



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**



**DIPARTIMENTO
DI INGEGNERIA
DELL'INFORMAZIONE**

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**ORGANOIDI: IL PASSATO, IL PRESENTE E LE PROSPETTIVE
FUTURE DEI MINI ORGANI NELLA RICERCA BIOMEDICA**

Relatore: Prof. Gianfranco Santovito

Laureando: Mattia Pellizzer

ANNO ACCADEMICO 2022 – 2023

Data di laurea 13/03/2023

Indice

ABSTRACT	5
INTRODUZIONE	8
CAPITOLO 1. LE COLTURE CELLULARI	9
1.1 STORIA E SVILUPPO	9
1.2 I MODELLI 2D	11
1.2.1 <i>Le principali applicazioni</i>	12
1.3 I MODELLI 3D	13
1.3.1 <i>Matrice extracellulare (ECM)</i>	14
1.4 LE PRINCIPALI APPLICAZIONI	15
1.4.1 <i>Drug discovery</i>	15
1.4.2 <i>Organ-on-chip</i>	16
CAPITOLO 2. GLI ORGANOIDI	17
2.1 STORIA E SVILUPPO	17
2.2 CELLULE STAMINALI	18
2.2.1 <i>Le cellule staminali embrionali pluripotenti (ESC)</i>	19
2.2.2 <i>Le cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC)</i>	19
2.2.3 <i>Le cellule staminali adulte specifiche per organo multipotente (ASC)</i>	20
2.3 I METODI PER OTTENERE GLI ORGANOIDI	21
2.3.1 <i>Auto-assemblaggio</i>	21
2.3.2 <i>Auto-patterning</i>	21
2.3.3 <i>Auto-morfogenesi</i>	22
2.3.4 <i>Terreni di coltura</i>	22
2.3.5 <i>Matrice extracellulare (ECM)</i>	22
2.4 TIPOLOGIE DI ORGANOIDI OTTENUTI DA IPSC	23
2.4.1 <i>Gli organoidi derivati dall'endoderma</i>	24
2.4.2 <i>Gli organoidi derivati dal mesoderma</i>	25
2.4.3 <i>Gli organoidi derivati dall'ectoderma</i>	26
2.5 TIPOLOGIE DI ORGANOIDI DERIVATI DA ASC	26
2.5.1 <i>L'organoide del pancreas</i>	27

2.5.2	<i>L'organoide delle Tube di Falloppio</i>	27
2.5.3	<i>L'organoide delle ghiandole mammarie</i>	28
2.6	LE PRINCIPALI APPLICAZIONI DEGLI ORGANOIDI	28
2.6.1	<i>Modellazione di malattie</i>	29
2.6.2	<i>Biobankig e medicina di precisione</i>	29
2.6.3	<i>Medicina rigenerativa</i>	30
 CAPITOLO 3. GLI ORGANOIDI GASTROINTESTINALE E		
CEREBRALE		30
3.1	L'ORGANOIDE GASTROINTESTINALE	30
3.1.1	<i>Organoide gastrointestinale da ASC</i>	31
3.1.2	<i>Matrice extracellulare e terreno di coltura</i>	31
3.1.3	<i>Organoide gastrointestinale da iPSC</i>	32
3.1.4	<i>Metodo liquido-aria</i>	32
3.2	MODELLIZZAZIONE DEL CANCRO AL COLON	33
3.2.1	<i>Organoidi gastrointestinali e la chemioterapia</i>	34
3.3	L'ORGANOIDE CEREBRALE	34
3.3.1	<i>I metodi non guidati</i>	35
3.3.2	<i>I metodi guidati</i>	36
3.3.3	<i>I metodi per fusione</i>	37
3.3.4	<i>Alzheimer e organoidi cerebrali</i>	38
 CAPITOLO 4. PROSPETTIVE FUTURE E CONCLUSIONI		39
 BIBLIOGRAFIA		41

Abstract

Le colture cellulari fin dal loro primo impiego nel 1951 rappresentano uno degli ambiti più studiati nel mondo della ricerca biomedica in quanto direttamente impiegate nei modelli in vitro che, utilizzati in studi biochimici, microbiologici e farmacologici, permettono di ottenere dei risultati molto affidabili da affiancare a quelli condotti direttamente sugli animali (modelli *ex vivo*). Il loro largo impiego, dovuto ad una elevata disponibilità di tipi di cellule, terreni di coltura e fattori di crescita, in aggiunta ad una spiccata semplicità nel replicare gli esperimenti, ha permesso un rapido affinamento delle tecniche di impiego di tali modelli e il progressivo passaggio dall'utilizzo di un monostrato cellulare (*cell monolayer*) ad un ben più complesso modello 3D. Con l'avvento degli scaffold 3D la ricerca biomedica inizia ad orientarsi verso delle strutture più sofisticate che prevedono l'utilizzo di hydrogel, sintetici e naturali, con lo scopo di replicare i segnali biochimici e meccanici della matrice extracellulare nativa. È proprio da questo momento che si sviluppano i primi organoidi. Per ottenere degli organoidi sono necessarie alcune cellule staminali, una matrice contenente delle proteine e un particolare terreno di coltura.

