

Cari Osanti,

bentrovati! In questo numero l'attenzione sarà rivolta in primo luogo ai progressi raggiunti nell'ambito della ricerca tossicologica, grazie ad una metodologia human-based che combina le caratteristiche dell'organo tiroideo con quelle del fegato deputato al metabolismo dell'ormone medesimo. Vedremo poi uno studio che si è concentrato nel ricreare a partire da cellule alveolari di pazienti fumatori, ex fumatori o affetti da enfisema, un organo-on chip di alveolo polmonare, con annesse caratteristiche biomeccaniche. Infine ci inoltreremo nel campo della ricerca oftalmica, tramite uno studio che è riuscito a classificare le cellule che compongono lo strato pigmentato della retina, aprendo nuove ed importanti prospettive per numerose patologie tra cui la degenerazione maculare.

Un nuovo sistema microfluidico per testare le sostanze che alterano la funzionalità tiroidea

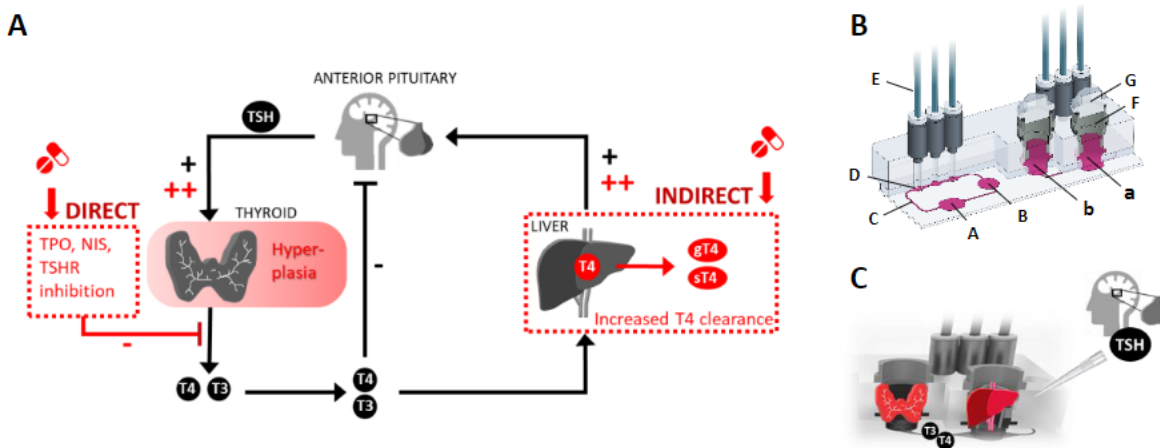


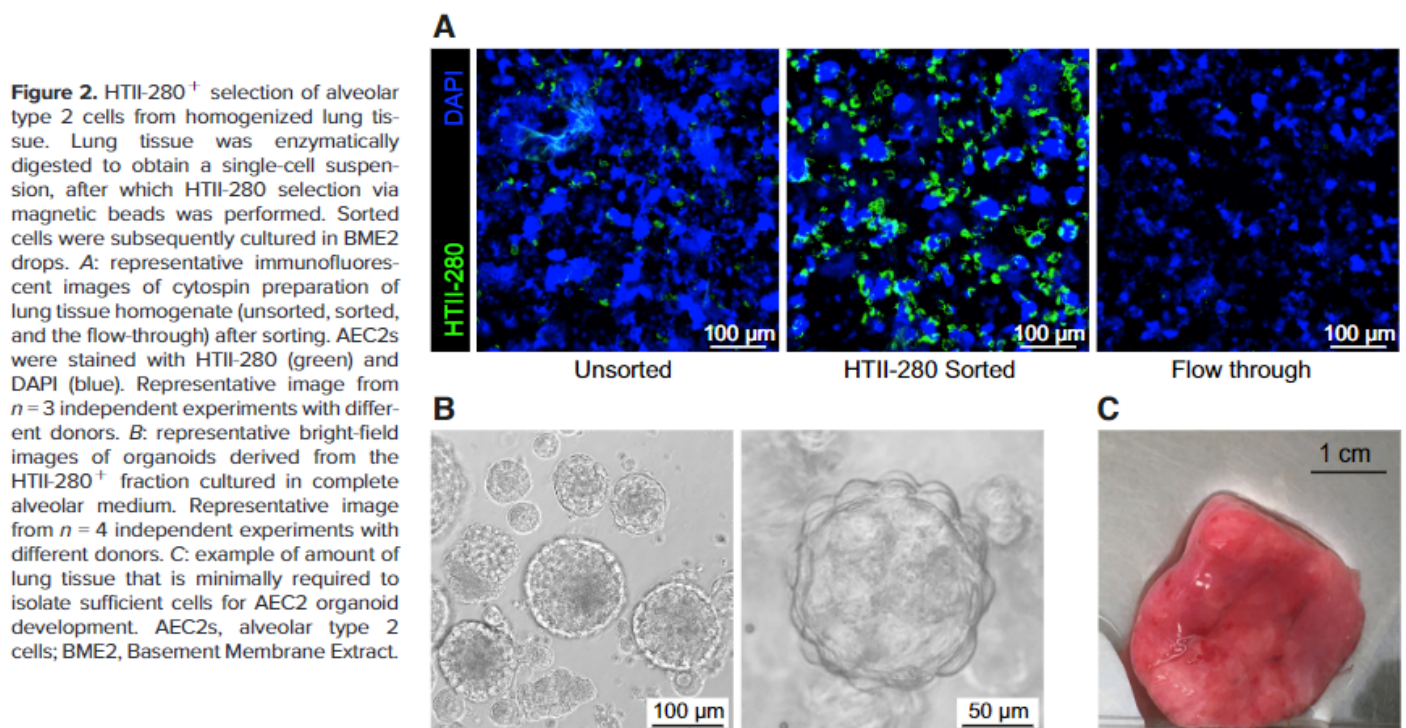
Fig. 1: Hepatic-thyroid axis and its implementation *in vitro*

