

Cari Osanti,

bentrovati! In questo numero vedremo uno studio condotto mediante metodiche in vitro per indagare le sostanze perfluoroalchiliche, così diffuse nel nostro ambiente. Ci soffermeremo poi sullo sviluppo di un organoide di endometrio umano, con tutte le tipologie cellulari presenti in vivo; quindi andremo allo scoperta delle promettenti ricerche condotte su organoidi di tumore del colon-retto, che già oggi trovano applicazione clinica, seppure ancora in forma limitata.

## Studio della patogenicità dei composti perfluoroalchilici mediante test in vitro

**Tab. 2: Immunosuppressive toxicity signatures**

The toxicity signature for each chemical (if more than one sample concentration available, the minimum sample concentration associated with the signature is used) is summarized by the minimum concentration associated with the signature in micromolar concentration units or NA if the signature was not indicated. 31 PFAS and 4 reference immunosuppressants demonstrated the immunosuppression signature. DTXSID = DSSTox Substance Identifier; chnm = chemical name; MW = molecular weight in g/mol units; QC = summarization of analytical QC results for the chemical.

|    | DTXSID          | chnm   | MW       | QC  | Acute toxicity | Immuno-suppression | Liver toxicity | Organ toxicity | Skin irritation | Skin rash | Skin sensitization | Thrombosis | Vascular toxicity |
|----|-----------------|--|----------|-----|----------------|--------------------|----------------|----------------|-----------------|-----------|--------------------|------------|-------------------|
| 1  | DTXSID8 0375107 | 11:1 Fluorotelomer alcohol                           | 600.118  | P   | NA             | 0.4                | NA             | 0.4            | 0.4             | NA        | NA                 | NA         | NA                |
| 2  | DTXSID0 020365  | Cyclosporin A  | 1202.635 | N/A | 18             | 0.7                | NA             | 0.7            | NA              | NA        | 6                  | NA         | NA                |
| 3  | DTXSID3 047429  | Dexamethasone sodium phosphate                       | 516.41   | N/A | NA             | 1.5                | NA             | NA             | NA              | NA        | 1.5                | NA         | 1.5               |
| 4  | DTXSID4 020822  | Methotrexate   | 454.447  | N/A | NA             | 1.5                | NA             | 40             | NA              | NA        | NA                 | NA         | NA                |
| 5  | DTXSID5 060986  | 1H,1H,5H,5H-Perfluoro-1,5-pentanediol diacrylate     | 320.187  | P   | 60             | 2.2                | NA             | 2.2            | NA              | NA        | 20                 | NA         | NA                |
| 6  | DTXSID8 0379721 | 1H,1H,6H,6H-Perfluorohexane-1,6-diol diacrylate      | 370.195  | P   | 60             | 2.2                | NA             | 2.2            | NA              | NA        | NA                 | NA         | NA                |
| 7  | DTXSID1 0224331 | 2,2,3,3-Tetrafluoropropyl acrylate                   | 186.106  | P   | NA             | 2.2                | NA             | 2.2            | NA              | NA        | 2.2                | NA         | NA                |
| 8  | DTXSID7 060332  | (Perfluorobutyl)-2-thenylmethane                     | 322.2    | P   | 60             | 2.2                | NA             | 6.7            | NA              | NA        | 20                 | NA         | NA                |
| 9  | DTXSID4 0108559 | Ammonium perfluoro-2-methyl-3-oxahexanoate           | 347.084  | N/A | NA             | 2.2                | NA             | 2.2            | 2.2             | NA        | NA                 | 2.2        | NA                |
| 10 | DTXSID4 020119  | Azathioprine   | 277.26   | N/A | NA             | 4.2                | NA             | 13             | NA              | NA        | 4.2                | NA         | NA                |
| 11 | DTXSID4 0380797 | 1H,1H-Perfluoro-3,6,9-trioxadecan-1-ol               | 398.076  | F   | 60             | 6.7                | NA             | 20             | NA              | NA        | NA                 | NA         | NA                |
| 12 | DTXSID0 0194615 | 1H,1H,9H-Perfluorononyl acrylate                     | 486.152  | P   | NA             | 6.7                | NA             | 6.7            | NA              | NA        | 2.2                | NA         | NA                |
| 13 | DTXSID5 0382621 | 7:3 Fluorotelomer alcohol                            | 428.141  | P   | 60             | 6.7                | NA             | 6.7            | NA              | NA        | NA                 | NA         | NA                |
| 14 | DTXSID6 027426  | 2-Perfluoroocetyl-sulfonyl-N-ethylaminoethyl alcohol | 571.25   | P   | 60             | 6.7                | 60             | 2.2            | NA              | NA        | 20                 | 6.7        | 6.7               |
| 15 | DTXSID8 0371164 | Perfluoro(2-(2-propoxypropoxy)-1H,1H-propan-1-ol)    | 482.093  | F   | 20             | 6.7                | NA             | 6.7            | NA              | NA        | NA                 | NA         | NA                |
| 16 | DTXSID9 0190949 | 1,6-Diiodoperfluorohexane                            | 553.856  | P   | 20             | 20                 | NA             | 6.7            | NA              | NA        | NA                 | NA         | NA                |
| 17 | DTXSID5 059799  | 1H,1H-Perfluoroocetyl acrylate                       | 454.135  | P   | NA             | 20                 | NA             | 20             | NA              | NA        | NA                 | NA         | NA                |

