magee-Womens Hospital (MWH), Pittsburgh, Pennsylvania, e hanno sottoscritto il consenso informato per il prelievo della biopsia placentare. Esse sono state suddivise in due gruppi: 88 non consumatrici di oppioidi (non-OU) hanno costituito il gruppo di controllo, 9 consumatrici (OUD) hanno costituito invece il gruppo sperimentale. L'età gestazionale delle partecipanti di entrambi i gruppi è paragonabile, con una media di 39.6 settimane.

Le biopsie placentari (5 mm^3) sono state raccolte subito dopo il parto e sono state prelevate da una regione a metà strada tra l'inserzione del cordone e il margine placentare e tra la placca corionica e quella basale. Tutte le biopsie sono state poste per 48 ore in una soluzione RNAlater per la conservazione dell'RNA e poi congelate in azoto liquido per la successiva estrazione.

2.2.2 Colture cellulari

Per lo svolgimento dello studio 2 sono state utilizzate tre fonti di cellule staminali del trofoblasto umano (TS): TS^{CTB} , prodotte dal citotrofoblasto del primo trimestre; TS^{H9} , derivate da cellule staminali pluripotenti naïve riprogrammate; cellule iTS, derivate da cellule somatiche naïve riprogrammate. Le cellule TS presentano proprietà da progenitore trofoblastico. Sono state incluse anche cellule di trofoblasto umano primario (PHT), che rappresentano placente sane a termine.

Queste sono state isolate tramite distacco cellulare, adoperando un protocollo di digestione tissutale con tripsina-DNasi-dispasi e frazionamento in gradiente di Percoll.

Le cellule PHT e TS sono state coltivate a 37°C in un incubatore al 20% di O₂ e 5% di CO₂. Per garantire la differenziazione spontanea e la formazione di sincizi, le cellule PHT sono state coltivate fino a 72 ore in DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium, Corning, New York, NY, Stati Uniti) contenente il 10% di siero fetale bovino (MyClone, Logan, UT, Stati Uniti) e antibiotici. Le cellule TS, invece, sono state coltivate in piastre rivestite da collagene IV (Sigma, C5533-5MG, ST. Louis, MO, Stati Uniti) contenenti il terreno di coltura TS. Questo include il terreno minimo DMEM/F-12, GlutaMAX (Thermo Fisher #10565042) integrato con 0.3% di BSA (Sigma, A9576-50ML), 0.2 % di FBS (Thermo Fisher #1056542), 0.1 mM di β-mercaptoetanolo (Thermo Fisher #31350010), 0.5% di penicillina-streptomina (Thermo Fisher #15140122) e altri fattori e supplementi. Le cellule TS sono state alimentate con il nuovo terreno ogni 3 giorni. Per indurre la differenziazione e la fusione sono state seminate ad una densità di 300.000 cellule per pozzetto su una piastra a 12 pozzetti pre-rivestita con collagene, e coltivate in un terreno di differenziazione per 48 ore prima dell'estrazione dell'RNA. Per verificare l'effetto dell'oppioide, le cellule PHT e TS^{CTB} sono state coltivate nel terreno di staminalità (TS medium) o differenziazione ed esposte a 20 nM di fentanyl (Hikma, codice NDC#00641-6027-25, Eatontown, NJ, Stati Uniti) per 5 ore a 37°C prima dell'estrazione dell'RNA. Le cellule TS^{CTB} sono state esposte anche a concentrazioni crescenti di 20, 50 e 100 nM di fentanyl vs controllo a intervalli di 1 ora, il che riflette il rapido decadimento dell'oppioide, per un totale di 3 ore. È stato testato il fentanyl a 100 nm perché questa concentrazione era nell'intervallo trovato nei pazienti OUD.

2.2.3 Estrazione dell'RNA e sequenziamento

L'RNA è stato isolato dalle biopsie placentari adoperando il reagente TRIzol (Thermo Fisher #15596026) e processato con il RNeasy mini kit (Qiagen #74104, Germantown, MD, Stati Uniti). La qualità dell'RNA è stata valutata usando il kit Agilent HS Total RNA 15-nt (Agilent, DNF-472T33, Santa Clara, CA, Stati Uniti) su un Fragment Analyzer Agilent 5300. La concentrazione dell'RNA è stata quantificata tramite un kit QubitTM di analisi dell'RNA ad alta sensibilità (HS) (Thermo Fisher #Q32855) su un fluorimetro Qubit (Thermo Fisher #Q33238).

Le librerie per il sequenziamento sono state generate con il kit Illumina Stranded Total RNA Prep con Ribo-Zero Plus (Illumina #20040529, San-Diego, CA, Stati Uniti). Per ogni campione sono stati utilizzati 100 ng di RNA, il quale è stato frammentato, legato ad adattatori e amplificato tramite PCR (13 cicli). Per l'amplificazione sono stati usati dei primer che incorporano un *index* identificativo nella sequenza dell'amplicone. La quantificazione delle librerie è

stata effettuata mediante quantitative PCR (qPCR) su Roche LightCycler 480 utilizzando il kit di quantificazione KAPA qPCR (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, Stati Uniti). Le librerie sono state sequenziate su un Illumina NovaSeq 6000 utilizzando una *flow cell* S4 200 (Illumina #20028313), con una lunghezza delle *reads* di 2×100 bp. La generazione delle librerie e il sequenziamento sono stati eseguiti dal University of Pittsburgh Health Sciences Sequencing Core, Children's Hospital of Pittsburgh. Le librerie sono state allineate al genoma umano di riferimento (GRCh38) utilizzando il tool di allineamento STAR.

