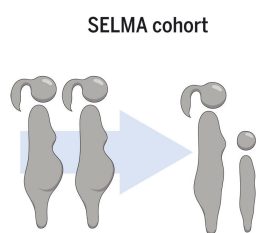


Cari Osanti,  
 benvenuti ad un nuovo appuntamento con la nostra newsletter. In questo numero esamineremo uno studio molto interessante, volto all'identificazione degli effetti correlati all'esposizione ai mix di sostanze chimiche, note come interferenti endocrini; passeremo poi alla messa a punto del primo test in vitro in grado di discriminare tra sostanza sensibilizzante cutanea e respiratoria; e infine scopriremo come dallo studio delle popolazioni cellulari appartenenti al sistema immunitario polmonare, derivino nuovi e significativi contributi circa l'aumentata suscettibilità ai patogeni respiratori, ad esempio al virus influenzale, tipica degli individui over 65.  
 Buona lettura!

## Un test per ricercare gli effetti dei mix di sostanze chimiche note come interferenti endocrini

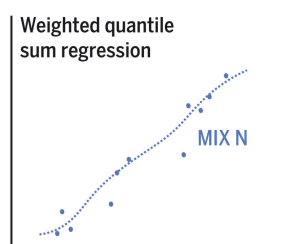
### Epidemiology

EDC levels in urine, blood and clinical data



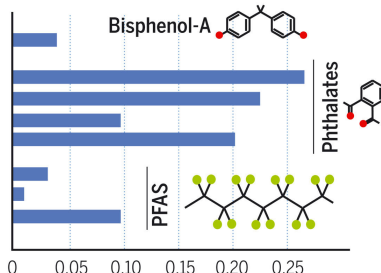
### Biostatistics

Identification of EDCs of concern



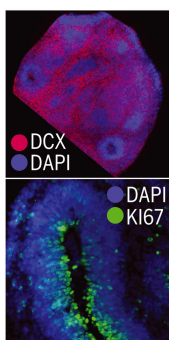
### Chemistry

EDC mixture and synthesis

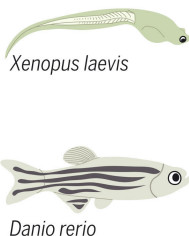


### Experimental biology

Identification of molecular mechanisms of action



Dose-response modeling for benchmark dose estimation



### Similar mixture approach

Determination of the human population with exposure ranges of concern

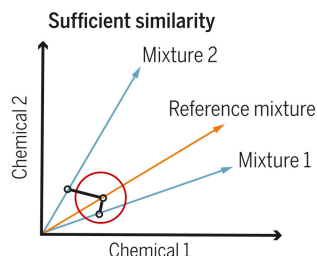


Foto in: DOI: 10.1126/science.abe8244

La popolazione umana è esposta ad un gran numero di interferenti endocrini. Conosciamo molto bene i disordini indotti dalle singole sostanze, ma sappiamo molto poco su quanto accade a seguito del contatto con un mix di sostanze tutte valutate come interferenti endocrini. Questo studio si propone proprio di individuare le correlazioni esistenti tra un mix di sostanze e gli effetti finali espliciti nell'organismo umano. In primo luogo sono stati presi come riferimento per lo studio campioni di popolazione formati da donne in gravidanza, e il monitoraggio degli stessi nati è proseguito anche negli anni successivi.

L'intera ricerca si è sviluppata su tre differenti step:

- ricerca della correlazione tra un mix di sostanze e due aspetti salienti quali il neuro sviluppo e la crescita/metabolismo del feto;
- saggi complementari negli umani per stabilire i nessi di causalità e l'alterazione genica;
- saggi in vivo.

A 1874 donne gestanti sono state prelevate urine e sangue a 10 settimane di gestazione. Il mix di 15 sostanze era composto da 20 metaboliti noti come potenziali interferenti, tra cui gli ftalati, il bisfenolo A (BPA) e i composti perfluorurati (PFAS). Questi composti sono conosciuti per la loro correlazione con due effetti sulla salute del bambino: il deficit del neurosviluppo, diagnosticabile mediante il riscontro di un ritardo nel linguaggio a 30 mesi di vita; la crescita e il metabolismo alterati, quantificati con il peso del neonato alla nascita, che se basso, risulta associato a sindrome metabolica, con particolare riferimento allo sviluppo di forme di obesità e di intolleranza al glucosio. Per prima cosa si è

valutato mediante il WQS (test di regressione della somma dei quantili ponderati), il tipo di esposizione prenatale correlato con i due sintomi chiave.