Gli ormoni tiroidei sono fondamentali per l'equilibrio del metabolismo e ugualmente per la crescita e lo sviluppo cognitivo del bambino. Alterazioni dell'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide possono avere severe ripercussioni sull'organismo ed è per questo che negli ultimi anni l'attenzione si è concentrata proprio sugli effetti che le sostanze chimiche esercitano a questo livello. Nel 2018 EFSA ed ECHA fissano linee guida per la ricerca dei possibili interferenti endocrini nell'ambito dei fitofarmaci, ponendo i test sui roditori a gold standard con risultati traslabili all'uomo. Ora se è pur vero che tra la specie umana e quella murina ricorrono analogie di funzionamento nell'attività tiroidea, soprattutto per quanto concerne le cosiddette perturbazioni tiroidee quanto osservato in ambito murino non si è rivelato altrettanto attendibile in campo umano. **Vi sono significative differenze che contribuiscono a tutto questo a cominciare dall'aumentata sensibilità dei roditori alle variazioni dell'omeostasi tiroidea. Nell'uomo la metabolizzazione del T3/T4 è più lenta con un'emivita aumentata. Molto significative poi le marcate differenze in essere tra le due specie, per quanto riguarda il legame con il carrier proteico che veicola l'ormone nel circolo sanguigno.** E questo è un punto chiave nella definizione del meccanismo AOP (meccanismo che induce un effetto dannoso) di natura neurotossica, che si realizza ogni qual volta uno xenobiotico determina una riduzione del legame proteico con gli ormoni tramite competizione diretta per il sito di legame o per riduzione nella produzione epatica del carrier proteico (TBG e TTR). Esistono già test *in vitro* in grado di identificare gli aspetti biochimici e molecolari delle interazioni tra il composto ritenuto scatenante (composti che agiscono direttamente sulla ghiandola o sul fegato alterando la metabolizzazione ormonale) e il bersaglio cellulare, tuttavia fino ad ora era mancante la possibilità di testare queste sostanze ricreando l'omeostasi del sistema ormonale tiroideo nel suo complesso. Si è dunque lavorato *in primis* per riprodurre un sistema d'organo quanto più possibile aderente alle reali funzioni *in vivo* coinvolte nel circuito ormonale T3/T4. La tiroide è stata prodotta a partire da follicoli di tessuto in 3D, si è dimostrata in grado di produrre ormoni tiroidei e di rispondere al TSH. Il fegato costituito da sferoidi epatici ha mostrato la capacità di effettuare il catabolismo degli ormoni tiroidei e di produrre la TBG (la proteina che lega al 75% gli ormoni TH), l'albumina e le altre proteine di trasporto. La coltura statica di follicoli tiroidei si è rivelata capace di indagare la tossicità diretta sulla tiroide, proprio mediante un AOP caratteristico come quello dell'inibizione della TPO. **La TPO ovvero la perossidasi tiroidea, ha un ruolo molto importante nella produzione ormonale T3/T4 e pertanto rappresenta uno dei principali meccanismi in grado se alterati di inibire la produzione ormonale.** La coltura statica di sferoidi epatici si è rivelata altrettanto utile per la capacità di individuare le sostanze responsabili dell'aumentato catabolismo dell'ormone tiroideo. Dopo aver saggiato le