Gli studi condotti su linee cellulari primarie, hanno consentito di indagare più approfonditamente i meccanismi di patogenicità correlati all'utilizzo delle sostanze perfluoroalchiliche e polifluoroalchiliche (PFAS). Queste sostanze, presenti numerose nei prodotti in commercio, sono responsabili di danni alla salute in forme strettamente correlate al tipo di esposizione. Le restrizioni a livello internazionale all'utilizzo di alcune categorie come quelle dei PFOS e dei PFOA, ha portato all'immissione di nuovi composti PFAS alternativi. Attualmente l'OCSE ha stilato una lista di sostanze appartenenti alla categoria dei PFAS comprendente 4730 composti autorizzati all'utilizzo commerciale. I NAM già da tempo si stanno rivelando molto utili nell'indagare i meccanismi di tossicità di questi composti, al momento a noi ancora ignoti. **In particolare uno dei meccanismi ad essere indagati per primo è stato quello della immunosoppressione, che già era noto in vivo per PFOA e PFOS, con attività inibente i linfociti T, mediata da reazione anticorpale e ridotta risposta alle vaccinazioni.** Questa ricerca ha così provveduto a testare 147 sostanze PFAS su un

pannello di linee cellulari primarie, volte a ricapitolare la complessità dei diversi tessuti e delle differenti interazioni in corso di patologia (cellule vascolari, di polmone, della pelle e del sistema immunitario). Per far ciò si utilizza un pannello di 12 test che consente di indagare 148 endpoints, evidenziando in particolar modo quali siano i modulatori e gli effettori della risposta a livello vascolare e immunitaria. Ma più in generale questi test consentono di indagare la risposta legata all'autoimmunità, la modulazione dell'infiammazione vascolare, l'attivazione dei monociti, l'infiammazione e la fibrosi polmonare, l'infiammazione cardiovascolare e infine i processi riparativi delle ferite. Sulla base di una serie di criteri ben definiti, sono stati dunque selezionati 147 composti PFAS da testare nel pannello e 4 composti noti per la loro attività immunosoppressiva (l'azatioprina, la ciclosporina A, il desametasone, il methotrexate). Partendo dal vagliare quelle che sono state le risposte dei composti PFAS analoghe a quelle dei quattro composti noti di riferimento, si è supposto che i primi possano mostrare un'attività sul comparto cellulare analoga a quella esercitata dagli immunosoppressori. Sono state testate 4 differenti concentrazioni di principio attivo a dosaggi non elevati e si è inoltre confrontato i risultati dei test con data set di risposte a questo stesso pannello di test, al fine di migliorare ulteriormente la comprensione dei possibili meccanismi di patogenicità. Sono stati indagati i fenomeni di epatotossicità, tossicità acuta, irritazione cutanea, sensibilizzazione cutanea, tossicità vascolare. **I risultati hanno evidenziato che in molti casi i PFAS esercitano la loro azione immunosoppressiva diversamente da quanto conosciuto per gli immunosoppressori di riferimento.** Sono emersi molti dati che consentiranno in studi successivi di definire e approfondire le modalità con le quali i PFAS possono risultare dannosi per la salute umana.

