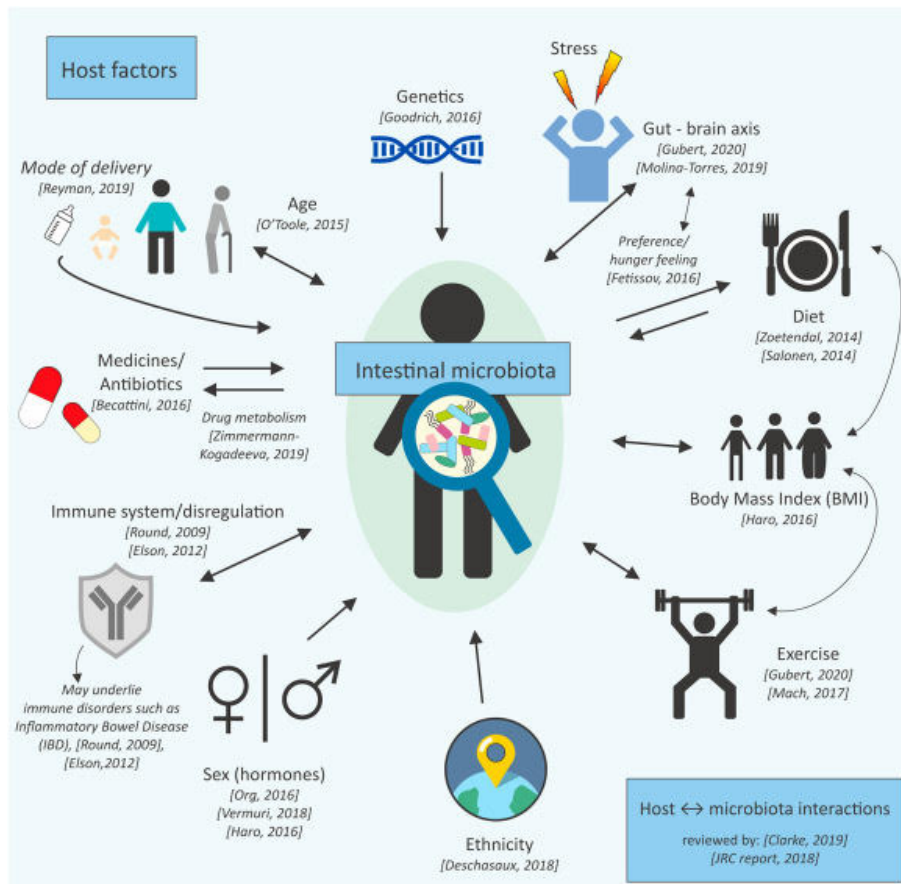


Cari Osanti,

ben trovati. In questo numero ci avviciniamo ad un tema sempre più centrale nell'ambito della ricerca biomedica ovvero lo studio del microbiota e delle sue interazioni con la mucosa intestinale. Esamineremo poi il ruolo sempre più importante svolto dalla trascrittomica che si avvia a diventare un comparto delle scienze omiche fondamentale per la tossicologia. Da ultimo soffermeremo la nostra attenzione su una malattia neurodegenerativa quale è il morbo di Parkinson, vedremo lo stato dell'arte in riferimento all'utilizzo nella ricerca diagnostica e terapeutica dei NAMs e scopriremo così che una nuova e promettente strada è stata tracciata.