potenzialità dei singoli sistemi d'organo, si è provveduto ad unire tra loro i diversi tessuti 3D (follicoli tiroidei e sferoidi epatici) in quello che è un **sistema MOC multiorgano su chip**. Le co-culture sono state sviluppate assieme per 21 giorni tramite un apposito sistema fluidico con relative pompe di distribuzione che ne hanno garantito la continuità. Lo studio ha evidenziato che le capacità di ricerca e indagine mostrate dagli organi singoli, venivano mantenute anche dal sistema multi-organo, che se pur necessita di ulteriori studi e perfezionamenti, offre per la prima volta la possibilità di testare gli interferenti endocrini tiroidei su un sistema articolato e complesso com'è quello in vivo. **Dunque mediante questa metodica è possibile vagliare la tossicità diretta dei composti sulla tiroide con relativa inibizione nella produzione ormonale; ma altresì la tossicità indiretta mediata dal fegato tramite un'induzione enzimatica del catabolismo dell'ormone tiroideo; o ancora la possibilità di indagare le alterazioni connesse al trasporto proteico** (legame competitivo o diminuita produzione del carrier a livello epatico). Il sistema multi organo consente dunque di indagare sulle perturbazioni epatiche e tiroidee associate al metabolismo del TH (ormone tiroideo) sia separatamente sia in combinazione.

Kühnlentz, J., Karwelat, D., Steger-Hartmann, T., Raschke, M., Bauer, S., Vural, Özlem, Marx, U., Tinwell, H. and Bars, R. "A microfluidic thyroid-liver platform to assess chemical safety in humans", *ALTEX - Alternatives to animal experimentation* 2022. doi: 10.14573/altex.2108261.

Organoidi e organ-on chip di alveolo polmonare di pazienti con patologia tumorale o enfisematosa



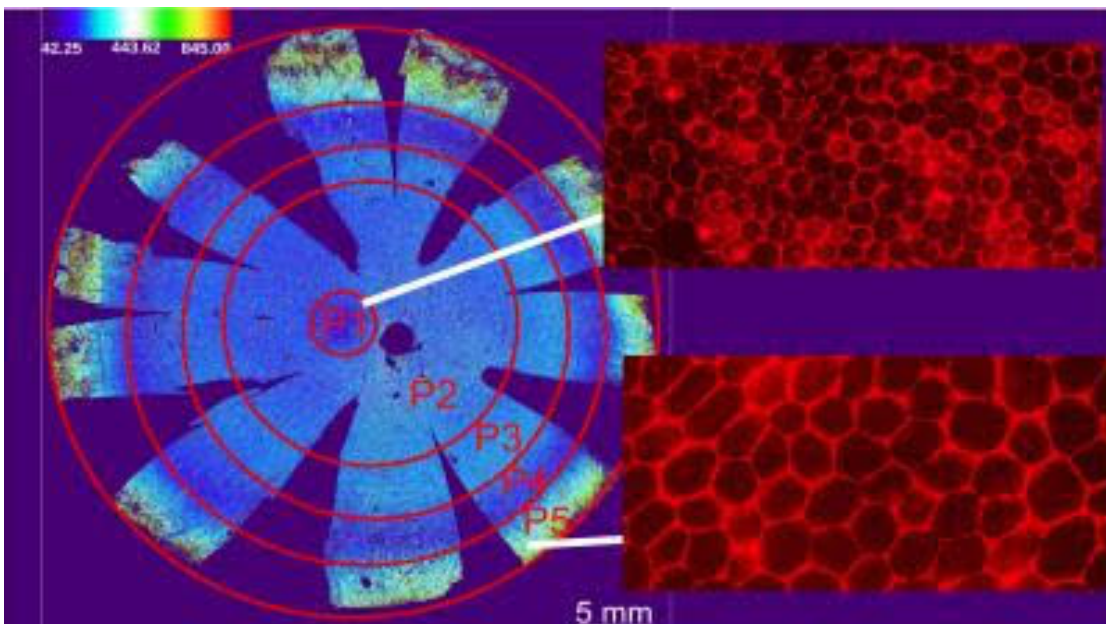
La malattia cronica ostruttiva polmonare è tra le principali cause di morte nel mondo. **Questo è dovuto alla carenza di cure, ma anche agli effetti persistenti e a lungo termine del fumo, ai livelli di inquinamento, all'invecchiamento della popolazione.** La patologia si caratterizza per un'infiammazione cronica e una progressiva distruzione del comparto alveolare, che si traducono in ridotta capacità di scambio gassoso e diminuita elasticità polmonare. Il fumo è senza dubbio il principale responsabile della patologia, ma ad oggi né la sospensione della tabagismo né i farmaci attualmente a disposizione (beta bloccanti, corticosteroidi, antagonisti muscarinici) sono in grado di modificare il corso della malattia. La resezione chirurgica delle porzioni di polmone danneggiate o il

