

5. Giugno

La trascrittomiche spaziale, ricordando Guido Sacerdoti

Abbi cura dei tuoi ricordi perché non puoi viverli di nuovo.

Bob Dylan

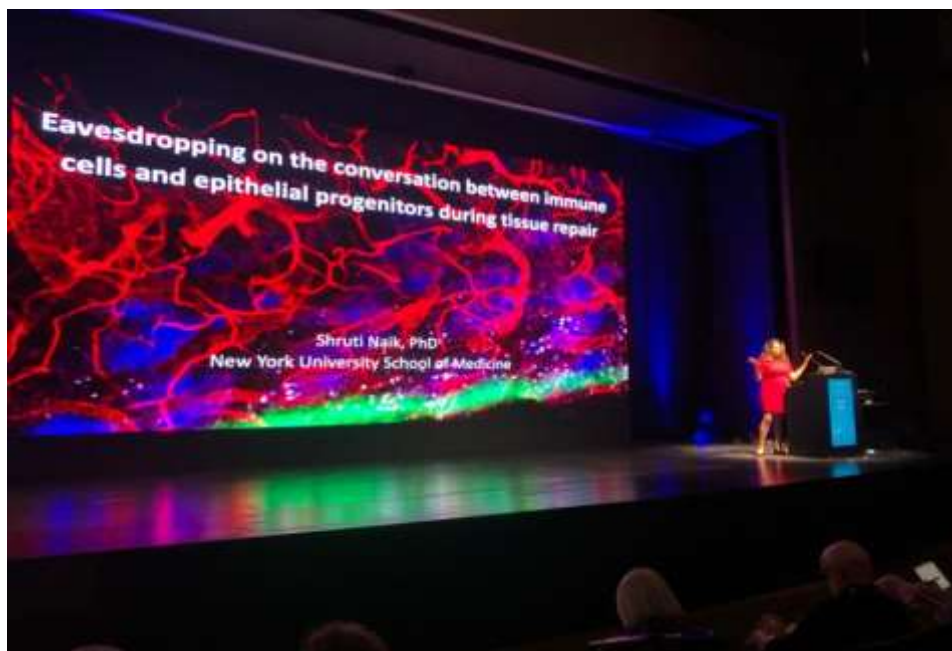
A chi legge

Albert Einstein riteneva che la coincidenza è il modo di Dio di restare anonimo. Io penso che certe coincidenze sembrano mettercela tutta per farci credere nel destino. Stamattina mentre mi accingeva a preparare il report quotidiano per Badeker ho ricevuto la mail di Guglielmo Scala che mi ha cortesemente inviato il suo ricordo di Guido Sacerdoti. Il report che stavo preparando sul lavoro di Naik Shiruti sulla trascrittomiche spaziale tecnologia che consente, tra l'altro, di stratificare la gravità della malattia psoriasica ho pensato che sarebbe enormemente piaciuto a Guido, pertanto l'invito di Guglielmo a frequentare nel suo ricordo a frequentare **i non luoghi** mi hanno convinto che **versonondove** poteva essere un contenitore fruibile a tutti del ricordo di Guido.