2.2.4 Quantitative Real-Time PCR

Per l'analisi di mRNA lunghi (mRNA codificanti proteine e lncRNAs) è stato utilizzato il reagente TRIzol per l'estrazione dell'RNA totale, che è stato poi purificato su colonna con il set RNase-Free DNase (Qiagen #79254). Successivamente l'RNA è stato retrotrascritto con il kit High-Capacity cDNA reverse transcription (Thermo Fisher #4368814). La qRT-PCR è stata eseguita utilizzando la SYBR select Master Mix nel sistema QuantStudio™ 5 Real-Time PCR (Thermo Fisher).

2.2.5 Analisi statistica

Le analisi di espressione differenziale dell'RNA sono state condotte utilizzando il pacchetto DESeq2. Per identificare i geni differenzialmente espressi (DEGs) tra pazienti OUD e non-OU è stato utilizzato un modello lineare composto da due fattori: sesso del neonato e anamnesi di assunzione di oppioidi. I dati sono presentati come media ± SD (Standard Deviation). Le analisi statistiche dei dati qRT-PCR sono state svolte con Prism 10.0 (GraphPad, San Diego, CA, Stati Uniti). Per i confronti tra i due gruppi è stato utilizzato il test t di Student. Per i confronti a coppie è stata utilizzata l'ANOVA ad una via con test di Tukey post-hoc. È stato considerato statisticamente significativo un valore di $p < 0.05$.

3. RISULTATI

3.1 STUDIO 1 (Lam et al., 2022)

3.1.1 Effetti sull'attività della rete neurale

I grafici ottenuti dalla registrazione dei dispositivi MEA mostrano l'andamento della *spiking activity* e della *bursting activity*. La prima rappresenta l'output delle reti neuronali ed è costituita infatti dall'insieme dei potenziali d'azione (*spikes*). La seconda rappresenta un altro tipo di output, che consiste in brevi sequenze di picchi ad alta frequenza seguite da intervalli di quiescenza (*bursts*). Osservando i *raster plot*, si può vedere come il fentanyl abbia un effetto dose-dipendente su entrambe le attività. Nella prima ora di esposizione, la differenza tra colture trattate con 0.01 μM (bassa dose) di fentanyl e colture non trattate (0 μM) è meno evidente, mentre lo è maggiormente nel caso di colture trattate con 10 μM (alta

dose). In questo caso si ha una diminuzione sostanziale del numero di *spiking* e *bursting activity*. Le registrazioni giornaliere dei pozzetti contenenti colture trattate a bassa dose hanno mostrato che le due attività sono tornate ai livelli basali. Con l'alta dose di fentanyl, invece, le registrazioni hanno mostrato livelli ridotti di entrambe le attività, che sono persistiti in tutti i punti temporali esaminati (Fig. 3A).

Le caratteristiche dell'attività di *spiking* (Fig. 3B, sinistra) e *bursting* (Fig. 3B, destra) in risposta alle diverse condizioni di trattamento e punti temporali sono state quantificate e normalizzate rispetto all'attività basale (= 1, linea tratteggiata) perché erano presenti variazioni del grado di attività da pozzetto a pozzetto. In termini di attività di *spiking*, non sono state osservate differenze significative tra il trattamento a bassa dose e la condizione non trattata per quanto riguarda numero di *spikes*, *firing rate* (numero di *spikes* per unità di tempo) e intervallo tra *spikes*. Tuttavia, il trattamento ad alte dosi ha mostrato una diminuzione significativa rispetto al controllo o a basse dosi nella maggior parte delle caratteristiche dell'attività a partire da 30 minuti e continuando a 24 e 96 ore. Effetti simili sono stati osservati nell'attività di *bursting* sia per le basse che per le alte dosi di fentanyl, senza differenze significative rispetto alla condizione non trattata o tra i punti temporali. Nel complesso, i risultati suggeriscono che il trattamento ad alte dosi ha un impatto più pronunciato sulle attività di *spiking* e *bursting* rispetto al trattamento a basse dosi.

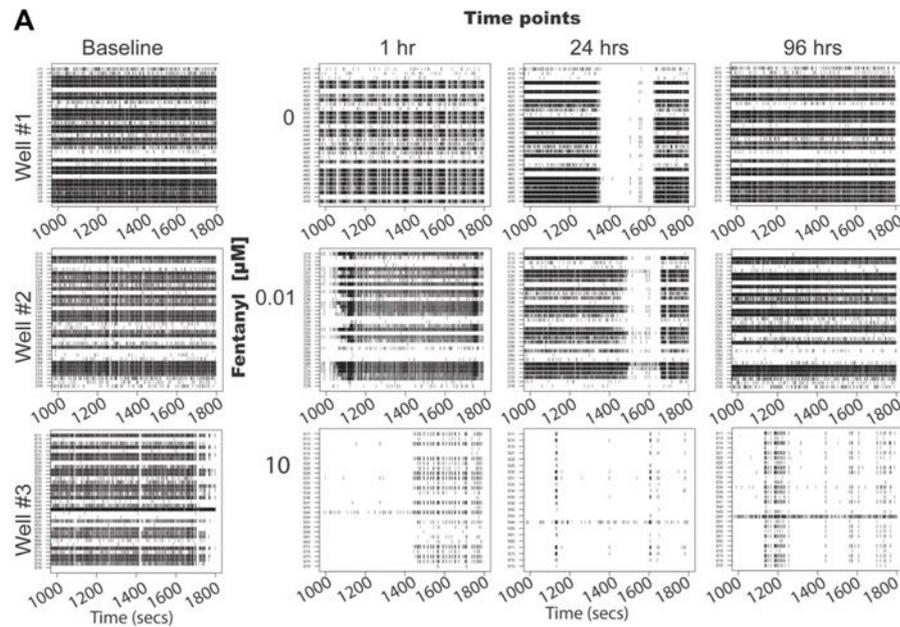


Figura 3A: Raster plots esemplificativi dell'attività neurale delle colture complesse prima e durante l'esposizione subcronica di fentanyl. I grafici mostrano le attività di *spiking* e *bursting* per ciascun elettrodo (riga) prima (baseline) e a 1, 24, 96 ore di esposizione a dosi di fentanyl di 0, 0.01 e 10 μM .