Houck, K., Paul Friedman, K., Feshuk, M., Patlewicz, G., Smeltz, M., Clifton, M. S., Wetmore, B. A., Velichko, S., Berenyi, A. and Berg, E. L. (2022) "Evaluation of 147 perfluoroalkyl substances for immunotoxic and other (patho)physiological activities through phenotypic screening of human primary cells", *ALTEX - Alternatives to animal experimentation*. doi: 10.14573/altex.2203041.

## Organoide umano di endometrio

L'organoide di endometrio umano riproduce le funzionalità del tessuto epiteliale in vivo ed è inoltre influenzabile da parte dagli ormoni della riproduzione. La trascrittomica agevola il riconoscimento delle singole tipologie cellulari presenti nell'organoide:

- cellule progenitrici;
- cellule epiteliali;
- cellule secernenti;
- cellule ciliate.

Gli organoidi derivanti da prelievi di tessuti in situazioni normali, sono per lo più utilizzati per lo studio delle condizioni fisiologiche in vivo. Un importante passo avanti nel prelievo dei materiali biologici, deriva da alcuni studi che hanno evidenziato come il materiale derivante dal flusso mestruale, può essere efficacemente utilizzato come metodica non invasiva per prelevare materiale cellulare, in grado di dar vita a tessuti ed organoidi al pari di quelli ottenuti mediante biopsia. **Vi sono poi organoidi tumorali derivati da pazienti, che vengono utilizzati soprattutto per testare la sensibilità del tumore ad un determinato farmaco, in ragione della similarità delle proprietà immunoistochimiche e istomorfologiche in essere tra l'organoide tumorale e il tumore in vivo.** Il sequenziamento dell'RNA è in grado di distinguere chiaramente organoidi tumorali da quelli derivanti da tessuti sani; inoltre una coltura con tutti gli elementi cellulari tipici del tumore primario, è da preferire a quelle che necessitano di ripetuti passaggi per la loro messa a punto, in quanto non necessita per lo sviluppo della somministrazione di fattori endogeni per la crescita cellulare. Bisogna

infatti ricordare che le cellule staminali, benché abbiano una funzione auto rinnovatrice che è alla base della possibilità di rigenerazione e riparazione per tutti i tessuti, necessitano comunque di specifici segnali di attivazione, in grado di dar seguito ai cicli replicativi cellulari. Il materiale per dar origine all'organoide può essere ricavato anche da tessuto deciduo derivante da biopsia in vivo (a scopo diagnostico) o a seguito di intervento chirurgico o ancora da tessuto placentare. Un altro aspetto molto importante risiede nel trattamento dell'organoide con estrogeni, progesterone e adenosina monofosfato ciclico, al fine di simulare e indagare l'impianto in utero e la comunicazione paracrina del secretoma nell'interfaccia madre-feto.

Liquan Lou, Shuangbo Kong, Yunyan Sun, Zhenbo Zhang, Haibin Wang. Human Endometrial Organoids: Recent Research Progress and Potential Applications. *Front Cell Dev Biol.* 2022 Feb 15;10:844623. doi: 10.3389/fcell.2022.844623. eCollection 2022.

## Tumore del colon-retto, il futuro nella medicina personalizzata e nell'approccio integrato

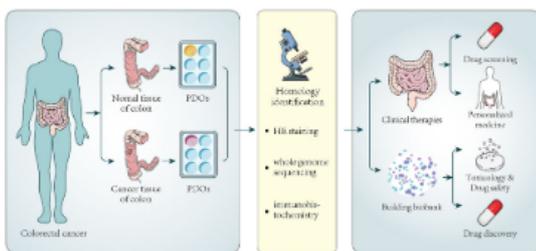


FIGURE 2. Establishment of colorectal cancer organoids and its application in clinical therapy and biobank. Tumor tissues and normal tissues of a certain number of colorectal cancer patients are collected to generate PDOs. Next, HE staining, immunohistochemistry, and whole-genome sequencing analysis are used to confirm that PDOs have similar histopathological features and genomic features to the original tumors. Part of PDOs can be directly used for drug screening and personalized medicine. The screening of new drugs always needs a large number of PDOs. Once a new drug appears, it can be used to test the potential activity and toxicity of new drugs, improving the speed and success rate of new drug development and promoting drug development. The other parts of PDOs can be stored to establish biobanks. The biobank contains a certain number of patient organoids, and the analysis of PDOs also makes it possible to compare drug sensitivity between individual patient responses.