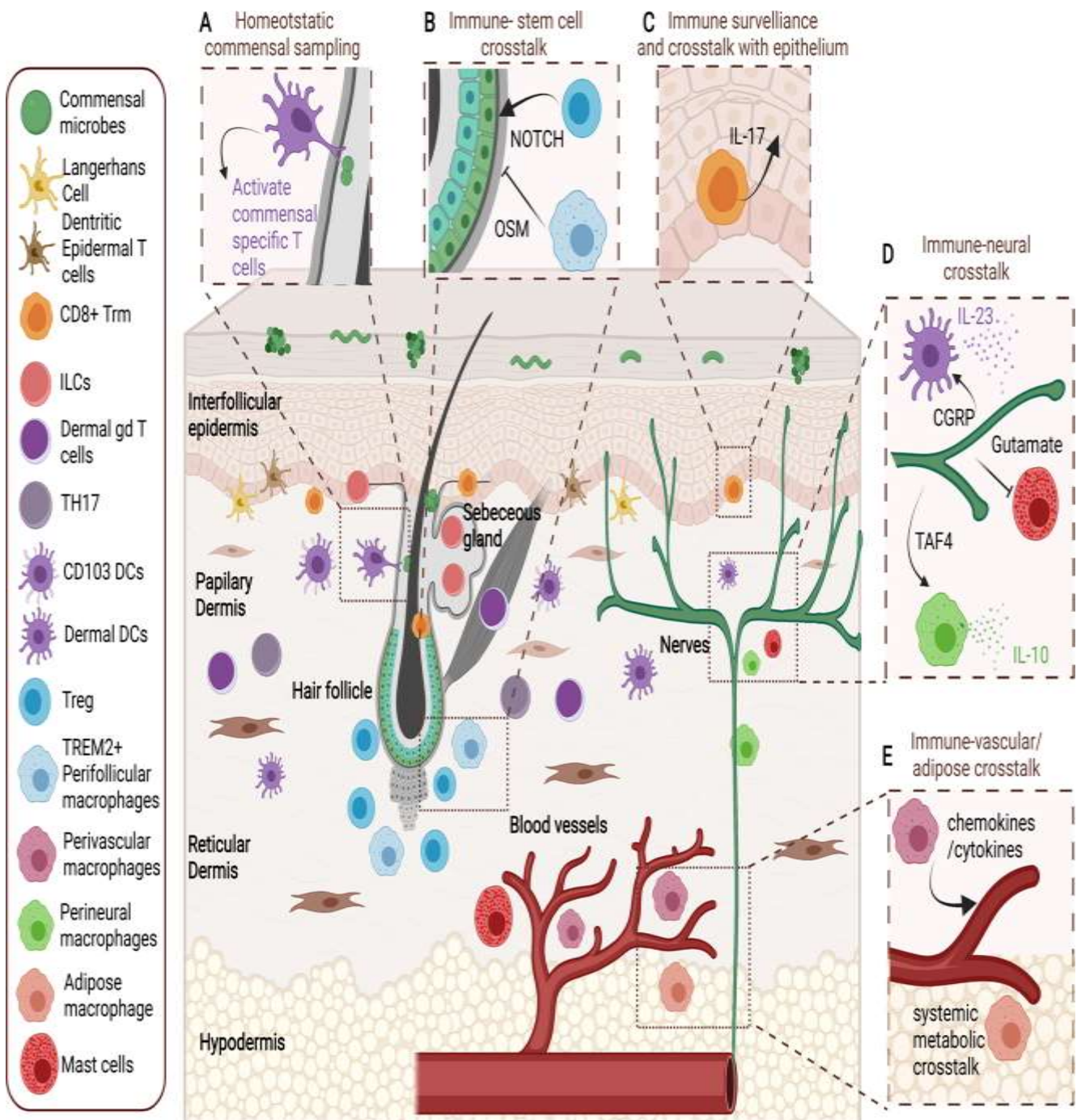
Premessa

La barriera epiteliale più esterna del nostro corpo, la pelle, funge da prima linea di difesa contro una miriade di aggressori ambientali. Per difendersi e combattere queste minacce eterogenee, la pelle ha sviluppato un **sofisticato arsenale immunologico**.

Naik Shiruti talentuosa ricercatrice del **Dipartimento di Medicina, NYU Langone Health, New York (vedi allegato)** attraverso una serie di puntuali e perfette osservazioni ha ricostruito una panoramica della complessa architettura della pelle e delle distinte **micronicchie** in cui risiedono e funzionano le cellule immunitarie.



Le nicchie secondo Naik Shiruti



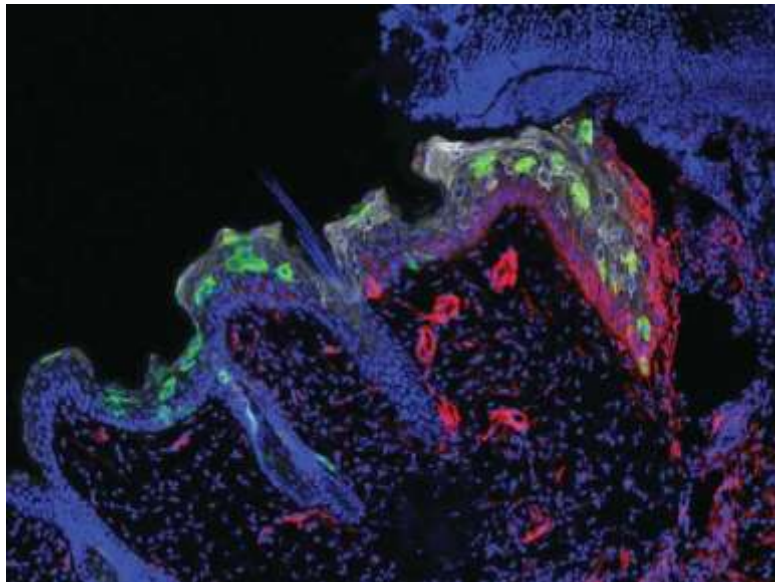
La tavola riproduce le risposte delle cellule immunitarie, stromali, epiteliali e neuronali nella pelle sana e infiammata, i meccanismi distinti della sorveglianza immunitaria a lungo termine e dell'adattamento dei tessuti alla frontiera cutanea.