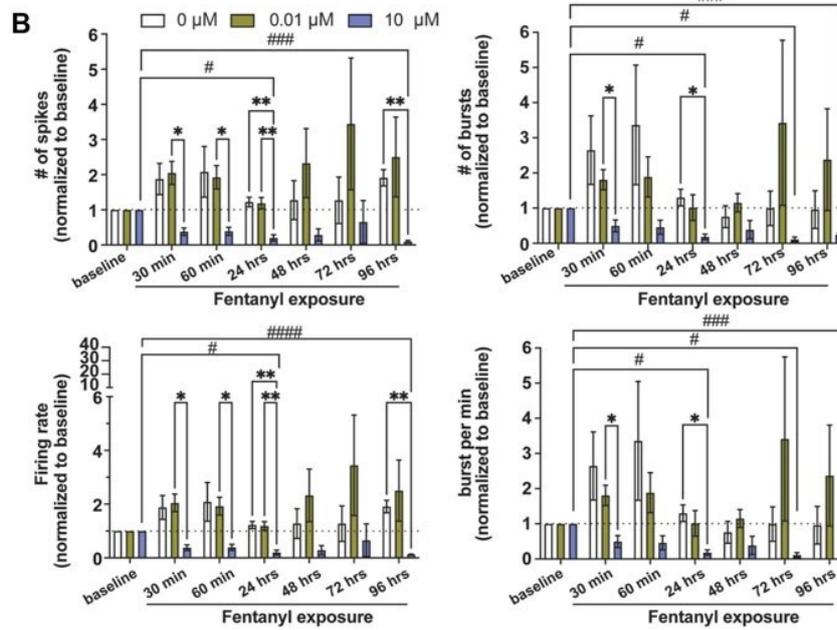


Figura 3B: Grafici a barre riassuntivi le caratteristiche dello spiking (numero di spikes e firing rate, colonna di sinistra) e del bursting (numero di burst e burst al minuto, colonna di destra), prima e durante l'esposizione subcronica di fentanyl. I dati sono normalizzati alla condizione di trattamento basale (linea tratteggiata 1) e sono mostrati come media \pm SE. La significatività statistica è stata indicata con * per evidenziare le differenze tra le condizioni di trattamento, mentre con # per mettere in luce le differenze tempo-dipendenti. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ e ##### $p < 0.0001$.

3.1.2 Effetti sulla vitalità

Dopo 4 giorni di esposizione, non sono stati osservati cambiamenti significativi nella popolazione di neuroni, astrociti e cellule del lignaggio oligodendrocitario. Per valutare l'impatto sulla vitalità cellulare sono stati misurati i livelli di LDH rilasciato dalle colture dopo 96 ore di esposizione, i quali indicano una compromissione dell'integrità della membrana cellulare e quindi la morte delle cellule. Solo le colture trattate con bassa dose di fentanyl hanno mostrato un aumento significativo (1.15 volte) dei livelli di LDH rispetto ai controlli non trattati, suggerendo una potenziale morte cellulare. Questa tendenza è stata osservata anche considerando i dati di immunocitochimica: questi hanno mostrato un aumento significativo ($p < 0.05$) del numero di cellule DAPI-positive (media \pm SE cellule per campo visivo) nella condizione di bassa dose (2168 ± 69 cellule) rispetto al controllo (1549 ± 97 cellule) e ad alta dose (1840 ± 143). Utilizzando CIBERSORT per stimare la proporzione di ogni singolo tipo cellulare, non sono state osservate differenze statisticamente significative tra le condizioni di trattamento per la percentuale stimata delle popolazioni di neuroni, astrociti, OPCs e oligodendrociti. Questo suggerisce che l'esposizione al fentanyl non è selettivamente tossica per una specifica popolazione di cellule gliali. Dunque, i livelli di LDH aumentati solo nella condizione a bassa dose potrebbero essere attribuiti alla compromissione dell'integrità della membrana antecedente alla lisi cellulare, la quale consiste in un evento di tossicità tardivo.

3.1.3 Effetti sul trascrittoma

Dalle analisi DGE (Differential Gene Expression) è emerso che ci sono 87 geni differenzialmente espressi (DEGs) tra bassa dose e controllo, 318 geni tra alta dose e controllo e 352 geni tra alta dose e bassa dose ($\text{abs}(\log_2\text{FC}) > 0.5$ e $\text{FDR} < 0.05$) (Fig. 4A). L'analisi di arricchimento Gene Ontology (GO) dei DEGs ha permesso di identificare processi biologici associati alla matrice extracellulare, in particolare i processi biosintetici di glicosaminoglicani (GAGs) e l'organizzazione della matrice, come arricchiti in modo univoco nelle colture a bassa dose di fentanyl rispetto alla condizione non trattata (Fig. 4B). I geni coinvolti nella trasmissione sinaptica chimica, invece, sono stati inibiti (Fig. 4C). Nella condizione di fentanyl ad alta dose, i geni legati all'attività recettore-ligando e alla trasduzione del segnale intracellulare, ai processi di trascrizione e traduzione (es. regolazione dell'espressione genica) e all'infiammazione (es. risposta immunitaria innata, via di segnalazione mediata dalle citochine) sono stati indotti rispetto alla condizione non trattata. Dall'altra parte, i geni inibiti nelle condizioni ad alta dose includono quelli correlati agli stessi processi, ma anche a funzioni cellulari come la motilità, l'organizzazione della matrice extracellulare e lo sviluppo del sistema nervoso.