A questo punto avendo a disposizione i campioni prelevati in gestazione si è risaliti dalle urine alla rispettiva dose di assunzione giornaliera della data sostanza e attraverso uno specifico sistema di calcolo, si è stabilito le due formulazioni quanti/qualitative da testare. Una correlata con il deficit del neurosviluppo, l'altra con le problematiche metaboliche. Per testare il MIX N (neurotossico) sono state utilizzate in primis delle cellule staminali neurali di origine umana, ma anche cellule derivate da organoidi 3-D di cellule neurali. I risultati legati all'analisi trascrittomica hanno evidenziato l'interferenza del MIX N nell'attività endocrina, l'alterata espressione genica e ancora alterazioni della cromatina caratteristiche dello spettro autistico. Mediante l'utilizzo di modelli in vivo, embrioni di *Xenopus leavis* (rana acquatica) e di *Danio rerio* (pesce zebra), si è provveduto poi a indagare il ruolo della tiroide, scoprendo che ha un ruolo chiave nel meccanismo di sensibilità al MIX N e che la sua alterata funzionalità ha un diretta ripercussione sullo sviluppo neurologico.

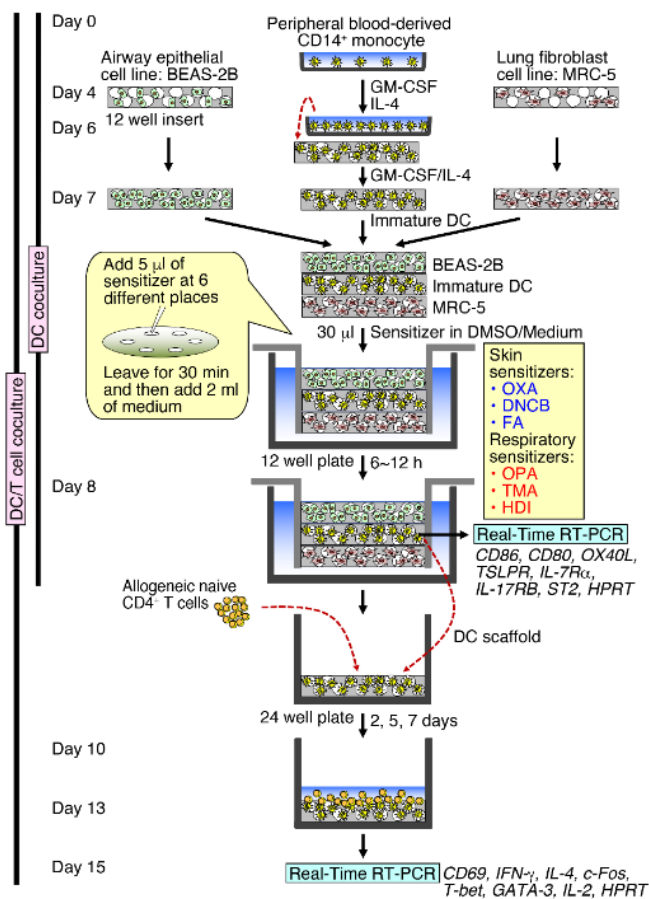
Per testare il MIX G (metabolico) sono state utilizzate due diverse linee cellulari, una di staminali mesenchimali derivate dal midollo osseo, l'altra di staminali mesenchimali derivate da cellule staminali pluripotenti indotte. L'analisi dell'espressione genica anche in questo caso si è rivelata significativa, evidenziando ad esempio un'aumentata attività adipogenica.

A questo punto i risultati ottenuti sono serviti per fissare dei livelli di concentrazione non tossici, quindi si è provveduto a correlare i livelli di mix presenti nelle analisi con quelli ricavati dai test, riuscendo così a selezionare le donne nelle cui analisi il mix era a concentrazioni simili a quelle risultate nei test come tossiche. In questo modo si è potuto isolare la platea di bambini esposti a livelli di sostanze preoccupanti. La selezione ha evidenziato un rischio di avere bambini con un ritardo nel linguaggio che interessava il 54% delle donne in gravidanza.