In particolare viene evidenziato il contributo delle cellule immunitarie nel mantenimento e nel ripristino dell'integrità dei tessuti.

Naik S. *One Size Does Not Fit All: Diversifying Immune Function in the Skin.* J Immunol. 2022 Jan 15;208(2):227-234.

La formazione **dell'arsenale immunitario cutaneo** inizia prima della nascita e si evolve nel corso della nostra vita, incorporando segnali esogeni da microbi e incontri infiammatori, per raggiungere una forma fisica e una funzione ottimali. Questo si realizza attraverso la produzione di segnali specifici del contesto che guidano le risposte immunitarie produttive nell'epitelio cutaneo, nei **compartimenti staminali** attraverso l'attività di **modulatori chiave** di queste reazioni, inclusi i follicoli piliferi, i neuroni e i microbi commensali.

Kobayashi T et al. Choreographing Immunity in the Skin Epithelial Barrier. Immunity. 2019 Mar 19;50(3):552-565.



Celle staminali (verde) epitelii migrano durante un processo riparativo

Questa protezione biofisica e immunologica correla con l'attività trascrittomiche di oltre **500.000** singole cellule dallo sviluppo di pelle fetale umana, pelle adulta sana e pelle adulta con dermatite atopica e psoriasi.

Il team dell' **Istituto di bioscienze, Università di Newcastle, Newcastle** ha confrontato questi set di dati per confrontare gli stati cellulari durante lo sviluppo, l'omeostasi e la malattia. L'analisi ha rivelato un arricchimento delle cellule immunitarie innate nella pelle durante il primo trimestre e l'espansione clonale dei linfociti associati alla malattia nella dermatite atopica e nella psoriasi. In particolare la ricomparsa in situ di cellule endoteliali vascolari prenatali e programmi cellulari di macrofagi nella dermatite atopica e nella pelle lesionale della psoriasi.

Reynolds G et al Developmental cell programs are co-opted in inflammatory skin disease. Science. 2021 Jan 22;371(6527):eaba6500.

In questo quadro generale siti anatomici immunologicamente importanti, come annessi cutanei (ad esempio, follicoli piliferi e ghiandole sudoripare) o venule postcapillari, fungono da portali speciali per le cellule immunitarie e per stabilire strutture linfoidi terziarie, compreso il tessuto linfoide associato alla pelle inducibile.

Kabashima K et al., The immunological anatomy of the skin. Nat Rev Immunol. 2019 Jan;19(1):19-30.

La psoriasi è una malattia infiammatoria cronica con una forte componente genetica che può essere scatenata da fattori ambientali. La patogenesi della malattia è principalmente guidata dalle cellule produttrici di **citochine di tipo 1 e di tipo 17** che, negli individui sani, sono modulate dalle cellule **T regolatorie (Tregs)**.

Le *Treg* svolgono un ruolo fondamentale nell'omeostasi immunitaria e contribuiscono alla prevenzione delle malattie autoimmuni sopprimendo le risposte immunitarie. Nella psoriasi, le *Treg* sono compromesse nella loro funzione soppressiva che porta a un equilibrio alterato *T-helper 17/Treg*.

Sebbene la disfunzione delle *Treg* nei pazienti con psoriasi sia associata all'esacerbazione della malattia, non è noto come siano regolate dal punto di vista funzionale.

Nussbaum L et al. Rol of regulatory T cells in psoriasis pathogenesis and treatment. Br J Dermatol. 2021 Jan;184(1):14-24.

Il team del **Laboratorio di Dermatologia Investigativa, The Rockefeller University** ha (sorprendentemente) , evidenziato come la psoriasi lieve sia era caratterizzata da un numero più elevato di cellule T nelle lesioni cutanee, una maggiore espressione di IL-17A e una più forte espressione del trascrittoma centrale della psoriasi. Al contrario, la psoriasi grave era caratterizzata da una più forte espressione di alcuni geni di risposta epidermica (TGFA, CALM1, SMPD3 e IL1RL2).