L'analisi di arricchimento GO ha evidenziato l'esistenza di processi biologici specifici della condizione di alta dose e di bassa dose. Sono stati analizzati i geni indotti associati alle risposte infiammatorie, alla matrice extracellulare e alla trasmissione sinaptica (Fig. 5A) e i geni inibiti associati alla matrice extracellulare e all'attività dei recettori-ligandi (Fig. 5B). Per quanto concerne l'infiammazione, la condizione di alta dose di fentanyl si è arricchita di geni coinvolti nella risposta infiammatoria acuta (es. *C3*, *Il1a*, *Lcn2*, *S100a8*, *Vcam1*), nella segnalazione mediata da chemochine (es. *Ccl2*, *Ccl20*, *Ccl7*, *Cxcl10*, *Cxcl11*, *Cxcl12*, *Cxcl13*, *Pf4*), nella fagocitosi (*C3*, *Ccl2*, *Fgr*, *Ptx3*, *Slc11a1*, *Tlr2*) e nella regolazione negativa dei processi virali (es. *Bst2*, *Isg15*, *Mx1*, *Oasl*, *Ptx3*). I geni per il recettore ionotropico del glutammato (es. *Grin2a* e *Grin2b*) e quelli per il trasporto dello ione calcio (es. *Cacna1e* e *Slc8a2*) sono stati arricchiti nella condizione ad alta dose e di non trattamento, ma sono stati significativamente inibiti nella condizione di bassa dose. È significativo anche il fatto che i geni relativi ai recettore metabotropici del glutammato e alle vie di segnalazione (es. *Grim1*, *Grim3* e *Akap5*) sono stati indotti solo nelle condizioni ad alta dose. Diversi geni coinvolti nella matrice cellulare sono stati indotti in condizioni di bassa dose, in particolare geni che sono stati in precedenza associati all'invasione metastatica (es. *Col3a1*, *Itga11*, *Mmp2*) e all'organizzazione delle fibrille di collagene (es. *Col3a1*, *Loxl1* e *Col15a1*) (Fig. 5A). È stata osservata una sottoregolazione di un gruppo di geni associati alla matrice extracellulare nella condizione di alta dose. Tra questi ci sono geni coinvolti nell'organizzazione delle fibrille di collagene (*Adams14*, *Col3a1*, *Grem1*, *Lox*, *Loxl2*, *Mmp9*) e nell'assemblaggio della matrice (es. *Has1*, *Lamb3*). Sono stati inibiti anche geni coinvolti nell'attività

recettore-ligando, in particolare nella via di segnalazione dei neuropeptidi (es. Hcrtr1, Nts, Prlhr, Sorcs3), delle GPCR (es. Cckbr, Ednrb, Hcrtr1, Mas1, Prlhr) e nella regolazione negativa dello sviluppo cellulare (es. Ednrb, Nppc, Pthlh, Sema3a, Vegfa).

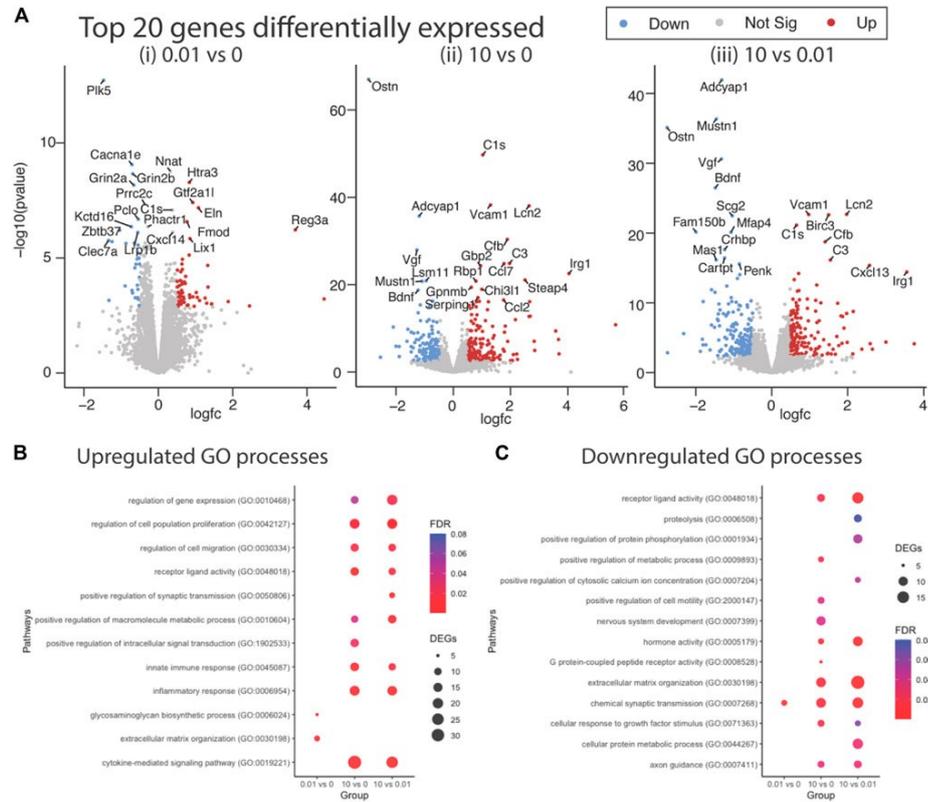


Figura 4: Analisi dei geni differenzialmente espressi (DEGs) nelle colture complesse dopo esposizione subcronica a basse vs alte dosi di fentanyl. (A) Volcano plots relativi ai diversi confronti tra le tre condizioni sperimentali: (i) 0.01 vs 0 μ M, (ii) 10 vs 0 μ M, (iii) 10 vs 0.01 μ M. Sono evidenziati i 20 geni più differenzialmente espressi. Dot plot che mostra i processi biologici arricchiti associati ai geni indotti (B) e inibiti (C). La dimensione del cerchio rappresenta il numero di geni in ogni categoria GO e il colore indica il false discovery rate associato a ciascuna categoria.