Il microbiota, un attore ancora troppo poco conosciuto



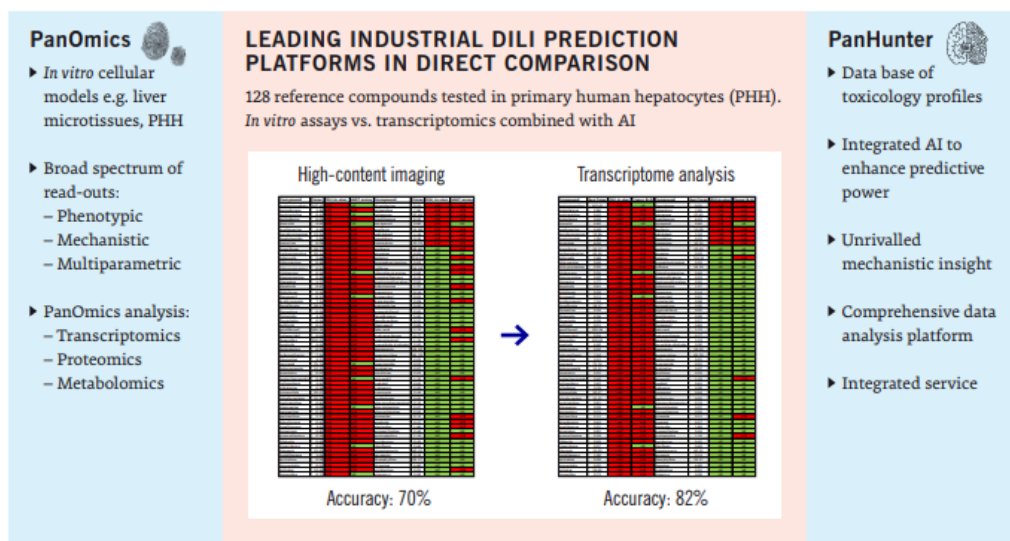
Sappiamo oggi che la flora microbica intestinale gioca un ruolo chiave per l'organismo e che uno suo squilibrio è in grado di determinare alterazioni su numerose funzioni organiche; non solo, sappiamo anche che lo stato di salute influisce sulla composizione ed eventuale squilibrio del microbiota. In questo studio si è concentrata l'attenzione sui modelli di organ on-chip di intestino, che meglio ricapitolano la barriera aerobica e anaerobica presente a livello intestinale. Nel lume intestinale la concentrazione di ossigeno molto scarsa o assente, favorisce lo sviluppo di microrganismi anaerobi, ma nel contempo in prossimità delle cellule epiteliali intestinali che necessitano di ossigeno, la tensione del medesimo è tale da consentire anche lo sviluppo di una flora aerobica. **La riproposizione delle diverse modulazioni gassose risulta dunque di fondamentale importanza per capire gli sviluppi del microbiota e le relative interazioni farmacologiche utili allo sviluppo di terapie orali.** Sono molteplici le condizioni che modificano il microbiota intestinale e nel contempo le alterazioni del microbiota sono in grado di influenzare il sistema immunitario e lo stato di salute. A livello intestinale, la presenza di muco è fondamentale per separare la popolazione batterica luminale dalle cellule epiteliali e altrettanto importante il gradiente di ossigeno che si viene a determinare lungo il villo. Il muco dell'area contigua al villo è al contempo una sede di sviluppo e nutrimento per i batteri non strettamente anaerobi, che consumando l'ossigeno a disposizione ne determinano l'aumento del gradiente di concentrazione. **I modelli animali messi a punto per gli studi sul microbiota, si sono rivelati più spesso non rappresentativi dal punto di vista fisiologico, sono mancanti di predittività, costosi ed eticamente discutibili.** I metodi alternativi si possono avvalere sia di test in silico, ma soprattutto di test in vitro che partendo dalle cellule Caco2 di adenocarcinoma colon-rettale, si sono poi evoluti ai tessuti derivanti dalle cellule IPSC (staminali pluripotenti indotte), fino ad arrivare ad organoidi e organi on chip. In particolare è con lo sviluppo dei sistemi microfluidici che si è avuta una svolta decisiva. Quest'ultimi infatti hanno permesso di ricreare membrane porose permeabili ai fluidi ma anche ai gas, favorendo la riproposizione in sito dei diversi gradienti di ossigeno; non solo, un altro aspetto saliente riguarda la motilità meccanica e la stimolazione cellulare da parte del flusso fluidico che è in grado di esercitare quelle forze e pressioni che in vivo regolano la riproduzione batterica e favoriscono lo sviluppo dei villi. Il flusso crea uno stress da taglio alle cellule epiteliali che sono indotte a proliferare, mentre esercita una down-regulation sulla crescita batterica. Il sistema microfluidico è in grado inoltre di modulare la concentrazione di ossigeno. Gli studi sull'intestino on-chip hanno rivelato come i batteri commensali migliorano l'attività della barriera intestinale, mentre viceversa i patogeni ne diminuiscono le

