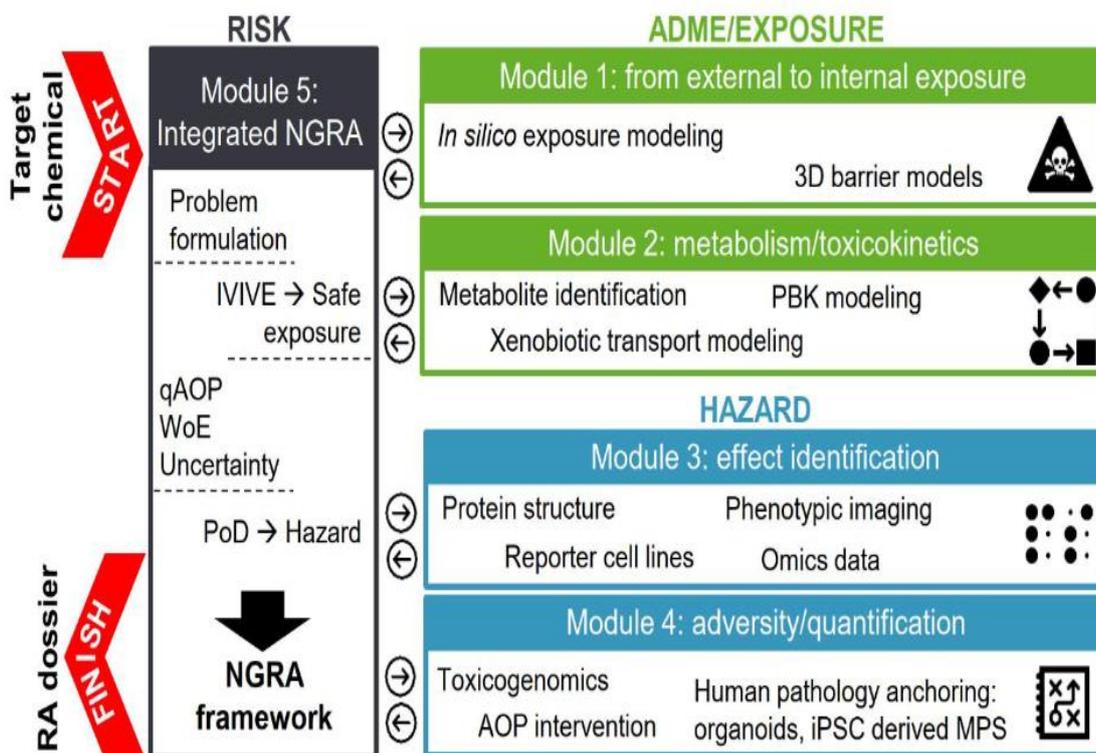


Cari Osanti,

ben trovati. In questo numero ci occuperemo in primo luogo dell'importanza di unire le diverse metodologie human based attualmente conosciute, con lo scopo di implementare sia la quantità che la qualità del risultato finale. Ci soffermeremo poi su un argomento spinoso quale è la reale efficacia e validità dei modelli animali nella ricerca pre clinica. Infine andremo a vedere come gli organoidi renali hanno permesso di svelare alcuni meccanismi patogenetici caratteristici dell'infezione da SARS CoV-2.

La necessità di attuare una sinergia delle metodologie human based attualmente conosciute



L'industria ha una necessità impellente di avere a disposizione metodiche di studio incentrate sulla biologia umana ed è per questo che sono nate e continuano a svilupparsi metodologie di ricerca human based quali sono i NAM. Tuttavia è necessario che le singole metodiche siano unite tra loro in quello che viene definito come il progetto NGRA (next-generation risk assessment) ovvero nella valutazione

