

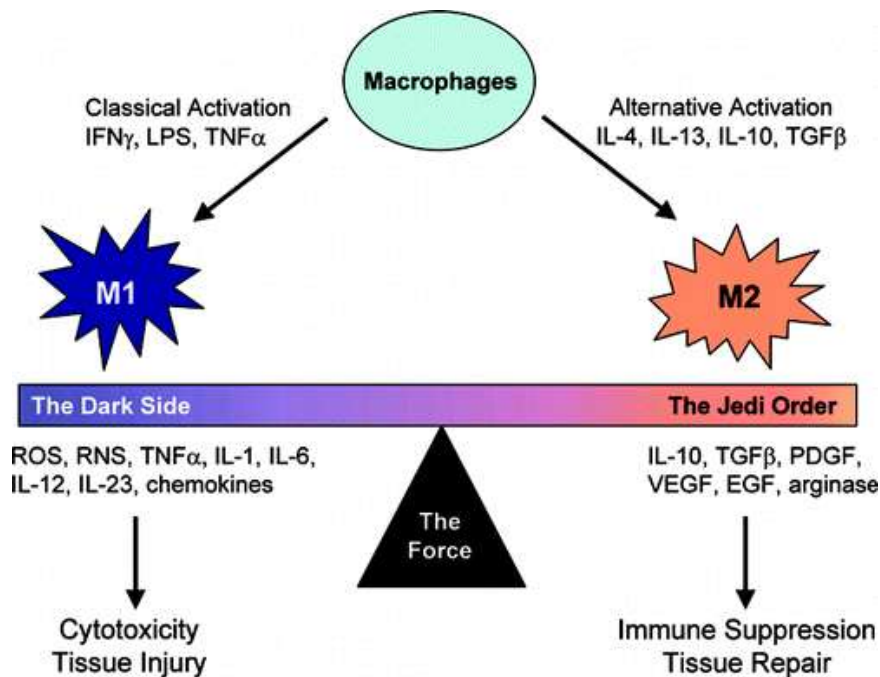
10. Luglio

## La trascrittoma unicellulare e spaziale identifica una popolazione di macrofagi associata alla fibrosi del muscolo scheletrico

La pratica mette cervello nei muscoli.  
(Sam Snead)

I **macrofagi** hanno un ruolo centrale nell'immunità innata e contribuiscono all'omeostasi dei tessuti regolando la riparazione dei tessuti e il rimodellamento della matrice extracellulare (ECM). Le loro diverse funzioni all'interno del tessuto sono accompagnate da un alto grado di eterogeneità molecolare, che riflette l'adattabilità microambientale.

I **macrofagi del muscolo scheletrico** comprendono popolazioni residenti e derivate da monociti, quest'ultime si infiltrano in seguito a lesioni o malattie muscolari. Il **paradigma dei macrofagi M1 e M2** è stato utilizzato per descrivere l'eterogeneità funzionale dei macrofagi del muscolo scheletrico.

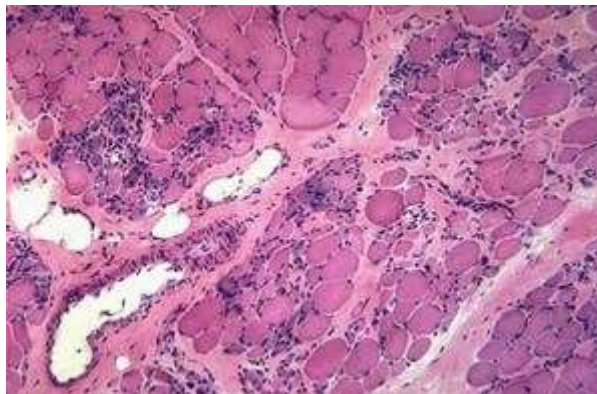
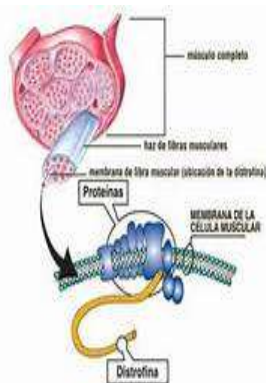


*Koenig M et al. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. Cell. 1987 Jul 31;50(3):509-17.*

Nel **trauma muscolare acuto**, i **macrofagi M1 proinfiammatori** si infiltrano inizialmente nel muscolo danneggiato per fagocitare i detriti cellulari e attivare le cellule staminali muscolari. La successiva transizione ai **macrofagi M2** nella fase rigenerativa promuove la differenziazione delle **cellule staminali muscolari** e la risoluzione dell'infiammazione.