potenzialità di barriera. Pertanto il sistema è ottimale anche per discriminare la flora commensale da quella patogena. Gli attuali paradigmi di ricerca sempre più evoluti, ci conducono non tanto verso un unico modello di intestino su chip, quanto piuttosto su modelli diversi e specifici per le diverse esigenze di ricerca che si presentano di volta in volta. Gli elementi su cui puntare l'attenzione per migliorare le prestazioni di queste metodologie sono la capacità di controllo del gradiente di ossigeno e la possibilità di misurarlo; ma ancora un ruolo chiave lo svolgono i materiali impiegati nella fabbricazione, che dovranno presentare le giuste caratteristiche in fatto di permeabilità all'ossigeno e di idrofilità. Possibilmente questi materiali dovrebbero assomigliare alla matrice extracellulare intestinale sia in fatto di caratteristiche meccaniche, sia biochimiche (es. proteine presenti in vivo). Dovrebbe essere implementato il ruolo della barriera tra epitelio ed endotelio che non sempre è accuratamente rappresentata ed ha invece un ruolo chiave. Per quanto riguarda la peristalsi meccanica si è visto che favorisce la proliferazione e la differenziazione delle cellule Caco-2, ma necessita di ulteriore approfondimento. Da sottolineare l'importanza decisiva per questo tipo di ricerche, sia della rilevazione degli effetti meccanici di proliferazione/contenimento legate allo stress da taglio, sia dello studio della barriera e delle sue alterazioni di permeabilità in particolare tramite una metodica non invasiva come il TEER (resistenza elettrica transepiteliale/transendoteliale). **Nel prossimo futuro bisognerà poi prevedere l'implementazione di questi modelli sulla base dell'asse cervello/intestino, sembra infatti che le interconnessioni siano piuttosto significative. Per quanto concerne poi il microbiota sappiamo che esso varia in ragione del tratto intestinale di appartenenza, dell'individuo e addirittura presenta fluttuazioni giornaliere;** tutto questo per dire che non è facile riproporre su chip le diverse interazioni microbiche presenti in vivo, ma si sta lavorando anche a questo. Un altro elemento da non banalizzare è la conoscenza dei tempi di rinnovamento cellulare nei diversi compartimenti intestinali. Da ultimo, ma fondamentale al pari di tutto quanto è già stato raccomandato, vi è la standardizzazione dei modelli, il libero accesso a documenti e ricerche per evitare inutili perdite di tempo e la definizione di protocolli di ricerca validi per tutti i laboratori.

Elsbeth G.B.M.Bossink, Loes I.Segerink, MathieuOdijk. Organ-on-Chip Technology for Aerobic Intestinal Host – Anaerobic Microbiota Research. *Sciencedirect* Volume 4, December 2022, 100013. <https://doi.org/10.1016/j.ooc.2021.100013>

Il futuro della tossicologia passa anche per la trascrittomica

TRANSCRIPTOME & AI DELIVER SUPERIOR DILI PREDICTION



Superior accuracy over current in vitro assay approach plus additional mechanistic insight gained from transcriptomics.

Le metodiche ad alto rendimento per analizzare l'attività genica, rappresentano uno strumento chiave per migliorare il profilo di sicurezza dei farmaci. Nel 2013 il fasiglifam, un farmaco che si prometteva come terapeutico nei confronti del diabete, era nella fase finale degli studi clinici, quando ci si accorse che i partecipanti al trial avevano sviluppato lesioni epatiche. La cosa interessante fu che né gli studi preclinici sugli animali né quelli di dimensioni ridotte di fase I e II in ambito clinico avevano evidenziato anomalie, che emersero solo nello studio di fase tre notoriamente più numeroso e anche costoso. Il fegato, quale principale sito del metabolismo dei farmaci, è particolarmente vulnerabile ai composti che ne alterano la funzionalità e i danni farmaco-indotti sono tra le principali cause di fallimento dei trial clinici e del ritiro di un farmaco dal commercio. **Si calcola che tra il 1953 e il 2013, il 18% dei farmaci ritirati dal commercio si sia reso responsabile di danni epatici.** Il fasiglifam, assieme ad altre centinaia di composti, è stato incorporato dalla Cyprotex un'azienda specializzata in tossicologia, in un'apposita libreria di informazioni che dovrebbero aiutare nel prevedere gli effetti dannosi per il fegato, prima di giungere agli studi clinici. A questo scopo l'azienda ha unito le proprie forze con quella della Evotec leader nel settore della trascrittomica. Il focus era capire il ruolo della trascrittomica nell'indagare le lesioni indotte dai farmaci. In primo luogo si è provveduto al sequenziamento di centinaia di molecole di RNA messenger, per comprendere quali funzioni cellulari fossero attivate. **Ogni composto che interagisce con le cellule, determina una risposta biologica individuabile dalla trascrittomica.** Con questa metodica sono stati evidenziati potenziali effetti del fasiglifam sulla funzione mitocondriale, sfuggiti durante gli studi preclinici.