del rischio sulla base delle metodiche di prossima generazione incentrate sull'uomo. In quest'ottica nasce il progetto europeo RISK-HUNT3 acronimo di Risk assessment of chemicals integrating human-centric next-generation testing strategies promoting the 3Rs, che ha promosso l'integrazione in ambito tossicologico di metodi computazionali, metodi in vitro e biologia dei sistemi. Questo approccio si tradurrà con tutta probabilità in valutazioni più veloci e nel contempo maggiormente attendibili. L'attività sinergica di più scienziati si concentrerà dunque sull'individuazione delle metodiche più appropriate e sulla loro combinazione con il fine ultimo di definire dei protocolli validi e riconosciuti a livello normativo per sostanze chimiche, pesticidi, additivi alimentari e farmaci. Il modello di ricerca della tossicologia ha guardato per molto tempo esclusivamente alla sperimentazione animale che in virtù delle differenze interspecifiche, della difficoltà di riproporre patologie umane in ambito animale e ancora dell'alto tasso dei falsi positivi (candidato farmaco risultato dannoso nell'animale e dunque scartato ma che tale non è in ambito umano) è risultata inadatta a rispondere ai quesiti di ricerca in ambito tossicologico. Tuttavia, e questo è l'oggetto del presente studio, anche gli attuali NAM presentano delle limitazioni che vengono così riassunte:

- un singolo NAM non è in grado di identificare a pieno un rischio legato a end-point complessi; troppo spesso prevale tra i ricercatori l'atteggiamento di sostituire un test con un solo altro test, quando invece ne occorrerebbero molteplici;
- valutare il rischio con metodiche NAM tra loro combinate è difficoltoso;
- necessità di fissare soglie di assunzione giornaliera e di esposizione quotidiana ad una data sostanza, il tutto in modo più accurato di quanto avvenga ora e con dati derivanti dai NAM;
- mancanza di test nella tossicologia che studia gli effetti cronici, dovuto principalmente alla vitalità ridotta dei tessuti in uso.

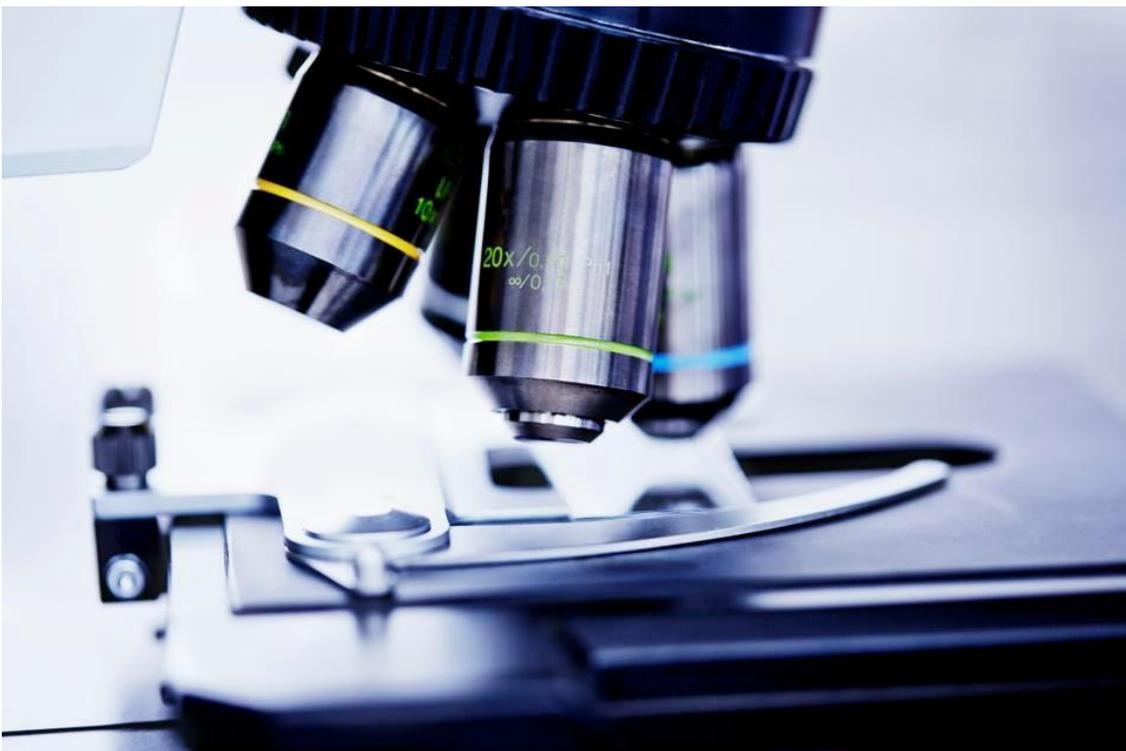
Il progetto ha dunque concentrato in primis la sua attenzione nel biomonitoraggio dei dati derivanti dall'esposizione ai tossici nell'uomo, soprattutto in riferimento alla quantificazione tramite i concetti di inalazione, assunzione e contatto cutaneo. Tutti dati da rendere poi fruibili nei test in riferimento al circolo sanguigno e alle singole dinamiche d'organo; ancora ha cercato di fare il focus sulla capacità di biotrasformazione e di eliminazione rilevati in ambito umano tramite i test in vitro. Lo studio si concentrerà poi sia sulle molecole progenitrici, sia sui metaboliti da essi derivati e tossicologicamente rilevanti. Dopo aver ricavato tutti i dati tossicocinetici e tossicodinamici sulle sostanze d'interesse i medesimi saranno integrati nei modelli tossicologici utili alla valutazione del rischio. Un altro punto importante è stato quello di distinguere tra AOP meccanismo ad esito avverso e i cambiamenti precoci adattativi reversibili e non significativi.