*Mann CJ et al. Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. Skelet Muscle. 2011 May 4;1(1):21. doi: 10.1186/2044-5040-1-21. PMID: 21798099; PMCID: PMC3156644.*

Macrofagi simili a **M1** e **M2** sono stati descritti nella **distrofia muscolare di Duchenne (DMD)**. Tuttavia, prove crescenti indicano che la regolazione e il ruolo funzionale dei macrofagi sono più complessi nel contesto delle malattie degenerative muscolari croniche come la **DMD**.



Sebbene i *macrofagi* siano essenziali per la riparazione muscolare dopo un trauma acuto, la loro disregolazione promuove la patogenesi della DMD, una forma letale di distrofia muscolare causata da mutazioni nel gene **DMD**.

**Koenig M et al. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. Cell. 1987 Jul 31;50(3):509-17**

La transizione dai macrofagi **M1** a **M2** osservata nella lesione acuta è interrotta nel modello murino di distrofia muscolare legata all'X (mdx) di DMD da attacchi asincroni di lesione muscolare e rigenerazione.

Di conseguenza, i **macrofagi M1** sono cronicamente attivati e promuovono il danno muscolare in modo inducibile ossido nitrico sintasi-dipendente e la funzione riparativa dei **macrofagi M2** è riproposta patologicamente per promuovere la fibrosi. Si prevede che questa compromissione induca programmi trascrizionali dei macrofagi distinti da quelli indotti nella lesione acuta e contribuisca alla patologia muscolare.

**Villalta SA et al. Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. Hum Mol Genet. 2009 Feb 1;18(3):482-96.**

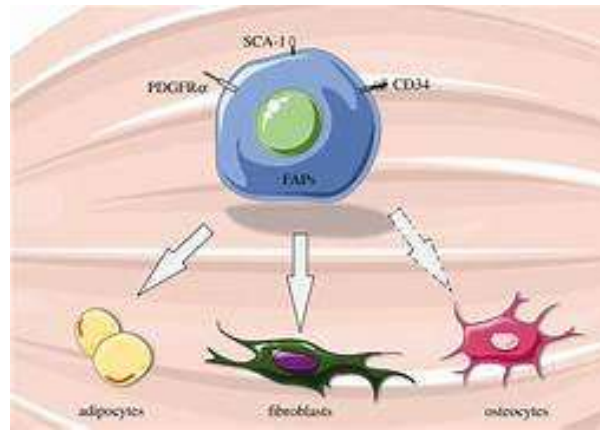
A sostegno di ciò, diversi studi hanno riportato che la perturbazione della funzione e/o dell'attivazione dei macrofagi alterava la rigenerazione e promuoveva la **fibrosi nella distrofia muscolare** nella **malattia di Pompe** e nella **disferlinopatia**.

**Vidal B et al Fibrinogen drives dystrophic muscle fibrosis via a TGFbeta/alternative macrophage activation pathway. Genes Dev. 2008 Jul 1;22(13):1747-52.**

**Schaaf GJ et al . Lack of robust satellite cell activation and muscle regeneration during the progression of Pompe disease. Acta Neuropathol Commun. 2015 Oct 28;3:65.**

**Baek JH et al. Dysferlinopathy Promotes an Intramuscle Expansion of Macrophages with a Cyto-Destructive Phenotype. Am J Pathol. 2017 Jun;187(6):1245-1257.**

**La fibrosi** è l'accumulo aberrante di collagene e altre proteine della MEC nei tessuti cronicamente infiammati, che porta all'insufficienza d'organo e alla morte. **I progenitori fibro/adipogenici (FAP)** sono cellule stromali che danno origine a fibroblasti e adipociti e regolano la riparazione muscolare e la fibrosi. Dopo una lesione acuta, le FAP si espandono e contribuiscono alla riparazione muscolare facilitando la miogenesi e la formazione della matrice extracellulare.