La trascrittomiche dunque è fondamentale in tema di sicurezza per lo sviluppo dei farmaci, non solo può essere utile per implementare ma anche ridurre i test animali, ridurre i costi, i tempi. L'utilizzo ottimale della trascrittomiche ad alto rendimento è quello su organoidi 3D prodotti a partire da cellule umane. Naturalmente si sottolinea come questo approccio debba essere oggetto di preparazione e debba essere accurato e mirato, in quanto gli studi tossicologici sono soliti vagliare dosaggi diversi, in momenti differenti e con l'attenzione agli effetti multi-organo. In ragione della mole considerevole di dati che si ottengono mediante l'utilizzo della trascrittomiche, Evotec ha elaborato un software che consente a ricercatori e biologi di non dover ricorrere ai bioinformatici per le analisi e l'interpretazione dei dati; il software infatti gli consente di fruire in autonomia dei dati e facilita il lavoro di reperimento quando la mole delle informazioni diviene troppo grande per le sole capacità gestionali proprie del cervello umano. Il software non è certo un punto di arrivo, ma un mezzo con il quale aiutare i ricercatori a indirizzare le loro indagini e invitarli a scavare più in profondità. A tutti i ricercatori viene rivolto un monito affinché sappiamo andare oltre le aspettative prefissate, facendo tesoro di tutti i possibili risultati che emergono e che potrebbero essere nuovi e inaspettati rispetto alle prerogative iniziali.

La diversità in essere tra il metabolismo delle varie specie è una tra le più importanti ragioni della scarsa predittività della sperimentazione animale in ambito tossicologico. Si calcola che soltanto metà dei composti in grado di causare tossicità epatica vengano rilevati da studi su animali. In particolare il metabolismo epatico animale si è rivelato quello meno concordante con il corrispettivo umano, rispetto a tutte le altre forme di tossicità d'organo. Nonostante i possibili candidati farmaceutici necessitino ancora di test su animali prima di procedere ai trial clinici, le cose stanno cambiando. Enti regolatori e legislatori si stanno adoperando per sostituire i test con metodologie che non utilizzino animali. L'EPA nel 2019 ha annunciato la volontà di porre fine all'esecuzione e al finanziamento dei test sulla sicurezza chimica eseguiti sui mammiferi entro il 2035. Nel settembre 2021 il parlamento europeo ha votato una risoluzione non giuridicamente vincolante, che promuove la graduale eliminazione dei test animali nella ricerca e nella tossicologia. Benché a detta degli autori i tempi non siano ancora maturi per avere a disposizione comunemente farmaci prodotti senza test su animali, da più parti si sta lavorando per implementare le metodiche alternative e nei prossimi anni avremo a disposizione numerosi nuovi strumenti per migliorare e far progredire ulteriormente la ricerca senza test animali, che diverranno alla fine l'approccio standard anche per i test clinici di tossicità.

Nature research custom media, Evotec, Cyprotex. Transcriptomics brings new era of toxicology prediction. *nature portfolio* 2022. <https://www.nature.com/articles/d42473-021-00552-2>

Morbo di Parkinson, è giunto il momento di indirizzare le risorse sulla ricerca human based

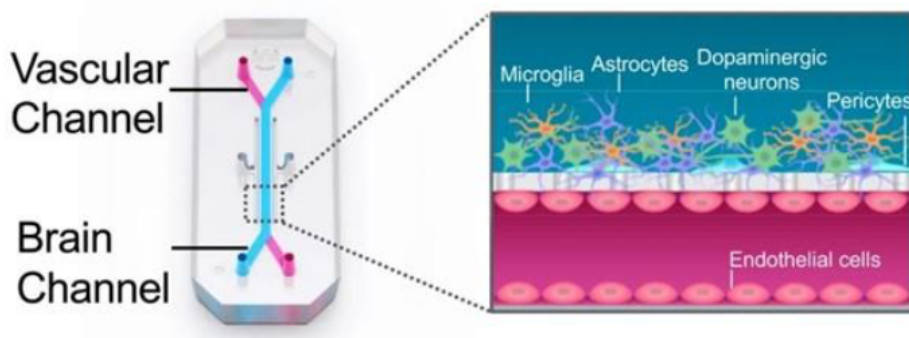


Fig. 3: Substantia nigra brain-chip
Schematic representation of the substantia nigra brain-chip with brain endothelial cells cultured on all surfaces of the lower vascular channel, and dopaminergic neurons, astrocytes, microglia, and pericytes in the upper brain channel, on the upper surface of the central horizontal membrane (Image from Padiaditakis et al., 2021 / CC-BY 4.0).