Come si può vedere nello schema tutto il procedimento volto a definire il rischio associato ad un determinato metabolita passa attraverso 4 step, che sono tra loro correlati ma che sono anche rigidamente strutturati. La prima fase è volta al reperimento del materiale e all'individuazione delle caratteristiche intrinseche della sostanza, sia tramite test in silico sia mediante test in vitro che simulano le barriere in 3D. Nella seconda i dati ottenuti vengono inseriti nei modelli di test che simulano i processi fisiologici di base, il focus è dunque sull'assorbimento, trasporto, metabolizzazione ed eliminazione della sostanza. Molto importante la decisione di approntare in questa seconda fase anche strategie di indagine per l'analisi dei metaboliti eventualmente tossici derivati dal composto primario oggetto di indagine. Solo quando si hanno tutti i dati necessari si procede con le terza e quarta fase che sono propriamente quelle dedicate alla caratterizzazione del rischio. Nella terza l'attenzione è tutta rivolta alla definizione degli AOP sia mediante test in silico,

che mediante test in vitro, al fine di individuare il target d'azione e il meccanismo con il quale si realizza. La metodica è in grado di rilevare la maggior parte, sebbene non tutte, le forme di patogenicità. Di sicuro è in grado di individuare sempre il target d'organo colpito, la neurotossicità, e la carcinogenicità non genotossica. Infine abbiamo il modulo 4 che consente tramite sistemi avanzati che sfruttano organoidi, organi-on-chip e la tossicogenomica di valutare quanto precedentemente emerso e ricavare ulteriori dati in termini quantitativi e meccanicistici. Esiste poi un quinto step denominato IATA, che ha la funzione di integrare tra loro tutti i dati ricavati dai precedenti quattro step e verificarne il grado di incertezza complessiva.

Pallocca, G., Moné, M. J., Kamp, H., Luijten, M., van de Water, B. and Leist, M. (2022) "Next-generation risk assessment of chemicals – Rolling out a human-centric testing strategy to drive 3R implementation: The RISK-HUNT3R project perspective", *ALTEX - Alternatives to animal experimentation*. doi: 10.14573/altex.2204051.