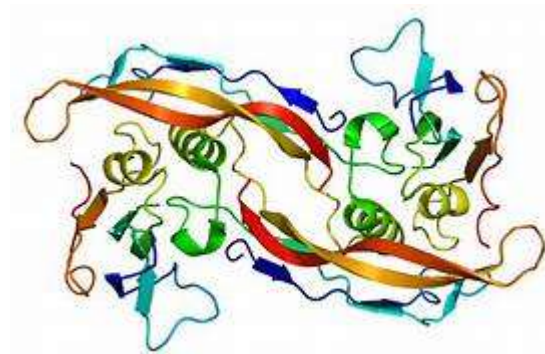


Joe AW et al. *Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis*. *Nat Cell Biol.* 2010 Feb;12(2):153-63.

La fibrosi è mitigata dall'infiltrazione di macrofagi che eliminano le FAP attraverso l'apoptosi mediata dal fattore di **necrosi tumorale-α**



Al contrario, il fattore di ***crescita trasformante-β (TGF-β)***,

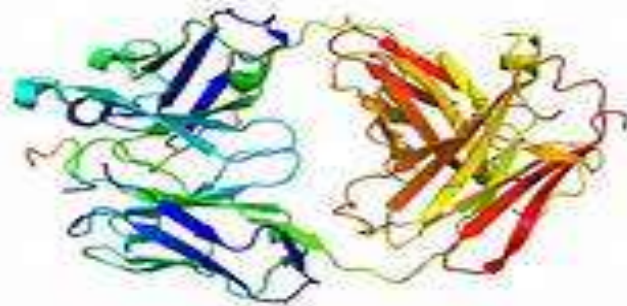


che è altamente sovraregolato nel muscolo distrofico, inibisce l'apoptosi FAP e guida la loro differenziazione in miofibroblasti produttori di matrice. In questo contesto, la persistenza delle FAP

e la loro differenziazione distorta verso i fibroblasti contribuisce allo sviluppo della fibrosi muscolare. Inaspettatamente, l'inibizione del TGF- $\beta$  non ripristina completamente la clearance della FAP indicando che ci sono fattori aggiuntivi che promuovono la differenziazione e/o la sopravvivenza della FAP.

*Lemos DR et al. Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting TNF-mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors. Nat Med. 2015 Jul;21(7):786-94.*

**L'osteopontina ( Spp1 )** è un potenziale candidato



perché è altamente espressa dai macrofagi elevata nei muscoli distrofici nei pazienti con DMD e promuove la fibrosi nella distrofia muscolare

Tuttavia, il repertorio di fattori profibrotici, tra cui *Spp1*, espresso dai macrofagi muscolari distrofici e dai loro bersagli cellulari non è stato completamente definito.

*Capote J et al. Osteopontin ablation ameliorates muscular dystrophy by shifting macrophages to a pro-regenerative phenotype. J Cell Biol. 2016 Apr 25;213(2):275-88.*

Un team di oltre 30 ricercatori esperti in macrofagi coordinati da **Gerald Coulis** del *Department of Physiology and Biophysics, University of California Irvine*, nel **preprint**

#### **Single-cell and spatial transcriptomics identify a macrophage population associated with skeletal muscle fibrosis**

Ha utilizzato un approccio imparziale di sequenziamento **dell'RNA a singola cellula (scRNAseq)** per definire i profili **trascrizionali dei macrofagi dal muscolo normale e distrofico.**

**Lo** scRNAseq ha identificato diverse popolazioni di macrofagi con trascrittomi non precedentemente associati alla distrofia muscolare.

In particolare si sono concentrati su tre popolazioni che corrispondevano a macrofagi residenti, macrofagi derivati da monociti (MDM) e una popolazione caratterizzata da un'elevata espressione di fattori profibrotici, **Lgals3 [galectin-3 (gal-3)]** e **Spp1**

Data l'induzione selettiva di **Lgals3** e **Spp1** nei macrofagi muscolari distrofici, ipotizziamo che questo profilo trascrizionale definisca un macrofago fibrogenico che promuove la fibrosi durante la distrofia muscolare.