Caporale N, et al. From cohorts to molecules: Adverse impacts of endocrine disrupting mixtures. *Science*, 18 Feb 2022. Vol 375, Issue 6582. DOI: 10.1126/science.abe8244

## Discriminare tra sostanze sensibilizzanti per la cute e per l'apparato respiratorio

doi:10.14573/altex.2111181



**Fig. 1: Establishment of a novel DC/T cell coculture system**

The DC coculture system was first established by using the airway epithelial cell line BEAS-2B, peripheral blood mononuclear cell CD14<sup>+</sup> monocyte-derived immature DCs, and lung fibroblast cell line MRC-5, which were initially cultured in individual scaffolds and then assembled on the bottom of an insert well by stacking the scaffolds. Then an aliquot of a chemical sensitizer was gently added to the top scaffold and left for 30 min followed by the addition of medium. After 9 h, the stacked scaffolds were disassembled, and total RNA was extracted from the DC scaffold for real-time RT-PCR analysis. For the DC/T cell coculture system, after 6 to 12 h, the only DC scaffold was placed on the bottom of a new 24-well plate. Then allogeneic naive CD4<sup>+</sup> T cells were added to the DC scaffold and further incubated for the indicated times followed by real-time RT-PCR analysis.

Foto in: doi: 10.14573/altex.2111181.

Fino ad oggi non esistevano test in vitro in grado di discriminare la sensibilizzazione cutanea (da contatto) da quella respiratoria (da inalazione), e per questo motivo l'unico test riconosciuto come gold standard, era quello del linfonodo nel topo, volto a valutare lo specifico profilo citochinico generato. Oggi possiamo finalmente contare su un test totalmente human-based, in grado di effettuare la discriminazione delle diverse forme di sensibilizzazione indotte da un tossico. Un nuovo metodo, per discriminare tra sostanza sensibilizzante a livello cutaneo e sostanza sensibilizzante a livello respiratorio. Il sistema AOP (adverse outcome pathway) in modo molto accurato indica quattro step chiave per i test di sensibilizzazione in vitro: l'identificazione del legame della sostanza in esame con le proteine cutanee, l'attivazione dei cheratinociti, l'attivazione delle cellule dendritiche, e da ultimo l'attivazione delle cellule T. I test a nostra disposizione (in vitro) sono tutti riferibili ai primi tre step e nessuno fino ad ora era in grado di lavorare sulla fase quattro, di grande importanza e rilevanza. Sappiamo infatti che l'apparato respiratorio, a differenza di quello cutaneo, reagisce con la produzione di sostanze tra cui IL-4 (l'interleuchina 4) che induce una risposta di tipo TH2; le stesse cellule differenziate per la risposta TH2, producono a loro volta IL-4 come citochina effettrice. Nella cute si ha invece una risposta prevalentemente di tipo TH1 (in parte TH2 e TH17).

Al fine di mimare con precisione le caratteristiche fisiologiche e biochimiche che si realizzano in vivo (rispettando anche la componente spazio-temporale), si è provveduto a creare un sistema di co-culture tridimensionali costituito da cellule epiteliali dell'apparato respiratorio superiore, da cellule dendritiche immature e infine da fibroblasti di polmone. Su questo sistema sono poi state testate una serie di sostanze già note per essere sensibilizzanti cutanei o respiratori. Le sostanze sensibilizzanti respiratorie hanno prodotto in forma esclusiva OX40, una molecola effettrice fondamentale per la trasformazione TH2 dei linfociti T naive. La produzione di questa citochina, coinvolta specificatamente nel processo di differenziazione dei linfociti dell'apparato respiratorio, ha avuto luogo solo quando sono state testate le sostanze già note come sensibilizzanti respiratori, confermando così la piena validità del test nel discriminare le due diverse forme di tossicità. Ma non ci si è limitati a questo. Il sistema è stato ulteriormente integrato con linfociti T CD4+ e le cellule immature dendritiche sono state sostituite con cellule CD14, ovvero cellule proliferanti derivate da monociti. In particolare lo scaffold monocitico, dopo essere stato esposto agli agenti sensibilizzanti (per mezzo degli appositi substrati cellulari epiteliali e di fibroblasti), è stato rimosso e messo a contatto con i linfociti naive T CD4+. Quest'ultimo passaggio ha lo scopo di mimare quanto più possibile la migrazione delle cellule presentanti l'antigene verso il linfonodo. Le cellule monocitiche producono come abbiamo già visto OX40 quando esposte agli agenti sensibilizzanti respiratori, a sua volta l'OX40 induce la differenziazione TH2 delle cellule T e queste a loro volta secernono IL-4 e altre sostanze che saranno rivelate mediante RT-PCR. In questo modo, si individua lo specifico pattern citochinico associato alla risposta dell'apparato respiratorio, quando esposto ad un potenziale agente sensibilizzante.