Andare oltre il paradigma scientifico ancora dominate del “re nudo”



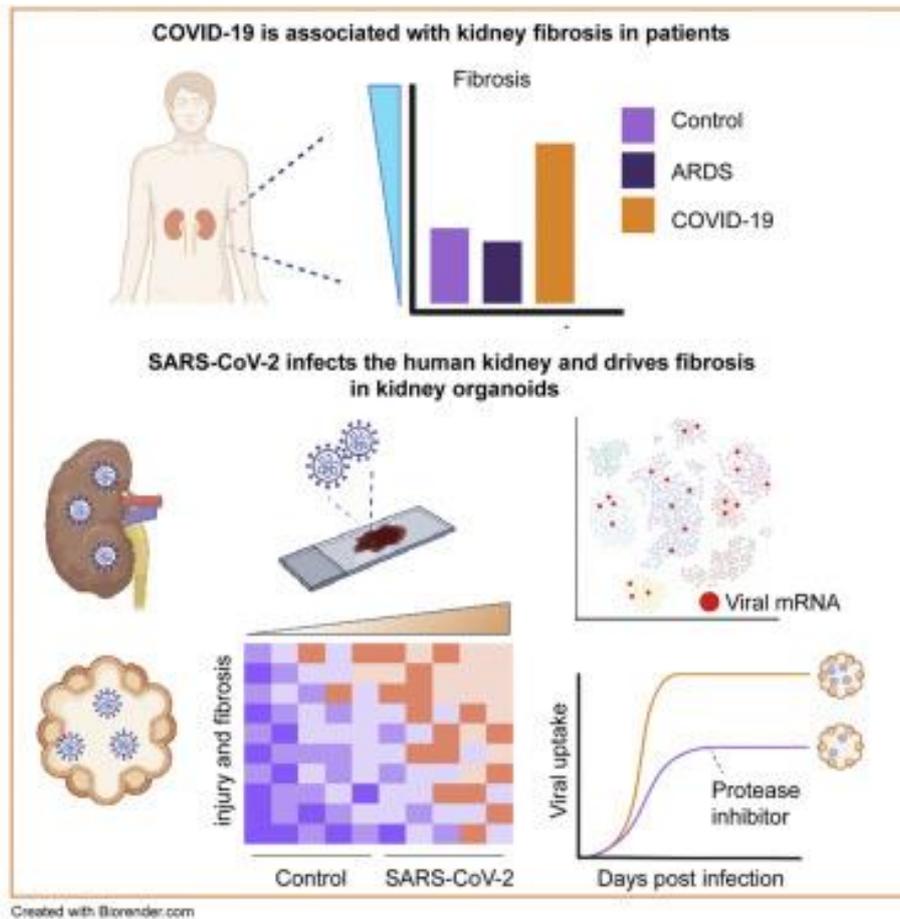
I modelli animali sono stati per molti decenni di estrema importanza nella valutazione dei profili di sicurezza delle terapie farmacologiche. Tuttavia questi modelli hanno il difficile compito di avvicinarsi alla biologia umana e frequentemente possono mancare l'obiettivo.

Il 90% dei farmaci che entrano nella fase 1 dei trial clinici, fallisce mostrando tossicità nell'uomo. Nonostante la portata di questi numeri, molti credono che i modelli animali siano sufficienti per