LKim J et al. The Spectrum of Mild to Severe Psoriasis Vulgaris Is Defined by a Common Activation of IL-17 Pathway Genes, but with Key Differences in Immune Regulatory Genes. J Invest Dermatol. 2016 Nov;136(11):2173-2182.

Attualmente Le metodologie di sequenziamento dell'RNA a singola cellula (scRNA-seq) ad alto rendimento consentono la caratterizzazione di campioni biologici complessi aumentando il numero di cellule che possono essere profilate contemporaneamente. Tuttavia, questi approcci recuperano meno informazioni per cella rispetto alle strategie a basso rendimento. Per riportare con precisione l'espressione delle principali caratteristiche fenotipiche delle cellule, sono necessarie piattaforme scRNA-seq che siano sia ad alta fedeltà che ad alto rendimento come quella di **Naik Shiruti**

L'analisi del pattern delle proteine o degli *RNA messaggeri (mRNA)* nelle sezioni di tessuto istologico è una pietra miliare nella ricerca biomedica e nella diagnostica. Ciò comporta in genere la visualizzazione di poche proteine o geni espressi alla volta.

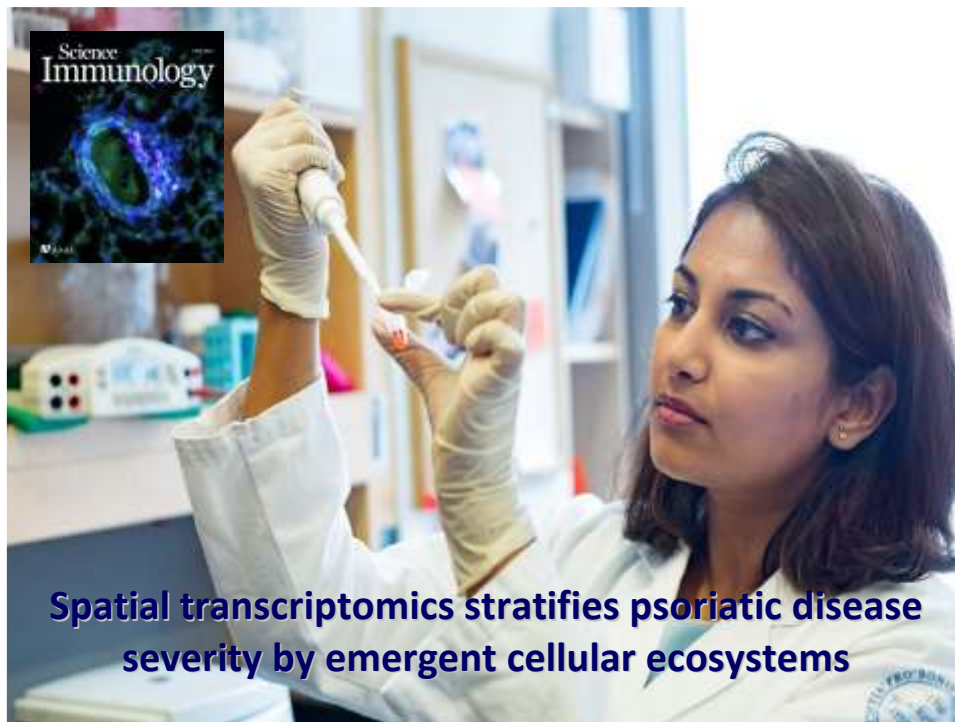
Attraverso la "*trascrittomica spaziale*" l'azione è l'analisi quantitativa del trascrittoma con risoluzione spaziale in singole sezioni di tessuto.



Il team di **Giared Liu** del *Dipartimento di Dermatologia, Università della California San Francisco, San Francisco, California*. Utilizzando la profilazione di cellule singole ad alta risoluzione nel tessuto, ha rilevato il diverso panorama delle cellule T CD8 + nella pelle psoriasica e sana, inclusi 2 sottogruppi di cellule Tc17 non esauriti associati alla gravità della malattia.

Liu J et al Single-cell RNA sequencing of psoriatic skin identifies pathogenic Tc17 cell subsets and reveals distinctions between CD8+ T cells in autoimmunity and cancer. J Allergy Clin Immunol. 2021 Jun;147(6):2370-2380.