trapianto sono rispettivamente un'opzione per migliorare la qualità di vita nel primo caso e per salvarla nel secondo, che sono tuttavia eseguibili solo in certi casi e con limitazioni. Visti gli scarsi risultati ottenuti con i test su linee cellulari tumorali o su modelli animali, è più che mai necessario rivolgere l'attenzione su modelli preclinici umani che si focalizzano su metodologie innovative come sono gli organi on chip. In questo studio sono stati utilizzati campioni di tessuto polmonare non tumorale derivanti da resezione chirurgica di pazienti non fumatori, ex fumatori e fumatori operati per tumore al polmone ed in aggiunta da pazienti enfisematosi, nei quali era stata praticata una resezione chirurgica del tessuto danneggiato. **Una volta separate e identificate le cellule alveolari AEC2, le stesse sono state opportunamente coltivate in modo da costituire un organoide alveolare. A seguire, le colture utilizzate per gli organoidi sono state dissociate e seminate sia su uno specifico inserto, sia su chip quest'ultimo dotato della capacità di esercitare lo stiramento cellulare elastico (tensione respiratoria) mediante una membrana flessibile.**

Questo studio si dimostra molto innovativo per la modalità di produzione degli organoidi che ha consentito di sviluppare a pieno cellule alveolari con relativo marker di riconoscimento rispettato e regolare produzione di surfactante. In precedenza molto spesso si sviluppavano organoidi con prevalenza di cellule epiteliali respiratorie basali non alveolari; ora con questa metodica con porzioni estremamente limitate di tessuto, si può ricreare un organoide alveolare. Fondamentale per lo sviluppo delle cellule desiderate, è stato l'utilizzo di una tecnica che sfrutta il magnetismo associato alla immunocistochimica per l'identificazione e l'isolamento delle cellule alveolari AEC. **Ma lo studio ha avuto altresì un punto di forza nel voler ricreare quelle forze meccaniche che agiscono realmente all'interno del polmone, mostrando come ha seguito dell'applicazione di forze di stiramento, nelle 24 ore successive si sia registrata una tendenza nelle cellule a muoversi lungo specifiche direzioni.** Se pur i dati raccolti sono ancora troppo pochi per sapere se questo possa essere considerato un analogo della risposta alle sollecitazioni biomeccaniche esercitate in vivo, rappresenta un primo fondamentale step nelle ricerche sulla dinamica polmonare. Come tutti i sistemi innovativi, ci sono limiti da superare soprattutto legati al tasso di proliferazione cellulare piuttosto lento e al non aver ancora identificato chiaramente quali siano i fattori chiave nell'innescare la replicazione delle cellule AEC2 a formare un organoide. Nonostante ciò lo studio si indirizza in modo chiaro verso lo studio delle fisiopatologia polmonare nell'uomo, per dare risposta ai quesiti rimasti fino ad ora irrisolti.

Sander van Riet, et al. Organoid-based expansion of patient-derived primary alveolar type 2 cells for establishment of alveolus epithelial Lung-Chip cultures. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 21 MAR 2022. Vol. 322, No. 4. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00153.2021>

L'esplorazione dell'epitelio pigmentato retinico da parte dell'intelligenza artificiale, offre nuovi strumenti per lo studio delle degenerazioni della retina



Lo studio ha concentrato la sua attenzione sulla caratterizzazione dei diversi tipi cellulari che compongono l'epitelio pigmentato della retina. Le implicazioni dello studio sono ovviamente correlate sia a tutte quelle ricerche che indagano sulle degenerazioni della retina connesse all'età, sia a quelle che si occupano più in generale dei disturbi visivi.