predire le risposte ai farmaci nell'uomo. Nel corso del novecento i modelli animali hanno consentito di testare le sostanze su organismi complessi, che mostravano reazioni frutto di apparati interconnessi tra loro. Ma i migliori modelli animali rimangono sempre modelli. Le differenze genetiche e fisiologiche in essere tra le specie influiscono sia sulla modalità di distribuzione del farmaco, sia sulla sua metabolizzazione. Questo si traduce secondo gli autori in una predittività di tossicità dei farmaci nell'uomo, di poco superiore a quella che si avrebbe lanciando una moneta. Esaminando le cause del ritiro dei farmaci dal commercio al primo posto troviamo proprio la tossicità. Nel 2014 si è condotto uno studio nel quale 2366 farmaci sono stati testati nell'uomo e negli animali, concludendo che l'assenza di tossicità nell'animale non ha alcun rilievo nell'escludere un'eventuale reazione avversa nell'uomo. Gli esempi in proposito volti a sostenere l'inaffidabilità dei modelli animali sono in continua crescita, e sebbene non si possa definire questi modelli inutili, non sono sicuramente infallibili. Dal momento che i composti tossici possono sfuggire al filtro operato dai modelli animali, e ciò accade spesso, è più che mai urgente che si implementino le metodologie di ricerca. Al fine di ridurre il numero dei composti tossici che entrano in contatto con l'uomo, si rende necessario avvalersi di metodologie precliniche in grado di simulare in modo più accurato sia la fisiologia umana, sia la risposta ai farmaci. In questo senso gli organ-on chip sono una promettente risposta. Si tratta di sistemi di coltura cellulare in 3D incorporati in una matrice extracellulare di natura proteica e soggetti a forze biomeccaniche analoghe a quelle presenti in vivo. Sono molte le evidenze che suggeriscono una migliore e più accurata attendibilità di queste colture rispetto ai tradizionali metodi in vitro. I risultati del più grande studio condotto ad oggi sugli organ-on chip, ha rivelato come questi sistemi siano in grado di predire la tossicità in ambito umano con maggiore sensibilità e specificità, rispetto sia ai modelli animali sia a quelli in vitro classici. Uno studio condotto direttamente dagli autori ha evidenziato una specificità del fegato su chip pari al 100% e una sensibilità all'87%, molto superiori sia ai modelli animali, sia agli sferoidi epatici che sono stati classificati rispettivamente con sensibilità 0% e 47%. Vale la pena ricordare che le 22 sostanze tossiche utilizzate nello studio avevano già provocato 208 decessi e 10 trapianti di fegato, dunque se le stesse indagini fossero state condotte in fase preclinica, avrebbe potuto evitare molte di queste morti. Nel 2019 un paziente che partecipa alla seconda fase del trial clinico del inarigivir (farmaco per l'epatite B in forma cronica) muore. Si scopre solo dopo che nonostante le prove di efficacia e sicurezza in topi, ratti e marmotte, nell'uomo la combinazione del composto con il tenofovir è letale. Nell'agosto del 2021 un team di ricercatori dimostra tramite fegato su chip che il trattamento misto con i due composti (inarigivir+tenofovir) è epatotossico; anche in questo caso si sarebbe potuto prevedere le possibili interazioni dannose per l'uomo. Ancora molti sono sicuramente gli aspetti che necessitano di sviluppo, miglioramento e integrazione, ma tuttavia è l'inerzia il principale ostacolo alla diffusione di queste nuove tecnologie di ricerca. Gli autori concludono sostenendo, con la celebre frase "Il re è nudo", come la verità sulla fallacia dei modelli animali sia ormai ben nota a tutti, ma sia nel contempo taciuta. Per quanto elaborare modelli del corpo umano possa essere una sfida, perseverare con modelli obsoleti che da tempo hanno mostrato tutti i loro limiti, non ha senso e dunque occorre lavorare per mettere a punto nuovi modelli di ricerca, "dobbiamo capire che il topo non ha vestiti e che esistono modelli migliori per la ricerca nell'uomo."

Corbett Jim, The Fallacy And Future Of Preclinical Drug Development, *Forbes* May 26, 2022. <https://www.forbes.com/sites/forbestechcouncil/2022/05/26/the-fallacy-and-future-of-preclinical-drug-development/?sh=592ead825041>