Mizoguchi I, et al. A novel coculture system for assessing respiratory sensitizing potential by IL-4 in T cells. *ALTEX - Alternatives to animal experimentation*, 2022. doi: 10.14573/altex.2111181.

## Novità sulla risposta del sistema immunitario a patogeni respiratori di rilievo, a partire da tessuti polmonari umani

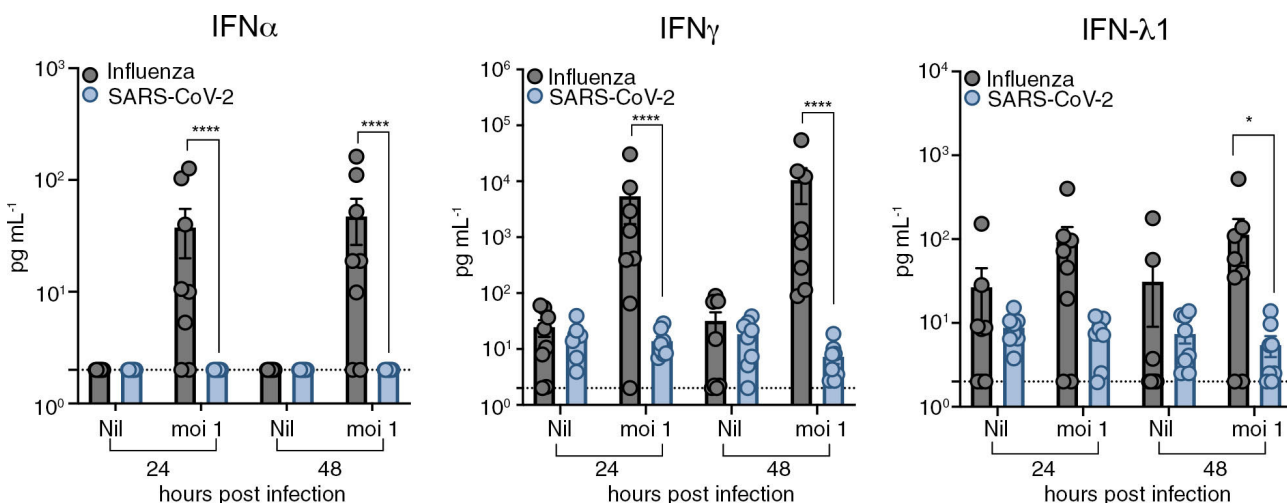


Foto in: 10.1002/cti2.1242

A livello mondiale la popolazione over 65 è in continua crescita e si stima che nel 2050 una persona ogni sei sarà appartenente a questa fascia di età. I pazienti anziani risultano più suscettibili ai patogeni respiratori e le infezioni respiratorie solitamente hanno esiti peggiori, con complicazioni e prolungamento dell'ospedalizzazione. Gli individui anziani possono risentire della senescenza del sistema immunitario, che si traduce in una diminuita sorveglianza, nonché nella diminuita capacità di instaurare un'adeguata risposta immunitaria. Ma ciò che non sapevamo e di cui questo studio

ci ha svelato l'esistenza, è dell'importanza della composizione cellulare del sistema immunitario regionale, al variare dell'età. Si è dunque provveduto mediante l'utilizzo di tessuti polmonari conservati nelle biobanche, a isolare e conservare la popolazione cellulare in sito; ciò sia con lo scopo di valutare l'aspetto qualitativo (quali tipi di cellule) e quantitativo (quanto numerose), sia per testare la risposta di questi pattern cellulari a due classici patogeni del tratto respiratorio: virus influenzale e SARS-CoV-2. Ogni anno il virus influenzale si stima che causi tra i 250.000 e i 500.000 morti a livello globale e oltre 5 milioni di forme gravi di malattia; il 90% delle persone che vanno incontro a morte e tra il 50 e il 70% di quelle ospedalizzate, appartiene alla fascia d'età over 65. Per quanto riguarda il Covid, l'80% dei decessi si è concentrato nella fascia over 65. I tessuti utilizzati nello studio, provenivano da un campione di persone tra i 22 e i 68 anni.