Il tumore del colon-retto rappresenta ancora la terza causa di morte correlata a patologia tumorale, e i dati sono in crescita. L'origine è multifattoriale, accanto ad una componente genetica vi sono molti altri elementi come la malattia infiammatoria intestinale, una dieta ad alto contenuto di grassi, una dieta povera di fibre e l'obesità; ma ancora il fumo, lo scarso esercizio fisico, e l'anzianità del soggetto. La colonscopia quale esame di diagnostica precoce rimane a tutt'oggi l'esame più specifico e sensibile per individuare le lesioni adenomatose precancerose ed evitare che nell'arco dei 5-10 anni successivi, si trasformino in veri e propri tumori. Per altro i dati ci dicono che la sopravvivenza post chirurgica a seguito di rimozione precoce ha dei tassi di guarigione molto alti, diversamente il tasso si abbassa drasticamente per le forme tardive con metastasi linfonodali. Da moltissimo tempo si studia su linee cellulari e su modelli animali, ma senza risultati significativi. **Per questo si è cominciato ad utilizzare gli organoidi che risultano in grado di oltrepassare il gap tra modelli animali per l'appunto e individuo umano.** Gli organoidi sono costituiti da tessuti 3D derivanti da materiale prelevato dai pazienti con tumore. Questo consente il mantenimento della composizione molecolare

e cellulare del tumore, nonché un alto grado di omologia e complessità con il tessuto del paziente. Questa tipologia di organoide derivata direttamente dal paziente, rappresenta una organoide tumorale personalizzato, in grado di rivelare più accuratamente l'insorgenza, lo sviluppo e la formazione delle metastasi tumorali, e ancora di prevedere la risposta farmacologica nel paziente. **Pertanto questo tipo di organoide mostra un grande potenziale soprattutto nella ricerca preclinica volte allo screening dei farmaci ma anche nel predire la risposta del paziente.** La personalizzazione consente infatti di studiare il principio attivo più efficace, di escludere quelli dannosi o causa di effetti avversi in quello specifico paziente o ancora di indagare fenomeni di farmaco resistenza, consentendo la selezione della terapia più appropriata. L'organoide tumorale è stato utilizzato dai ricercatori per l'elaborazione di modelli di malattia, per la ricerca biologica di base, per la costruzione di biobanche di organoidi, per gli screening farmacologici e per la medicina personalizzata, per lo sviluppo di farmaci e per testare tossicità e sicurezza, nonché per la medicina rigenerativa. La direzione futura è quella di ricreare sempre più le reali condizioni in vivo e la molteplicità di interazioni che vi hanno luogo. Sono già allo studio organoidi con annessa vascolarizzazione o altri in cui le cellule neurali migrano nel mesenchima intestinale. Tutto questo, quando sarà stato messo a punto, consentirà di mimare molto più fedelmente di quanto avvenga oggi lo sviluppo tumorale. Sempre più spesso si è vista l'importanza di ricercare non solo sulle cellule carcinomatose tal quali, ma altresì sul tessuto stromale; sono soprattutto i fibroblasti e i vasi sanguigni che sono indotti a proliferare dalle cellule tumorali, ma che rappresentano al contempo un facilitatore della proliferazione di queste ultime. I ricercatori sottolineano come altrettanto fondamentale sia l'integrazione delle diverse metodologie di ricerca, ovvero non solo i diversi organoidi o organi on chips, ma l'associazione con la diagnostica per immagini, la genomica, l'intelligenza artificiale (dunque l'importanza di avere una visione d'insieme frutto di un approccio integrato). Ad oggi intanto il modello di organoide già in uso, ha consentito un approccio clinico personalizzato che ha prolungato la vita di alcuni pazienti soprattutto se affetti da tumore del colon-retto in stadio avanzato.

Lianxiang Luo, Yucui Ma, Yilin Zheng , Jiating Su, Guoxin Huang. Application Progress of Organoids in Colorectal Cancer. *Front Cell Dev Biol.* 2022 Feb 22;10:815067. doi: 10.3389/fcell.2022.815067. eCollection 2022.