La diversità dei macrofagi è regolata dall'integrazione di segnali intrinseci ai tessuti con segnali infiammatori per indurre programmi trascrizionali unici. La *trascrittomica a cellula singola* ha contribuito a scoprire un grado senza precedenti di eterogeneità dei macrofagi attribuito all'integrazione di questi segnali complessi in diversi organi, tra cui il cuore, il cervello e il tessuto adiposo

Recentemente, studi trascrittomici comparativi a cellula singola di macrofagi residenti nei tessuti isolati da siti anatomici distinti, incluso il muscolo scheletrico, hanno dimostrato che i macrofagi muscolari esprimono un trascrittoma diverso da quello dei macrofagi polmonari e peritoneali

L'analisi trascrittomica dei macrofagi muscolari isolati dal muscolo gravemente danneggiato ha anche dimostrato che i macrofagi acquisiscono programmi trascrizionali distinti adatti a promuovere la rigenerazione muscolare. Tuttavia, la diversità dei macrofagi muscolari e il modo in cui la loro funzione e gli stati trascrizionali sono influenzati dalla malattia muscolare in un contesto immunocompetente non sono stati definiti.

*Varga T ert al Macrophage PPAR $\gamma$ , a Lipid Activated Transcription Factor Controls the Growth Factor GDF3 and Skeletal Muscle Regeneration. Immunity. 2016 Nov 15;45(5):1038-1051.*

Sono stati identificati sei cluster, ma inaspettatamente nessuno corrispondeva alle definizioni tradizionali di macrofagi **M1** o **M2**.

Piuttosto, la firma macrofagica predominante nel muscolo distrofico era caratterizzata da un'elevata espressione di fattori fibrotici, **galectina-3 (gal-3)** e **osteopontina ( Spp1 )**.

La trascrittomica spaziale, le inferenze computazionali della comunicazione intercellulare e le analisi in vitro hanno indicato che Spp1 derivato dai macrofagi regola la differenziazione dei progenitori stromali.

I **macrofagi Gal-3 +** sono stati attivati cronicamente nel muscolo distrofico e i test di trasferimento adottivo hanno mostrato che il **fenotipo gal-3 +** era il programma molecolare dominante indotto all'interno dell'ambiente distrofico.

Anche i **macrofagi Gal-3 +** erano elevati in più miopatie umane.

Questi risultati aumentano la nostra comprensione dei macrofagi nella distrofia muscolare definendo i loro programmi trascrizionali e rivelano che **Spp1 è un importante regolatore delle interazioni tra macrofagi e progenitori stromali**.