Lo studio ha rivelato che nonostante la maggior parte dei profili cellulari fosse rimasta nel tempo costante, le cellule della memoria linfociti (Trm) CD8+ T, erano diminuite. Le cellule CD8+T Trm sono dislocate in vari tessuti periferici e giocano un ruolo chiave nella protezione locale. Una volta incontrato il patogeno, ben presto danno seguito all'espansione clonale e all'avvio dell'attività citotossica. Non solo, inducono anche il tessuto a rilasciare citochine in grado di richiamare in sito altre cellule del sistema immunitario ed evocano altresì la produzione di proteine antivirali. Non conosciamo le ragioni del declino temporale della popolazione dei linfociti Trm, si è ipotizzato sia dovuto alle variazioni nella tensione dell'ossigeno o all'attività di sostanze immunosoppressive, di sicuro c'è l'incapacità del sistema immunitario di rimpiazzare questo tipo di cellule nei tessuti periferici.

Quando i campioni cellulari associati a pazienti anziani sono stati testati con il virus influenzale, si è riscontrata una blanda risposta antivirale correlata alla ridotta presenza in loco di Trm. Già precedenti studi clinici avevano evidenziato che la grandezza e la qualità della risposta al virus influenzale,

da parte dei linfociti CD8+T, diminuiva con l'avanzare dell'età e che tali linfociti esprimevano una ridotta attività citotossica. Sappiamo che la risposta dei linfociti T effettori è fondamentale per iniziare il processo di risposta al virus, ma la deposizione in corso di infezione di molteplici sottocategorie specifiche come quella dei linfociti CD8+T Trm, lo è altrettanto. Lo studio ha mostrato che dopo l'infezione con virus influenzale, la risposta dei linfociti Trm è stata rapida e volta a richiamare in sito altre cellule, ma se a prescindere dall'età del donatore, non sono state rilevate differenze significative nella popolazione dei linfociti CD8+T, è stata invece riscontrata una diminuzione dei CD8+T Trm (specifici per il virus influenzale) nei soggetti anziani, associata inoltre ad una minore risposta antivirale. Questo rappresenta un altro fattore chiave, per spiegare la maggiore suscettibilità verso certi patogeni in alcune fasce d'età. Si è poi testato il pool cellulare proveniente dai tessuti polmonari rispetto al virus del SARS CoV-2, scoprendo così che a differenza di quanto accade nella risposta al virus influenzale, in cui si producono interferone di tipo I/II/e III, in questo caso la risposta non ha luogo. Questo dato è stato suffragato anche dai riscontri sui pazienti ospedalizzati per Covid-19, nei quali è stata riscontrata una risposta da interferone molto più blanda rispetto a quella dei pazienti ricoverati con virus influenzale. Altri studi hanno dimostrato che il virus si replica nelle cellule ospiti in modo silente, riuscendo così ad evitare l'innescare della risposta antivirale mediata dall'interferone. Sottoponendo a test il pool cellulare prelevato dai tessuti di donatori deceduti prima della pandemia e dunque privi di linfociti CD8+T Trm, non è emersa attivazione delle cellule T. Quello che non sappiamo ancora e che dovrà essere oggetto di ulteriori studi, è se l'infezione da virus SARS CoV-2 sia in grado di indurre la formazione di cellule CD8+T Trm virus-specifiche e se queste a loro volta siano in grado di innescare una risposta immunitaria, in grado di compensare la mancanza di attività antivirale interferone-mediata.

Nguyen TH, et al. Influenza, but not SARS-CoV-2, infection induces a rapid interferon response that wanes with age and diminished tissue-resident memory CD8+ T cells. *Clin Transl Immunology*. 2021; 10(1): e1242. Published online 2021 Jan 26. doi: 10.1002/cti2.1242

---