Il report di **Naik Shiruti**



ha esaminato la composizione delle nicchie immunitarie all'interno delle biopsie cutanee ottenute da pazienti affetti da psoriasi con o senza artrite e individui sani. Integrando la *trascrittomica spaziale* con i dati di *trascrittomica delle singole cellule* pubblicamente disponibili per ottenere la risoluzione cellulare.

Hanno così potuto dimostrare come la **psoriasi** sia associata al riposizionamento delle cellule immunitarie, **comprese le cellule B**, negli strati superiori della pelle.

Le caratteristiche patologiche rilevate nella psoriasi erano presenti infatti sia nella pelle lesionata che non lesionata, dimostrando gli ampi effetti dell'infiammazione psoriasica anche distalmente rispetto alla pelle clinicamente colpita.

Grazie alla **trascrittomica spaziale** si è potuto anche stratificare i campioni sulla base della gravità clinica della malattia, evidenziando profondi cambiamenti nell'organizzazione spaziale della pelle durante la progressione della psoriasi.

Nel dettaglio:

Premesso che la **psoriasi umana** è una condizione immunitaria prototipica con un'elevata predilezione per il coinvolgimento extracutaneo. Le analisi di **trascrittomica spaziale (ST)** di 25 biopsie cutanee sane, attive e clinicamente non coinvolte e l'integrazione con i dati pubblici di

trascrittomiche a singola cellula hanno rivelato marcate differenze nelle micronicchie immunitarie tra pelle sana e infiammata.

La cartografia su scala tissutale ha ulteriormente identificato le caratteristiche principali della malattia in tutte le lesioni attive, inclusa l'emergenza di uno stato epidermico soprabasale infiammato e la presenza di **linfociti B** nella pelle lesionata.

Entrambi i campioni lesionali e distali non lesionali sono stati stratificati in base alla gravità della malattia cutanea e non in base alla presenza di malattia sistemica. Questa segregazione è stata guidata da regioni spaziali arricchite di *macrofagi, fibroblasti e linfatici* con firme geniche associate a disfunzione metabolica.

Complessivamente questi risultati suggeriscono che le forme lievi e gravi di **PsO** hanno caratteristiche molecolari distinte e che la **PsO** grave può alterare profondamente la composizione cellulare e metabolica dei siti cutanei distali non interessati.

Inoltre, lo studio fornisce una risorsa preziosa per la comunità di ricerca per studiare l'organizzazione genica spaziale della pelle umana sana e infiammata. Questi risultati suggeriscono che le forme lievi e gravi di **PsO** hanno caratteristiche molecolari distinte e che la **PsO** grave può alterare profondamente la composizione cellulare e metabolica dei siti cutanei distali non interessati.

Consigli

Per inquadrare gli aspetti clinici della trascrittomiche spaziale consiglio di vedere il su You Tube il video



Inspiring Female Scientist: Immunologist Shruti Naik

[A proposito della Trascrittomiche Spaziale](#)

La trascrittomiche spaziale è un metodo per assegnare i tipi di cellule (identificati dalle letture dell'mRNA) alle loro posizioni nelle sezioni istologiche. Questo metodo può essere utilizzato anche per determinare la localizzazione subcellulare delle molecole di mRNA. Il termine è una variazione di Spatial Genomics , descritta per la prima volta da Doyle, et al., nel 2000 e poi ampliata da Ståhl et al. in una tecnica sviluppata nel 2016, che da allora ha subito una serie di miglioramenti e modifiche.

Il metodo Ståhl implica il posizionamento di singoli campioni di tessuto sugli array di primer di trascrizione inversa codificati spazialmente in grado di catturare l'mRNA con le code di oligo(dT). Oltre alla coda oligo(dT) e al codice a barre spaziale, che indica la posizione x e y sul vetrino disposto, la sonda contiene un sito di clivaggio, una maniglia di amplificazione e sequenziamento e un identificatore molecolare univoco . Comunemente, i campioni istologici vengono tagliati utilizzando il criotomo , quindi fissati, colorati e inseriti nei microarray. Successivamente, subisce la permeabilizzazione enzimatica, in modo che le molecole possano diffondersi fino al vetrino, con ulteriore rilascio di mRNA e legame alle sonde. La trascrizione inversa viene quindi eseguita in situ . Di conseguenza, viene sintetizzato DNA complementare marcato spazialmente, che fornisce informazioni sull'espressione genica nella posizione esatta del campione.