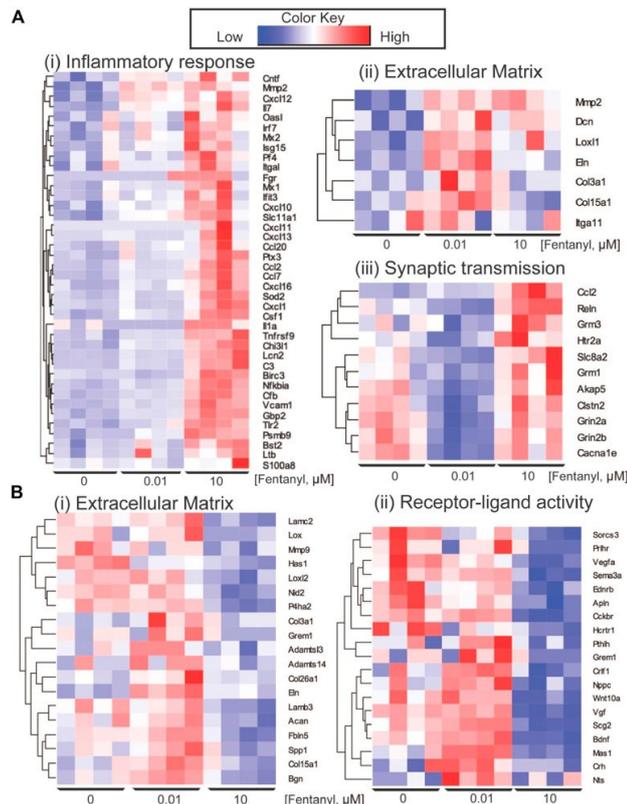


Figura 5: Geni differenzialmente espressi. (A) Heatmap raffigurante i geni coinvolti nell'infiammazione (i), nell'organizzazione della matrice (ii) e nella trasmissione sinaptica (iii) indotti dal trattamento con diverse concentrazioni di fentanyl. (B) Heatmap raffigurante i geni coinvolti nell'organizzazione della matrice (i) e nell'attività recettore-ligando (ii) inibiti dal trattamento con diverse concentrazioni di fentanyl.

3.2 STUDIO 2 (Sadovsky et al., 2023)

È stato utilizzato l'RNA-Seq per analizzare i cambiamenti trascrizionali degli RNA lunghi nelle nove placente OUD-correlate. Sono stati trovati 286 RNA espressi in modo differenziato rispetto ai controlli. In particolare, i livelli degli mRNA SERPINB7, PEG3 e ACER2, tutti espressi nel lignaggio trofoblastico, sono risultati significativamente alterati nelle placente OUD-correlate (Fig. 6). Tutti e tre i prodotti di questi trascritti sono coinvolti nella funzione placentare: SERPINB7 è un inibitore di proteasi, importante per il rimodellamento dei tessuti e il mantenimento dell'integrità strutturale della placenta durante la gravidanza. Una sua sovraespressione è stata riscontrata in parti prematuri spontanei. PEG3 regola la funzione endocrina della placenta e promuove anche la sua crescita. ACER2 è coinvolto nel mantenimento dell'integrità della vascolarizzazione placentare; una sua sottoespressione può portare ad importanti problemi di sviluppo o addirittura a letalità embrionale. GNG3, ADAD2, TDRD12 e SLC30A8 hanno mostrato un aumento dell'espressione statisticamente significativo (8 volte), ma non sono stati presi in considerazione data la loro espressione estremamente bassa o assente nel lignaggio trofoblastico (Fig. 7).

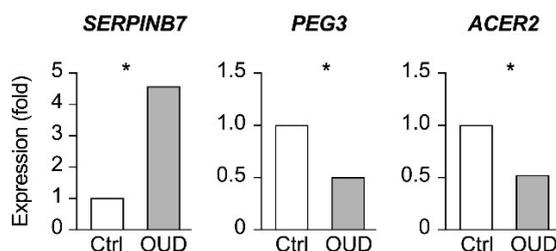


Figura 6: Espressione degli mRNA SERPINB7, PEG3 e ACER2 nelle placente OUD-correlate rispetto ai controlli non-OU. * $p < 0.05$, calcolato sulla base dell'RNA-Seq come spiegato nei Metodi

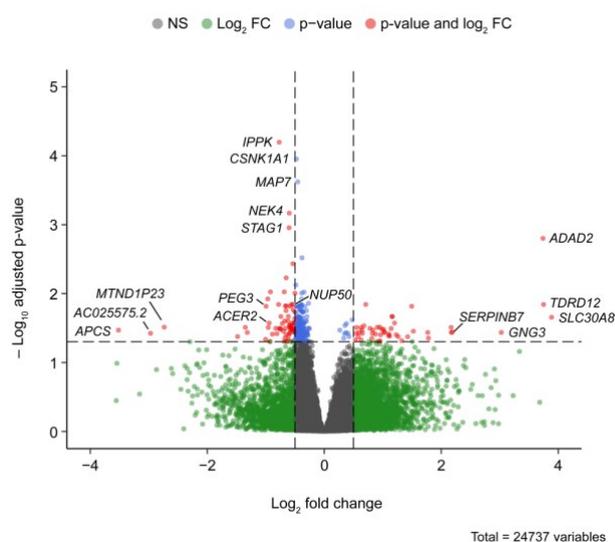


Figura 7: Volcano plot che mostra gli RNA lunghi differenzialmente espressi nelle 9 placente OUD-correlate rispetto alle 88 placente non-OU (controlli). Gli mRNA (punti rossi) indicati sopra la linea orizzontale sono statisticamente significativi, i punti grigi, blu e verdi non sono significativi.