Il Parkinson è la seconda malattia neurodegenerativa per diffusione dopo il morbo di Alzheimer; si stima che le persone affette da PD (Parkinson disease) siano 10 milioni in tutto il mondo e le previsioni sono di raddoppio dei pazienti entro il 2040.

Nonostante i numerosi sforzi compiuti a livello scientifico, nessun trattamento realmente efficace a lungo termine è stato ancora trovato. Dal 1990 al 2018 si contano circa 23.000 studi condotti su animali, di cui circa un 10% in primati non umani. In generale per mimare le condizioni in vivo tipiche del PD si è provveduto a indurre la malattia negli animali o a modificarli geneticamente, tuttavia con scarsi risultati. **La fallacia della traslabilità di questi modelli è all'origine dei mancati progressi nella scoperta di terapie efficaci.** Oggi abbiamo a nostra disposizione le metodologie alternative basate su tecnologie di ricerca human-based, che possono consentirci davvero di fare luce e chiarezza sui meccanismi di patogenicità all'origine della malattia, sugli sviluppi e sui possibili approcci terapeutici. Un workshop dedicato proprio alla ricerca sul morbo di Parkinson ha messo in luce ciò che sappiamo, cosa stiamo cercando e cosa c'è ancora da fare. **In primo luogo viene sottolineato come benché l'attenzione sia stata puntata da sempre solo sul sistema nervoso centrale, le cause della malattia potrebbero risiedere anche altrove, ovvero nel sistema nervoso autonomo periferico e nel microbiota intestinale. Un altro importante rilievo è quello inerente la progressività nell'insorgenza e l'origine più spesso multi-eziologica della malattia.** La mancata scoperta del meccanismo molecolare alla base del processo degenerativo, rappresenta uno dei principali ostacoli alla realizzazione di terapie efficaci. La componente genetica, benché importante, è coinvolta solo nel 10-15% dei casi di malattia. Per molto tempo si è ritenuto che l'aggregazione dell'alfa-sinucleina fosse l'origine del meccanismo patogenetico, ma

così non è. Si è infatti scoperto che i corpi di Lewy (aggregati citoplasmatici delle proteina alfa-sinucleina, presenti nelle cellule neurali) possono essere assenti in pazienti con PD e viceversa presenti anche in pazienti che non hanno sviluppato sintomi né di PD né di demenza. Dunque dopo moltissimo tempo dalla scoperta dei corpi di Lewy, ancora non sappiamo come la alfa-sinucleina divenga tossica dando seguito allo sviluppo delle sinucleinopatie. A questo proposito molte evidenze sembrerebbero suggerire che alterazioni post traduzionali della proteina, potrebbero portare a una sua forma denaturata in grado di spostarsi da un neurone all'altro e con attività aggregativa simil prionica.

Vediamo ora tutto quanto è già disponibile per lo studio del PD sotto la dicitura di NAMs:

- cellule LHUMES ovvero cellule precursori embrionali neuronali umane, in grado di proliferare e differenziarsi in cellule dopaminergiche morfologicamente e biochimicamente mature; dalla cocultura di queste cellule con astrociti è stato possibile identificare il meccanismo di attivazione del pesticida MPTP (1-metil 4-fenil 1,2,3,6-tetraidro-piridina) in grado di causare una sintomatologia analoga a quella causata dal PD; i limiti sono dati soprattutto dalla bidimensionalità, che non consente di ricapitolare adeguatamente tutti gli aspetti meccanici e fisiologici presenti in vivo e dal mantenimento in vita delle cellule;
- organoidi di cervello strutturati a partire da cellule embrionali, da staminali pluripotenti indotte o altri tipi di cellule, che hanno la caratteristica di essere tridimensionali potendo così ricapitolare in modo molto più efficace le caratteristiche in vivo del tessuto. Sono presenti neuroni, astrociti e oligodendrociti con attività elettrofisiologica. Da sottolineare come lo sviluppo di organoidi a partire da cellule IPSC (staminali pluripotenti indotte) derivanti da pazienti con PD, consenta di studiare in modo specifico la malattia affrontando le differenze genetiche individuali, quelle tra i generi e approntando terapie mirate; organoidi di mesencefalo, prodotti a partire da cellule di pazienti con PD a base genica, hanno evidenziato la presenza di un numero ridotto di astrociti, confermando coerentemente a quanto visto nel cervello umano, che la morte dei neuroni dopaminergici si associa a quella degli astrociti; in questo caso i fattori limitanti sono rappresentati dall'assenza di una vascolarizzazione e nella crescita troppo scomposta delle cellule;
- organi on-chip, in questo caso ne è stato prodotto uno di cervello umano rappresentativo della sostanza nera mesencefalica a partire da cellule IPSC derivate da neuroni dopaminergici, microglia immortalizzata, astrociti primari, periciti primari e cellule IPSC derivate da cellule endoteliali vascolari neuronali. Si è così potuto testare gli effetti degli aggregati della alfa-sinucleina su un modello in grado di ricapitolare molti aspetti cruciali della PD come l'accumulazione dell'alfa-sinucleina fosforilata, l'assorbimento delle fibrille di alfa sinucleina da parte dei neuroni, degli astrociti e delle cellule della microglia, le disfunzioni mitocondriali, la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), la neuroinfiammazione, la morte delle cellule neurali e l'alterazione della barriera ematoencefalica. Da sottolineare come le indagini di trascrittomica condotte sulle cellule endoteliali prelevate dal modello su chip, abbiamo rilevato una maggior espressione di geni coinvolti nei processi infiammatori, nello stress ossidativo, nell'autofagia (rimozione di componenti citoplasmatici danneggiati) e nella deposizione di matrice extracellulare. Nel contempo si assiste invece a una down regulation dei geni che codificano per le giunzioni proteiche serrate, suggerendo così nuovi spunti sia di patogenesi sia di approccio terapeutico;
- le scienze omiche, rappresentate dalla genomica, dalla proteomica, dalla trascrittomica e dalla metabolomica, hanno un ruolo fondamentale e ciascuna è in grado di approfondire elementi salienti per l'individuazione della patogenesi, della diagnosi e della terapia. Consentono di individuare i diversi pattern genetici associati alla forma di malattia, di studiare le proteine che si formano durante la degenerazione, nonché di caratterizzare l'espressione genica delle cellule, etc;
- tecniche di imaging avanzata come la PET (tomografia ad emissione di positroni), la MRI (risonanza magnetica), la fMRI (risonanza magnetica funzionale), l'ecografia transcranica, la magnetoencefalografia e ancora la PMRS (spettroscopia con tecnica di risonanza magnetica protonica) sono già ora di grande importanza, sia per la diagnostica che per la clinica. Sicuramente queste tecniche spesso piuttosto onerose, necessitano di adeguata implementazione al fine di conferire loro maggiore accuratezza e specificità soprattutto nel correlare la notevole massa dei dati ricavati, con gli aspetti patogenetici o clinici tipici della malattia. Da sottolineare l'uso già in essere di traccianti PET per discriminare la PD da altre patologie con sintomi analoghi come l'atrofia multi sistemica e lo studio per individuare traccianti dell'alfa-sinucleina;
- metodi computazionali, svolgono un ruolo importante nell'affrontare una sfida spesso sottovalutata, quella del passaggio dalla fase pre clinica a quella clinica di un potenziale farmaco. Il sistema QSP è un nuovo modello di test che mira a valutare la farmacodinamica e il potenziale terapeutico di nuovi composti, tenendo in considerazione le caratteristiche individuali del paziente. Questo, nel caso specifico della PD, si è tradotto nella formulazione di modelli meccanicistici e di biologia di interazione tra un composto e un circuito neurale, per simulare gli effetti farmacodinamici di un farmaco in relazione al genotipo specifico del paziente, alle terapie concomitanti e alle malattie presenti.

La ricerca preclinica così come è stata condotta fino ad oggi (basata sui modelli animali in vivo e su quelli in vitro di vecchia generazione) ha fallito la sua missione di fornire risposte migliorative per la salute umana. Questo tipo di ricerca, perseguendo in forma eccessiva il riduzionismo, ha puntato la massima attenzione sul singolo gene o proteina, tralasciando che la PD è una condizione umana di maggiore complessità e ad eziologia multifattoriale. La strada è tracciata, ma per far sì che si possa progredire nella sostituzione definitiva dei test sugli animali, c'è bisogno di informazioni e dati scientifici liberamente accessibili, c'è necessità di finanziamenti e di una forma mentis che senza avere paura di mettersi in gioco, sappia porsi innanzi a dati e modelli in modo più innovativo.

Cassotta, M. et al. "The future of Parkinson's disease research: A new paradigm of human-specific investigation is necessary... and possible", *ALTEX - Alternatives to animal experimentation*. 2022. doi: 10.14573/altex.2203161.