Pertanto, il protocollo descritto combina il sequenziamento in parallelo e la colorazione dello stesso campione. È importante ricordare che la prima generazione di vetrini disposti in serie comprendeva circa 1.000 punti del diametro di 100 μm , limitando la risoluzione a $\sim 10\text{-}40$ celle per punto.

Nel significato più ampio di questo termine, la trascrittomiche spaziale include metodi che possono essere suddivisi in cinque approcci principali per risolvere la distribuzione spaziale delle trascrizioni. Sono tecniche di microdissezione, metodi di ibridazione in situ fluorescente, sequenziamento in situ, protocolli di cattura in situ e approcci in silico.

Guido Sacerdoti nel ricordo di Guglielmo Scala



Inizierò leggendo, poi vi spiego perché.

Carlo mi ha chiamato un giorno per dirmi di questa sua iniziativa ai 10 anni dalla scomparsa del padre. Credevo fosse un invito a esserci, a essere presente, il che già sarebbe stato un onore ma no, lui voleva proprio che io intervenissi, che portassi un mio ricordo. La cosa mi ha fatto piacere ma al tempo stesso mi ha preoccupato. Il fatto è che io ho un problema, con Guido. Non riesco a parlarne senza commuovermi. Perché? Non lo so. O forse lo so. Nei miei quasi 70 anni, come a tutti noi, mi è purtroppo capitato tante volte di veder mancare persone care, a volte sono stati eventi giustificati dall'anagrafe, tante altre volte invece no. E mi capita di parlar di loro, e ricordare le avventure, i momenti belli, quelli meno, insomma il carico di esperienze condivise, e sono triste, sì, ma senza che questo faccia di me un salice piangente. Ora, invece, se in una conversazione qualsiasi, al lavoro, negli incontri con i colleghi o ovunque sia, si nomina Guido, ecco che mi si inumidiscono gli occhi, mi si spezza la voce, insomma devo chiudere! Un disastro.

Per questo motivo, non sentendomi sicuro di me, ho messo nero su bianco alcune riflessioni, fidando di riuscire a fare, leggendo, ciò che, parlando a braccio, tante volte già mi ha visto fallire miseramente. Perciò leggo.

Qui, oggi, ci sono molti di voi che l'hanno conosciuto assai meglio di me, persone che, a differenza di me, possono dire di aver condiviso con Guido e Marcella percorsi lunghi, amiche e amici veri. Io no, in effetti il nostro rapporto è stato breve. Potrei, sì, parlare di quando correavamo insieme e passava sotto casa mia a via Manzoni verso il parco Virgiliano e di come mi ha letteralmente trascinato a migliorarmi fino al punto poter fare anch'io una (mezza) maratona. Di quando mi ha portato a vedere le sue pitture murali in quella discoteca a Torre Cervati, il B.Out. Si era portato le chiavi apposta, quella mattina. Si divertiva come un matto.

Ma non è di questo che voglio parlare.

Vorrei solo provare a dire, in poche parole, cosa abbia significato per me, un po' più giovane come età ma molto più giovane come esperienza professionale in allergologia, la figura di Guido Sacerdoti come medico. Per me Guido è stato ed ancora è un modello di sintesi tra quella che chiamiamo medicina narrativa e medicina basata sulle evidenze (EBM). Nei prossimi minuti cercherò di spiegarmi meglio. Pensando a questo intervento mi è tornato alla mente il concetto di Nonluogo, creato dal filosofo francese Marc Augé. In un suo libro del '92 Augé definisce il concetto di nonluogo come di quello spazio in cui si è persa la dimensione del rapporto umano reale. Sono spazi in cui accadono cose non appartenenti ad alcuno in maniera specifica. Sono nonluoghi gli aeroporti, le autostrade e i loro svincoli, i centri commerciali. Ma anche gli ascensori o i campi profughi e gli esempi potrebbero continuare. Le persone transitano nei nonluoghi ma nessuno vi abita. I nonluoghi si contrappongono ai "luoghi antropologici", che si caratterizzano invece per la specificità e profondità del rapporto tra esseri umani.