Per le analisi successive le cellule TS^{CTB} sono state considerate come rappresentanti delle tre linee cellulari TS, in quanto derivate da citotrofoblasto del primo trimestre. Esse sono più rilevanti per la ricerca di questo studio perché è solitamente durante il primo trimestre che vengono rilevate anomalie fetali. Innanzitutto è stato valutato l'effetto dello stato di differenziazione sull'espressione degli mRNA: SERPINB7 e PEG3 sono risultati inibiti nelle cellule PHT e TS^{CTB} differenziate. ACER2, invece, è risultato indotto nelle cellule PHT differenziate ma non in quelle TS^{CTB} .

Per capire come le cellule PHT e TS rispondono all'esposizione a fentanyl è stata analizzata l'espressione di recettori per gli oppioidi durante la differenziazione dei trofoblasti. È stato individuato OPRM1, uno dei principali recettori che media le vie oppioidi-dipendenti: esso è ampiamente espresso nelle cellule PHT coltivate nel terreno di staminalità ma in nessuna delle tre cellule TS considerate. I livelli di OPRM1 nelle cellule PHT sono significativamente più alti nel mezzo di staminalità rispetto al mezzo di differenziazione. Oltre a OPRM1 sono stati

individuati anche OPRD1 e OPRK1, espressi sia nelle cellule PHT che nelle cellule TS. Anche nel loro caso si ha una significativa diminuzione dell'espressione durante la differenziazione trofoblastica.

Per quanto riguarda il fentanyl, non è stato riscontrato nessun effetto statisticamente significativo sull'espressione dei geni SERPINB7, PEG3 e ACER2 nelle cellule TS^{CTB} o PHT coltivate nel mezzo di staminalità o di differenziazione. È stato poi verificato se il fentanyl avesse almeno un impatto sull'espressione dei geni chiave della staminalità e della differenziazione del trofoblasto. L'equilibrio tra auto-rinnovamento e differenziazione è normalmente regolato da fattori di trascrizione come ELF5, TEAD4, TP63, GATA2/3 e TFAP2A/C, che sostengono l'auto-rinnovamento, e da fattori come GCM1 che promuovono il differenziamento. Quando le cellule TS si differenziano in sinciziotrofoblasti (STB) nel mezzo di differenziazione STB, si ha una inibizione dei geni di staminalità come ELF5, TEAD4 e TP63 e l'induzione di geni STB-dominanti come hCG e LGALS13. Al contrario, nel mezzo di staminalità si osserva un aumento dell'espressione dei geni di staminalità e una riduzione dell'espressione di GCM1 e dei STB-geni dominanti come hCG, hPL e LGALS13. In seguito ad esposizione, non sono stati riscontrati cambiamenti significativi nell'espressione di ELF5, TEAD4, TP63, GATA3, TFAP2A, GCM1, hCG o LGALS13 nelle cellule PTH o TS^{CTB}, indipendentemente dal loro stato differenziativo (Fig. 8). Sono stati analizzati anche i geni ABCG2 e CYP1A1 poiché studi precedenti hanno dimostrato che, influenzati da altri oppioidi, attivano il recettore nucleare degli idrocarburi arilici (AhR) nei trofoblasti, il quale media la risposta dell'organismo a molti xenobiotici. È stato considerato anche PSG11, ortologo umano di Ceacam11, perché studi effettuati su topi esposti ad ossicodone hanno dimostrato che l'oppioide ha portato all'induzione di geni legati alla differenziazione, tra cui Ceacam11. Tra questi, l'unico su cui ha avuto effetto il fentanyl alla dose di 100 nM è stato PSG11 nelle cellule TS^{CTB} coltivate nel terreno di staminalità (ST) (Fig. 9).