Lesioni renali da SARS CoV-2 e fibrosi



Le lesioni renali si osservano con una certa frequenza in corso di infezione da Covid 19, senza tuttavia sapere se esse siano un effetto diretto del virus o invece esiti secondari di altri processi patogenetici. Questo studio ha permesso di chiarire ed evidenziare come il virus esplichi un'azione lesiva diretta sul tessuto renale, determinando una fibrosi tubulo interstiziale rilevabile nei campioni renali autoptici. Sono stati eseguiti esami su 62 campioni autoptici nei quali a livello del citoplasma dell'epitelio tubulare prossimale, sono stati trovati elementi proteici del nucleocapside del SARS-CoV-2. Paragonando il campione di soggetti con Covid con uno di controllo simile per età, sesso e comorbidità, si è rilevato un netto aumento della fibrosi renale nei pazienti Covid. Al fine di studiare il meccanismo di azione del virus nei confronti del rene, senza l'interferenza degli effetti sistemici e senza l'influenza dei trattamenti effettuati in corso di patologia, si è provveduto a infettare un organoide renale costituito da cellule pluripotenti indotte, con il SARS-Cov-2. Le cellule dell'organoide hanno mostrato l'espressione di due recettori fondamentali per la penetrazione del virus, ACE2 e TMPRSS2. Mediante il sequenziamento dell'RNA cellulare sono state riscontrate lesioni e differenziazione delle cellule infette con attivazione delle vie di segnalazione profibrotica. Inoltre si è rilevata un'aumentata produzione di collagene all'interno dell'organoide. L'utilizzo di un inibitore delle proteasi migliora la situazione. In particolar modo è stato appurato che i podociti e le cellule

epiteliali tubulari sono responsabili dell'attivazione dei fibroblasti interstiziali, che da una prima forma di lesione di tipo acuto, pongono le basi per la successiva cronicizzazione della patologia renale. Nelle cellule tubulari prossimali e nei podociti nei quali è stata riscontrata la trascrizione virale, si è provveduto all'arricchimento dei geni anti apoptotici e proinfiammatori. I risultati hanno mostrato chiaramente l'espressione di geni che inducono la produzione di fattori che innescano il processo fibrotico. Si è dunque provveduto a testare possibili sostanze con azione inibitoria per impedire lo sviluppo dei danni renali. Il test ha riguardato un inibitore della principale proteasi del SARS CoV-2, che si è dimostrato utile nel ridurre la replicazione virale dentro le cellule (ricordiamo che la proteasi ha un ruolo chiave nel meccanismo di replicazione, in quanto è responsabile dei tagli della poliproteina a costituire le singole unità proteiche più piccole coinvolte nell'assemblaggio della particella virale). Gli studi hanno altresì permesso di evidenziare che il rischio di sviluppare insufficienza renale cronica nei pazienti affetti da Covid-19, soprattutto se in forme severe, è molto maggiore rispetto a coloro che hanno forme di distress respiratorio che necessita di terapia intensiva ma che trae origine da forme influenzali o altra causa. L'organoide ha consentito di dimostrare che l'attivazione dei processi fibrotici a livello renale, in corso di Covid-19, non è una conseguenza della risposta del sistema immunitario, e neppure di risposte sistemiche come la diminuita perfusione renale che segue il distress respiratorio acuto, ma un danno diretto del virus. Lo studio ha evidenziato anche che i processi di interconnessione comunicativa tra epitelio/podociti e cellule mesenchimali non si riscontra in altri organi colpiti dal covid come il polmone, il cervello o l'intestino, forse per la diminuita complessità dell'epitelio interstiziale in questi tessuti. In particolare negli organoidi di polmone sono stati riscontrati segnali pro infiammatori, senza tuttavia altre alterazioni fisiopatologiche. Dunque si può concludere che l'organoide mancante di sistema immunitario e di perfusione, ha dimostrato proprio in virtù dell'assenza di azione di componenti sistemiche, come il virus eserciti un'azione diretta dannosa sul rene con azione pro fibrotica. Il sistema necessita di miglioramenti ed ha limiti intrinseci, ma è un valido punto di partenza per futuri studi ancora più accurati e rispondenti alla dinamica fisiopatologica in vivo.

Jansen et al., SARS-CoV-2 infects the human kidney and drives fibrosis in kidney organoids. *Cell Stem Cell* 29, 217–231. February 3, 2022 . <https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.12.010>