### **Conclusioni e riflessioni**

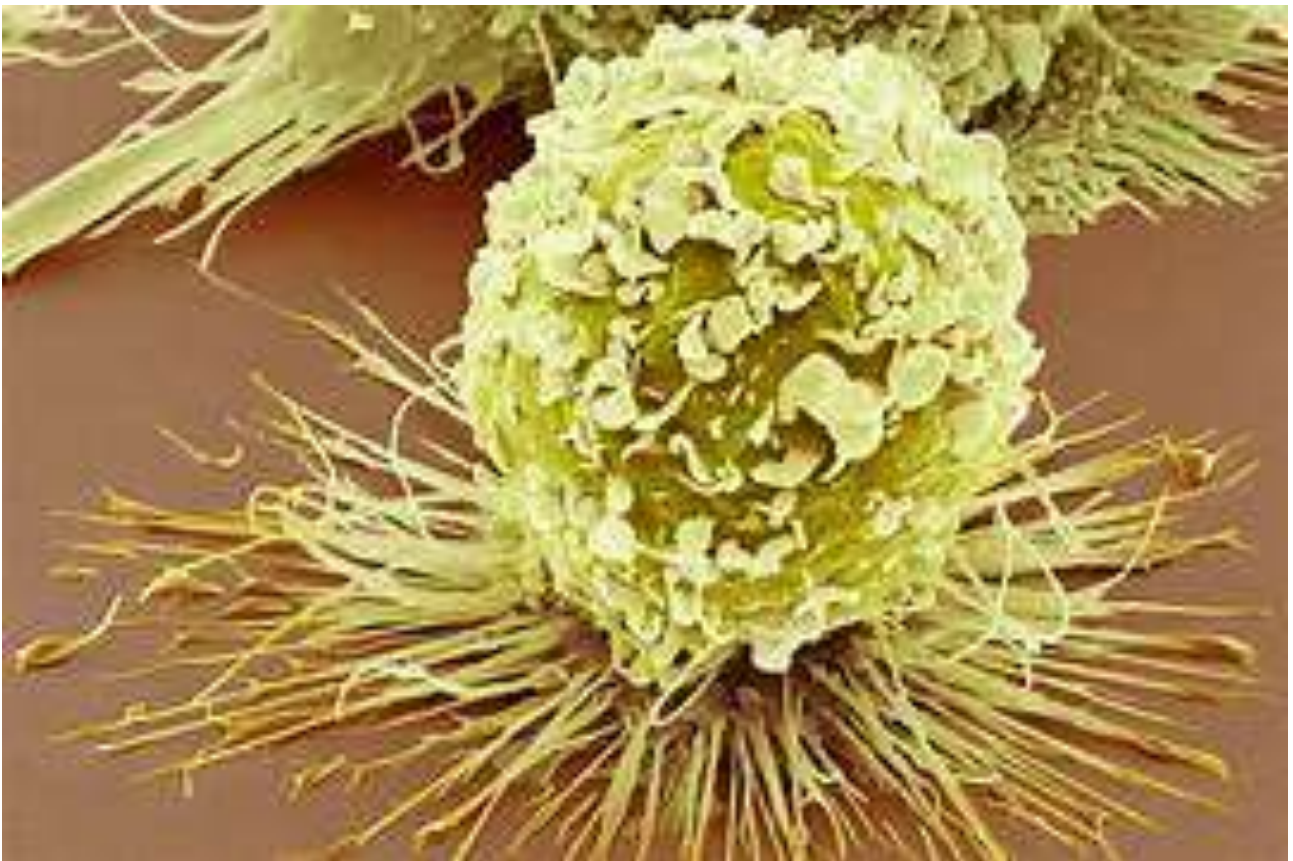
Collettivamente, questo studio ha identificato diversi sottoinsiemi di macrofagi muscolari con funzioni distinte e profili trascrizionali. La firma **gal-3 + Spp1 +** rifletteva lo stato trascrizionale predominante di un macrofago muscolare distrofico. La colocalizzazione di **gal-3 + macrofagi** con progenitori stromali e l'osservazione che **Spp1** media la comunicazione tra questi tipi di cellule in vitro, rafforza l'importanza di un asse fibrogenico macrofago-FAP nel promuovere la patogenesi della malattia muscolare. Il significato traslazionale di questa interazione è evidenziato dall'osservazione che esiste un asse fibrogenico simile nell'uomo, poiché i **macrofagi gal-3 +** erano elevati in diverse malattie muscolari umane. Inoltre, **gal-3 +i macrofagi** sono stati identificati in tre diversi modelli di malattia muscolare cronica e lesione muscolare acuta, suggerendo che un

meccanismo canonico associato al danno muscolare innesca la differenziazione nello stato gal-3 + Un probabile candidato è la fagocitosi dei detriti delle cellule muscolari, che è stato documentato come un contributo chiave all'attivazione dei macrofagi

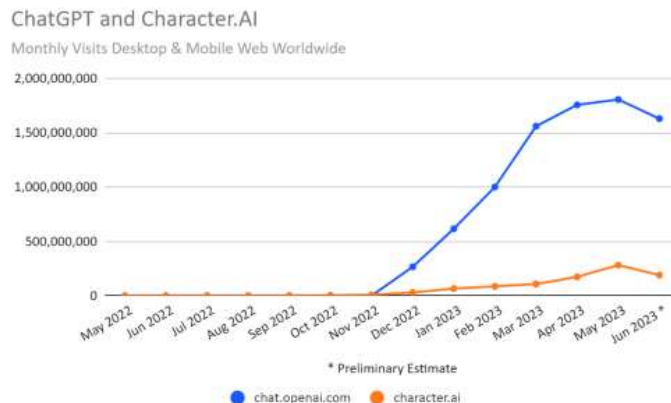
Tuttavia, questo rappresenta solo uno dei tanti circuiti fibrogenici macrofago-FAP che sono stati precedentemente documentati nel muscolo