Nel nonluogo si seguono indicazioni collettive, che valgono per ciascuno indipendentemente da chi sia. Vietato fumare, Tenere la destra, Non oltrepassare la linea gialla. Il concetto di nonluogo è strettamente connesso a quello di Surmodernità, in cui la società si struttura intorno a degli eccessi. Eccesso di tempo ed eccesso di spazio in cui il vertiginoso aumento della quantità e densità di informazioni che ci investono e la possibilità di spostamenti sempre più veloci in un pianeta sempre più piccolo non fa altro che accrescere esponenzialmente il nonluogo rispetto al luogo antropologico. Intendiamoci: nonluogo non è una brutta parola né una brutta cosa. E' una necessità ineludibile della nostra vita sociale e anzi nel nonluogo troviamo risposte sempre più precise, puntuali, verificabili alle nostre incertezze. Dobbiamo frequentarlo. Nel nonluogo perdiamo qualcosa ma prendiamo qualcos'altro.

Bene. La medicina è uno specchio fedele della società. Ecco perché ve ne parlo. Proprio in questa occasione. La Surmodernità ha stravolto l'apprendimento e l'aggiornamento scientifico. Un tempo la guida alla buona pratica medica la si cercava in pochi libri di testo, sempre gli stessi, che venivano aggiornati e ristampati ogni 3 – 4 anni. Chi non se lo poteva permettere veniva a fotocopiarli interi capitoli. Tutti studiavamo così. Oggi l'accesso alle sconfinite banche dati che raccolgono tutte le pubblicazioni scientifiche, come PubMed, ha segnato la scomparsa di quel mondo e ha segnato l'ascesa di quella che è chiamata Medicina Basata sulle Evidenze, l'EBM. Nessuno compra più le ultime edizioni del Middleton's Textbook of Allergy and Clinical Immunology mentre tutti siamo abbonati a PubMed.

E' stato questo un vantaggio, decenni dopo? In estrema sintesi, sì, certo. La possibilità di critica, il pluralismo delle idee, il non affidarsi ciecamente e supinamente alle opinioni di un esperto, che per quanto autorevole poteva comunque tendere a privilegiare le proprie convinzioni, è un modo efficace per sfrondare il campo da tutta una serie di affermazioni caotiche non suffragate da un percorso scientifico adeguato. Dal "far west scientifico" si è approdati ad una medicina condivisa.

Bene, benissimo. A questo proposito vi racconto una cosa. Circa venti anni fa, all'esordio di questa rivoluzione tecnologica, non era poi tanto facile scaricare un articolo scientifico. Ogni singolo articolo di appena 3 – 4 pagine era venduto online al prezzo di diverse decine di dollari. Molti tra noi trovavano questo profondamente ingiusto. Con Guido abbiamo parlato varie volte di questo argomento. Era ingiusto davvero. Quei lavori, quegli studi, noi in un certo senso li avevamo già pagati o attraverso le tasse nel caso di studi finanziati dallo stato o attraverso il prezzo del farmaco, nel caso di finanziamenti industriali. E ora volevano farceli ripagare. Nell'indice di tutte le riviste accanto ad ogni titolo, ad ogni articolo c'era il simbolo di un maledetto lucchettino chiuso.

Pagare per leggere! Alcuni smanettoni amici miei mi spiegarono come “bucare” i siti delle maggiori case editrici e scaricare abusivamente gli articoli. Passai paro paro l’informazione a Guido. Come raccontare la sua felicità quando gli spiegai tutto. Quando finalmente ci riuscì non gli sembrava vero. Quando gli si aprì la prima volta la pagina della rivista con l’indice degli articoli e tutti i lucchettini chiusi erano diventati dei lucchettini aperti mi telefonò entusiasta. Una Pasqua. Furonomesi assai divertenti. Dicevamo come la Surmodernità applicata alla letteratura scientifica abbia determinato l’avvento

della Medicina Basata sulle Evidenze (EBM). L’EBM, a sua volta, ha partorito le Linee Guida, recinto sempre più stretto in cui il medico è tenuto ad agire. E tuttavia, rincesce ammetterlo, restano tante zone d’ombra. Le riviste sono troppe, migliaia e migliaia di articoli sono pubblicati ogni giorno e non per tutti la revisione critica riesce ad essere efficace. Le evidenze sono la sintesi di studi talora in contraddizione tra loro, quando non addirittura conflittuali. I conflitti di interesse sono lì, clamorosi, sotto gli occhi di tutti.

L’EBM è una gran cosa, ma non esente da critiche.