Gli scienziati del NIE (National Eye Institute) hanno identificato **5 sottopopolazioni nell'ambito dell'epitelio pigmentato della retina, epitelio che nutre e sostiene i fotorecettori sensibili alla luce**. Utilizzando l'intelligenza artificiale sono state vagliate le immagini dell'epitelio pigmentato retinico eseguite alla risoluzione unicellulare, al fine di identificare le diverse tipologie di cellule in esso presenti. Questo lavoro, primo nel suo genere, è importante non solo per la comprensione delle caratteristiche di vulnerabilità dell'epitelio alle diverse malattie che lo possono interessare, ma altresì per la messa a punto delle terapie. La visione ha inizio quando la luce colpisce i coni e i bastoncelli che rivestono la retina nella zona posteriore dell'occhio. Una volta attivati, il segnale tramite un complesso sistema di neuroni si raccoglie nel nervo ottico. **La senescenza e le malattie possono causare alterazioni metaboliche a carico delle cellule del RPE (epitelio retinico pigmentato), che esitano nella degenerazione dei fotorecettori**. L'entità del danno sulla capacità visiva si determina in relazione al grado di compromissione dell'epitelio e alla localizzazione delle cellule danneggiate. Ad esempio, la degenerazione retinica ad esordio tardivo colpisce le aree periferiche della retina e dunque impatta in modo più contenuto sulla visione; diversamente la degenerazione maculare (AMD) interessando primariamente le cellule del RPE della macula, area cruciale per la visione, si traduce nella perdita della vista.

In questo studio l'intelligenza artificiale è servita per analizzare la morfometria delle cellule del RPE, la forma e le dimensioni di ciascuna cellula. Il computer è stato addestrato a riconoscere immagini di RPE fluorescenti derivanti da nove donatori sani ed esaminate per la totalità della superficie epiteliale pigmentata retinica. Sono state calcolate le caratteristiche morfometriche di ciascuna cellula di ciascun donatore, per totali 2,8 milioni di cellule per donatore e complessive 47,6 milioni di cellule analizzate. L'algoritmo ha valutato le cellule sulla base di caratteristiche simili fondamentali. Studi precedenti avevano evidenziato che le giunzioni cellulari hanno un ruolo fondamentale nell'attività del RPE e che la loro predominanza era associata a un buono stato di salute delle cellule. **Basandosi sulle analisi morfometriche, il software ha individuato 5 sottopopolazioni di cellule all'interno del RPE indicate con la sigla da P1 a P5 e organizzate in formazioni concentriche attorno alla fovea che rappresenta il centro della macula**, la regione più sensibile alla luce di tutta la retina. Rispetto all'epitelio retinico pigmentato periferico, quello centrale risulta perfettamente esagonale e più compatto, con un alto numero di cellule confinanti. Lo studio ha evidenziato una cosa inaspettata, ovvero che nella zona periferica P4 sono presenti cellule simili a quelle presenti in corrispondenza della macula. Quest'ultima scoperta evidenzia la necessità di ulteriori approfondimenti per saggiare appieno le diverse funzionalità che sembrano emergere nelle varie aree del RPE.

La seconda fase dello studio si è concentrata sull'analisi degli RPE derivanti da soggetti con degenerazione maculare (AMD) correlata all'invecchiamento. In questo caso si è evidenziato l'assenza dello strato P1 causato dalla malattia e alcune differenze tra le sottopopolazioni P2/P5 tra soggetto sano e con AMD. Infine, un successivo passaggio dello studio ha visto l'analisi dei fondi oculari di pazienti affetti da coroideremia o degenerazione retinica senza causa molecolare identificata, dimostrando una diversa suscettibilità delle cellule RPE alle patologie che affliggono il bulbo oculare. Dunque **la metodica si è dimostrata in grado di riscontrare anomalie nella morfometria cellulare, prima che diventino esplicite le degenerazioni** e lo scopo è di arrivare nell'immediato futuro alla messa a punto di una tecnica che consenta di eseguire in modo non invasivo le diagnosi nei pazienti in vita.

Ortolan D, Sharma R, Volkov A, Maminishkis A, Hotaling NA, Huryn LA, Cukras C, Di Marco S, Bisti S, Bharti K. "Single Cell-Resolution Map of Human Retinal Pigment Epithelium Helps Discover Subpopulations with Differential Disease Sensitivity". PNAS. <https://doi.org/10.1073/pnas.2117553119>