*Lemos DR et al. Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting TNF-mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors. Nat Med. 2015 Jul;21(7):786-94.*

Gli approcci meccanicistici che si basano sulla genetica del topo per studiare le interazioni tra macrofagi e progenitori stromali faranno avanzare la nostra comprensione di come questo asse promuova la fibrosi muscolare durante la distrofia muscolare. In sintesi, definendo l'eterogeneità trascrizionale dei macrofagi muscolari, questo studio ha fatto progredire la comprensione dell'attivazione e della funzione dei macrofagi durante l'omeostasi muscolare e la malattia degenerativa. Gli stati trascrizionali definiti aprono la strada allo sviluppo di approcci terapeutici innovativi per inibire la fibrosi muscolare immuno-mediata.



## ChatGPT diminuisce di circa il 10% il traffico man mano che la novità svanisce Il traffico mondiale è diminuito del 9,7% e i visitatori unici sono diminuiti del 5,7% a giugno



ChatGPT non sembra più destinato a crescere fino a diventare il sito Web più trafficato al mondo . In altre parole, Google non corre il rischio di essere eclissato dal sito dimostrativo della tecnologia OpenAI che si è trasformato in un fenomeno culturale.

Già dal mese scorso la crescita vertiginosa del traffico di ChatGPT stava iniziando a stabilizzarsi , ma questo è il primo mese in cui è effettivamente diminuita.

Quando OpenAI ha rilasciato ChatGPT al pubblico nel novembre 2022, il traffico verso il sito ha iniziato una ripida salita. Otto mesi dopo, l'interesse sta calando? Secondo *Similarweb*, una società di ricerche di mercato, i visitatori desktop e mobili in tutto il mondo sono diminuiti del 9,7% da maggio a giugno. Negli Stati Uniti, il calo su base mensile è stato del 10,3%.

ChatGPT non sembra più destinato a crescere fino a diventare il sito Web più trafficato al mondo.

La versione gratuita di ChatGPT, accessibile tramite il sito, è solo una parte del business di OpenAI

La popolarità di ChatGPT ha un costo elevato per l'azienda, poiché l'esecuzione dello strumento richiede un'elevata potenza di calcolo: la società di ricerca sui semiconduttori *Semianalysis* stima che l'esecuzione di ChatGPT costi a OpenAI circa **\$ 700.000 al giorno**.

Ma OpenAI guadagna entrate fornendo l'accesso API alle aziende che desiderano utilizzare la tecnologia per i propri scopi e vendendo abbonamenti da \$ 20 al mese a ChatGPT , che è più veloce della versione gratuita dello strumento.

ChatGPT ha preso d'assalto Internet con la sua capacità di generare testo, codice e arte senza la necessità di un essere umano. L'uso del robot AI ha suscitato emozioni che vanno dall'eccitazione all'angoscia esistenziale. Anche con il calo del traffico, il sito del bot rimane ancora popolare: attualmente è il ventesimo sito più visitato al mondo e riceve ancora più traffico di Reddit o siti come Bing.com, che utilizza anche l'IA generativa.

I visitatori unici in tutto il mondo del sito Web di ChatGPT sono diminuiti del 5,7%. Anche il tempo trascorso dai visitatori sul sito Web è diminuito dell'8,5%.

È discutibile se la direzione di OpenAI abbia il cuore spezzato per il calo del traffico. Lanciato inizialmente come demo tecnologica, il sito Web ChatGPT funge principalmente da leader di perdita generando lead di Tuttavia, il calo di interesse non solo per ChatGPT, ma anche per uno dei suoi principali concorrenti, è un segno che la novità è svanita per la chat AI. I chatbot dovranno dimostrare il loro valore, piuttosto che darlo per scontato, d'ora in poi.



Una maggiore stabilità della troposferica inferiore e un aumento dell'umidità relativa hanno notevolmente aumentato a frequenza dei giorni di bassa visibilità nell'India settentrionale negli ultimi quattro decenni.