Tornando ai concetti di nonluogo/luogo antropologico in campo medico, mi arrischio ad affermare che il Middleton’s Textbook of Allergology and Clinical Immunology era (ed ancora è per chi lo frequenta) un “luogo”. La presenza nella propria biblioteca del Middleton caratterizzava gli allergologi, così come quella del Nelson caratterizzava i pediatri e così via. La Surmodernità si è invece tradotta in PubMed, un tipico “nonluogo” in cui si riversano ogni anno milioni di articoli destinati a milioni di utenti, disciplinati, anonimi. PubMed ci rende trasparenti.

Veniamo a noi, e a Guido. Perché vi racconto tutto ciò che ai non medici può sembrare tedioso. Perché quanto più le Linee Guida hanno determinato il nostro comportamento tanto più quest’ultimo si è spersonalizzato e deresponsabilizzato. Anche la medicina legale ha indirizzato in questa direzione. In caso di contestazioni, se ti sei attenuto alle Linee Guida sei nel giusto. Se no, no. Il rischio, reale, realissimo, è che ciascuno di noi dia sempre meno peso alle proprie esperienze professionali personali. Che il proprio sentire venga sacrificato sull’altare delle Evidenze, impersonali e infallibili. Il solo termine “esperienza personale” è blasfemo in un contesto rigorosamente EBM. Questo non va bene. Secondo me non è la cosa giusta. Per quanto la scienza provi a darci delle certezze ogni atto medico è sempre il frutto di una magica e misteriosa alchimia tra medico e paziente. Ogni rapporto è una storia a sé. Ogni persona che vediamo ha le sue unicità e noi stessi ci poniamo in maniera diversa di volta in volta quando interagiamo con persone diverse.

La base della medicina narrativa.

Di cosa ci sarebbe bisogno, allora? Ecco, il mio parere è che la migliore approssimazione possibile ad una irraggiungibile perfezione la si può trovare nella sintesi tra l’obbedienza scrupolosa alle Linee Guida e il rispetto dei propri convincimenti, frutto, a loro volta di una esperienza sempre crescente nel tempo, maturata sul campo.

Il medico deve studiare, deve conoscere la letteratura, deve seguire l’evoluzione del pensiero scientifico, deve ovviamente conoscere a fondo le Linee Guida inerenti alla sua specialità ma guai ad abbandonare la fiducia in sé, a trascurare gli insegnamenti dei propri maestri.

Insomma, non è facile.

Guido Sacerdoti è stato, a mia conoscenza, il più alto rappresentante di questa sintesi.

Al rigore metodologico, alla profonda preparazione scientifica, a cui lui ha peraltro collaborato con tanta produzione originale, Guido, in ogni sua ricetta, ha sempre aggiunto parte di sé. Ogni ricetta di Guido parla del paziente ammalato e bisognoso ma al tempo stesso parla molto anche del suo dottore. Molti ambienti medici sono oggi dei nonluogo. Posso dire che ovunque Guido abbia

lavorato, nel suo reparto all'Università, come nel suo studio a via Cimarosa, è sempre riuscito a creare intorno a sé, un "luogo".

Guido è stato un luminoso e carissimo esempio di quanto la medicina sia Arte, oltre che Scienza.

Io non so se posso fregiarmi del titolo di suo Amico. Quello che so è che io l'ho eletto (a sua insaputa e non sono certo di quanto sarebbe d'accordo – ma spero di sì) a "faro" nella conduzione della mia professione e del mio modo di fare il medico. Della mia via alla medicina. Ogni volta che mi sono trovato a parlare a un congresso con Guido in aula, ogni volta, alla fine, durante gli ineludibili applausi di cortesia, incontravo il suo sguardo e cercavo il suo sorriso di approvazione. Alla fine era l'unico di cui mi importasse davvero.

Ecco, alla fine forse lo so perché mi è ancora e sempre difficile, dieci anni dopo, parlare di Guido senza un coinvolgimento emotivo. La ragione forse è questa. Perché, a differenza di molti, Guido per me è ancora lì, il mio dialogo con lui non si è interrotto, partecipa alla mia giornata, interviene nelle mie scelte. Quello che mi commuove non è la sua assenza, è la sua presenza.

Eccomi dunque a ricordare e celebrare Guido Sacerdoti che c'è stato e ancora c'è. Un esempio della scienza applicata ai rapporti umani. Una rara e preziosa sintesi tra "luogo" e "nonluogo", tra EBM e medicina narrativa.

Grazie a te, Guido, grazie a Carlo, grazie a tutti voi.