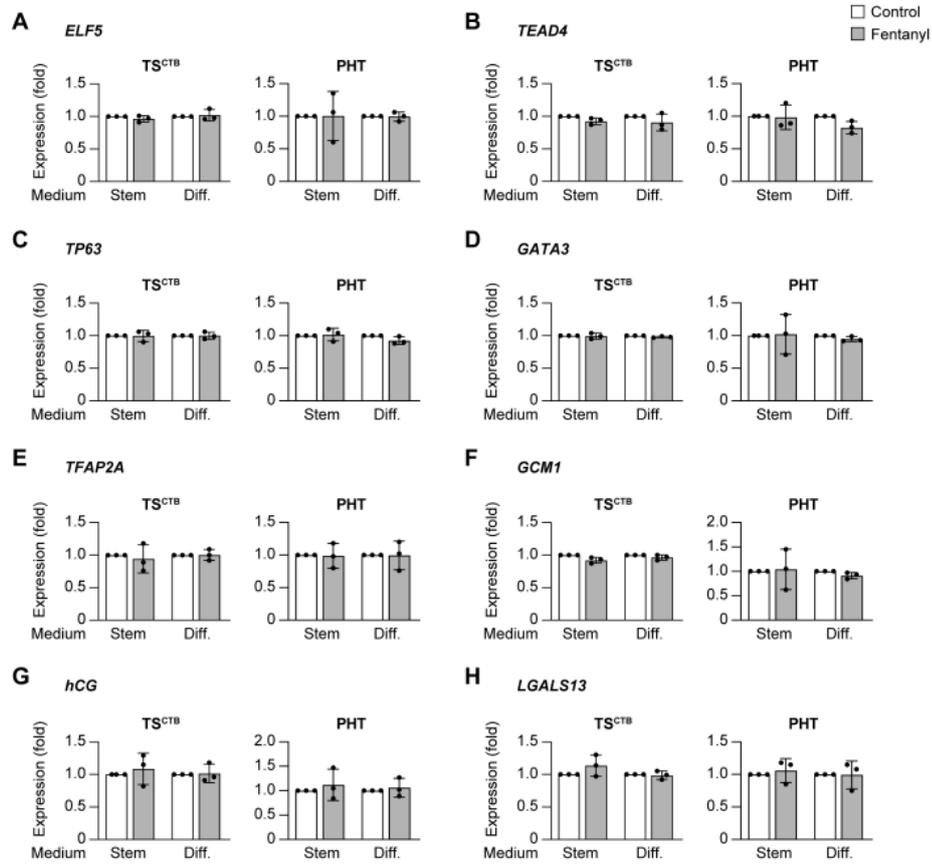


Figura 8: Impatto del fentanyl sull'espressione dei geni di staminalità e differenziazione. L'analisi è stata eseguita in cellule TS^{CTB} e PHT, coltivate nel mezzo di coltura stem vs. diff. Livelli di espressione di (A) *ELF5*, (B) *TEAD4*, (C) *TP63*, (D) *GATA3*, (E) *TFAP2A*, (F) *GCM1*, (G) *hCG*, (H) *LGALS13* sono stati analizzati mediante qRT-PCR in cellule esposte a fentanyl vs. controlli nelle rispettive condizioni di coltura. I dati sono stati analizzati mediante t-test, $n = 3$.

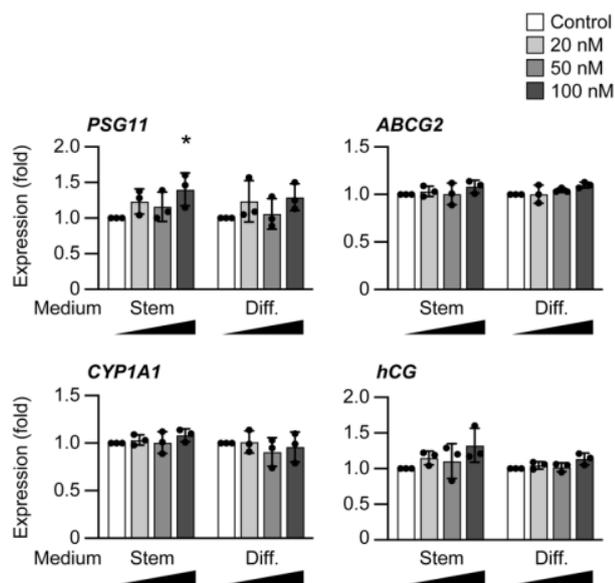


Figura 9: Effetto concentrazione-dipendente del fentanyl sull'espressione di mRNA nelle cellule TS^{CTB} . I livelli di *PSG11*, *ABCG2*, *CYP1A1* e *hCG* sono stati analizzati mediante qRT-PCR in

cellule esposte a 20, 50, 100 nM di fentanyl. I dati sono stati analizzati mediante t-test, $n = 3$, $*p < 0,05$.

L'analisi di arricchimento Gene Ontology (GO) dei 286 DEGs nelle placente OUD-correlate rispetto ai controlli non-OU ha individuato la via di segnalazione Wnt (GO:0060828) come *pathway* più arricchito. Questa comprende 15 DEGs: USP34, LGR4, CSNK1A1, FOXO3, CUL3, LATS2, UBR5, APC, DDX3X, USP47, SCYL2, NFKB1, WNK1, YAP1, TNKS. La variazione della loro espressione è risultata statisticamente significativa, ma comunque $< 50\%$.

4. DISCUSSIONE

Il potente oppioide sintetico fentanyl è attualmente uno dei principali fattori della crisi di dipendenza da oppioidi, presente soprattutto negli Stati Uniti e responsabile di un grandissimo numero di decessi. Il continuo aumento a livello mondiale di questo numero sta portando a svolgere sempre più indagini dettagliate sui meccanismi cerebrali che regolano il consumo di fentanyl e sugli effetti tossici che questo ha sull'essere umano. Tuttavia, il modo in cui l'esposizione cronica al fentanyl regola l'attività cerebrale portando a cambiamenti nel comportamento rimane poco conosciuto, in particolare nei modelli *in vitro* e *in vivo*.

Gli studi analizzati in questo elaborato hanno mostrato come un'esposizione subcronica al fentanyl abbia effetti sul trascrittoma. In particolare, lo "Studio 1" (Lam et al., 2022) si è concentrato sul trascrittoma di colture neuronali complesse murine, mentre lo "Studio 2" (Sadovsky et al., 2023) ha analizzato il trascrittoma trofoblastico placentare umano.

Per quanto concerne lo "Studio 1", è stato dimostrato che elevate dosi di fentanyl (10 μM) riducono significativamente l'attività della rete neurale, tra cui le attività di *spiking* e *bursting*, già solo 30 minuti dopo l'esposizione. Al contrario, la bassa dose (0.01 μM) non ha influenzato l'attività della rete rispetto alle colture non trattate. Non sono state osservate influenze da parte del fentanyl sulla vitalità cellulare o sulla proporzione relativa di neuroni all'interno della popolazione cellulare. Le dosi utilizzate nel presente studio non sembrano indurre citotossicità, coerentemente con quanto osservato in studi precedenti in cui dosi di fentanyl $> 250 \mu\text{M}$ hanno indotto tossicità nei neuroni dopo 24 ore di esposizione. L'analisi trascrittomica ha rivelato cambiamenti nell'espressione genica dopo 4 giorni di esposizione al fentanyl, con una induzione di geni coinvolti nell'infiammazione e nella trasmissione sinaptica in caso di alta dose, e cambiamenti nella matrice extracellulare a bassa dose. Nella condizione di alta dose i cambiamenti di espressione genica sono stati più pronunciati. Tuttavia, in alcuni casi il livello di espressione genica non era diverso da quello delle condizioni di controllo, nonostante un aumento dell'espressione nella condizione di bassa dose. Si ipotizza un possibile meccanismo di compensazione nella condizione di alta dose

per regolare il trascrittoma riportandolo ai livelli di base, in particolare per i processi coinvolti nella matrice extracellulare e nell'attività del recettore-ligando. Sarà necessario svolgere ulteriori studi per comprendere meglio gli specifici effetti del fentanyl nel cervello e capire se gli effetti dose-dipendenti osservati *in vitro* sui topi si riflettono anche *in vivo* nell'uomo.

Per quanto concerne lo “Studio 2”, non sono stati ottenuti sufficienti dati riguardo gli effetti degli oppioidi sull'espressione genica placentare, benché siano state fatte scoperte significative. È interessante notare come OPRM1 sia assente in tutte e tre le linee cellulari di TS analizzate, suggerendo che nelle prime fasi della gravidanza gli oppioidi influenzano la funzionalità del trofoblasto attraverso vie OPRM1-indipendenti. I dati ottenuti nel presente studio possono solo suggerire che i recettori degli oppioidi sono espressi prevalentemente nello stadio staminale piuttosto che in quello differenziato. Rimangono da chiarire i meccanismi attraverso cui la loro espressione viene modulata. È rilevante anche il fatto che non siano stati riscontrati effetti del fentanyl sull'espressione di ABCG2 e CYP1A1 nelle cellule TS^{CTB}, suggerendo che l'oppioide possa influenzare la funzione placentare nelle prime fasi della gravidanza indipendentemente dalle vie AhR. Per quanto riguarda il *pathway* risultato arricchito in modo significativo, è stato riscontrato che la via Wnt svolge un ruolo negli effetti degli oppioidi sulle cellule tumorali. Sono risultati contrastanti i risultati ottenuti riguardo l'espressione dei geni SERPINB7, PEG3 e ACER2 e i rispettivi prodotti genici. Il fentanyl sembra non avere effetto sull'espressione dei geni, mentre è risultata alterata l'espressione delle rispettive proteine. Questa differenza è probabilmente dovuta all'effetto del fentanyl su altre cellule placentari non trofoblastiche che è noto esprimano le proteine menzionate. L'ipotesi è confermata dai dati di RNA-Seq, che mostrano un aumento dell'espressione di GNG3, ADAD2, TDRD12 e SLC30A8 nelle placente OUD-correlate. La rilevanza funzionale dei prodotti genici differenzialmente espressi per la biologia del trofoblasto in una placenta esposta ad oppioidi rimane da chiarire, però i risultati confermano che diversi tipi di cellule placentari umane rispondono agli oppioidi. Lo studio, infine, presenta delle limitazioni, come le dimensioni ridotte del campione e la mancata considerazione dell'esposizione ad altre sostanze illecite. Sono necessarie ricerche future per approfondire l'impatto degli oppioidi sulla placenta e per considerare ulteriori variabili nell'analisi.

In conclusione, ad oggi si può certamente affermare che il fentanyl sia una delle droghe più potenti e pericolose per l'uomo poiché provoca gravi danni a livello cerebrale e potenzialmente anche fetale. Restano purtroppo estremamente limitate le conoscenze riguardo i meccanismi molecolari che stanno alla base di questi danni e i cambiamenti che si verificano a livello di genoma, trascrittoma e proteoma.

5. BIBLIOGRAFIA

1. **Lam D**, Sebastian A, Bogguri C, Hum NR, Ladd A, Cadena J, Valdez CA, Fischer NO, Loots GG, Enright HA. Dose-dependent consequences of sub-chronic fentanyl exposure on neuron and glial co-cultures. *Front Toxicol.* **2022** Aug 11;4:983415. PMID: 36032789.
2. **Sadovsky E**, Chu T, Barak O, Sadovsky Y, Ouyang Y. The impact of opioids on the transcriptional landscape of human Villous trophoblasts. *Placenta* **2023** Nov;143:54-61. PMID: 37832183.
3. **Raffa RB**, Pergolizzi JV, LeQuang JA, Taylor Jr R, Colucci S, Annabi MH. The fentanyl family: A distinguished medical history tainted by abuse. *J Clin Pharm Ther.* **2018**;43:154-158. PMID: 28980330.
4. **Al-Hasani R**, Bruchas MR. Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. **2011** Dec;115(6):1363-81. PMID: 22020140.
5. **Enright HA**, Lam D, Sebastian A, Sales AP, Cadena J, Hum NR, Osburn JJ, Peters SKG, Petkus B, Soscia DA, Kulp KS, Loots GG, Wheeler EK, Fischer NO. Functional and transcriptional characterization of complex neuronal co-cultures. *Sci Rep.* **2020** Jul 3;10(1):11007. PMID: 32620908.
6. **Kosten TR**, George TP. The neurobiology of opioid dependence: Implications for treatment. *Sci Pract Perspect.* **2002** Jul;1(1):13-20. PMID: 18567959.
7. **Stanley TH**. The fentanyl story. *J pain.* **2014** Dec;15(12):1215-26. PMID: 25441689.
8. **Nardi-Hiebl S**, Ndieyira JW, Al Enzi Y, Al Akkad W, Koch T, Geldner G, Reyher C, Eberhart LHJ. Pharmacokinetic Characterisation and Comparison of Bioavailability of Intranasal Fentanyl, Transmucosal, and Intravenous Administration through a Three-Way Crossover Study in 24 Healthy Volunteers. *Pain Res Manag.* **2021** Nov 29:2021:2887773. PMID: 34880961.
9. **Ramos-Matos CF**, Bistas KG, Lopez-Ojeda W. Fentanyl. **2023** May 29. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. PMID: 29083586.
10. **Waldman SD**. Pain Management. Saunders, **2011**, second edition.