Le cellule staminali possono essere ottenute da organismi adulti oppure da embrioni con delle tecniche diverse che verranno descritte. Tali cellule sono contenute nella matrice nella quale sono presenti numerose proteine fondamentali che facilitano e stimolano la formazione di strutture tridimensionali. Il terreno di coltura, infine, presenta dei fattori di crescita, caratteristici per ogni tipo di organoide, che mantengono le cellule in vita e ne stimolano la moltiplicazione. Una volta analizzati gli impieghi, i vantaggi e gli svantaggi dell'utilizzo di tali strutture 3D, verranno trattati dettagliatamente gli organoidi gastrointestinali e cerebrali, con le relative differenze circa i fattori di crescita, i loro principali impieghi e il loro comportamento in base al rinnovamento del terreno di coltura.

Lo studio di queste cellule è, però, solo all'inizio ed è fondamentale capire come queste verranno utilizzate negli anni a venire indagando le prospettive future e le possibili nuove applicazioni nel mondo della ricerca biomedica.

Introduzione

Gli organoidi sono delle colture di cellule staminali che crescono in un ambiente in vitro tridimensionale con l'obiettivo di formare dei mini-cluster che grazie a capacità intrinseche di rinnovamento e differenziamento possano riprodurre in laboratorio la struttura e le funzioni di un organo in vivo.

Per questa ultima caratteristica gli organoidi sono anche soprannominati come “mini-organismi” perché dai loro fratelli maggiori ereditano una grande quantità di caratteristiche che facilitano lo studio dei ricercatori in molti ambiti differenti [1].

Tutto questo, però, risulta possibile grazie all'introduzione nel mondo della ricerca scientifica delle colture cellulari e più in particolare del loro diretto utilizzo all'interno dei laboratori.

La prima linea cellulare sequenziata e quindi utilizzata a partire dal 1951 è stata soprannominata come “*Hela Cells*” perché ottenuta da una biopsia della paziente *Henrietta Lacks* deceduta per una grave forma di carcinoma alla cervice uterina [2].

La grande particolarità di questa linea cellulare, però, non è tanto di essere effettivamente la prima ad essere stata utilizzata, ma quanto di ereditare dalla biopsia di provenienza delle cellule cancerogene e pertanto di rendere disponibile lo studio di tale grave malattia per la prima volta in un ambiente che non fosse direttamente quello umano.

Le *Hela Cells* ottennero un così grande clamore nel mondo scientifico che vennero inviate in molti dei maggiori laboratori dell'epoca e il loro diretto impiego permise di ottenere numerose informazioni sulla contaminazione interspecifica e più lentamente su quella intraspecifica.

Da questo momento lo studio delle linee cellulari iniziò sempre più a prendere piede e l'utilizzo dei modelli 2D divenne fondamentale in svariati campi della ricerca biomedica come, ad esempio, nella definizione delle risposte delle cellule a determinati segnali biochimici e biofisici. I modelli 2D si basano sull'aderenza ad una superficie piana che è solitamente una capsula di Petri di vetro o polistirolo per fornire supporto meccanico alle cellule [3].

I modelli 2D, però, presentano delle limitazioni importanti in quanto in molti casi riescono a rappresentare solo parzialmente ciò che avviene in vivo e ad esempio molte caratteristiche del cancro non possono essere validamente rappresentate.

L'introduzione dei più complessi modelli 3D ha permesso un avanzamento notevole in tali ambiti e in molti altri più sofisticati e soprattutto si è arrivati ad una rappresentazione più vicina al modello umano che era impossibile con i modelli precedenti.

Le tecniche più utilizzate per creare tali modelli sono: le colture di sferoidi, gli scaffolds di biopolimeri, la costruzione di scaffolds basati su blocchi di costruzione, gli hydrogel, i fogli cellulari, i bioreattori e le tecniche microfluidiche [3].

Gli organoidi fondano le loro applicazioni proprio su tali modelli e possono essere derivati da cellule staminali embrionali (ESC), cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) o cellule staminali neonatali o adulte (ASC) attraverso un processo simile al modo in cui l'organo acquisisce la sua organizzazione distintiva. Le diverse classi di cellule di provenienza portano con sé delle caratteristiche peculiari dal punto di vista biologico, chimico e pure etico e verranno tutte trattate all'interno di questo elaborato.

Le tipologie di organoidi si basano principalmente sul numero di organi che sono presenti nel nostro corpo ed infatti il primo ad essere creato è stato l'organoide gastrointestinale precisamente nel 2008 [1].

Negli anni successivi sono arrivate anche altre tipologie di organoidi come ad esempio quelle cerebrali, pancreatiche e molte altre son in fase di sviluppo anche oggi.

L'attenzione di questo elaborato si sposterà soprattutto sull'analisi degli organoidi gastrointestinali e cerebrali e delle loro rispettive applicazioni nel fronteggiare il cancro al colon e l'insorgenza dell'Alzheimer.

La parte finale sarà invece lasciata unicamente alla descrizione delle prospettive future degli organoidi, che risultano essere un ambito di studio ancora estremamente giovane e che pertanto, dati i già numerosi ambiti di applicazione, potranno avere solo che un radioso futuro che li aspetta nel mondo della ricerca biomedica.

CAPITOLO 1. Le colture cellulari

Le colture cellulari sono delle cellule isolate dal loro ambiente naturale che continuano il processo vitale all'interno di un sistema ben definito denominato "in vitro".

Il loro studio ed impiego le ha fatte rapidamente diventare uno strumento indispensabile per scoprire i meccanismi biofisici e biomolecolari che stanno alla base del processo di assemblaggio dei tessuti e degli organi, del loro corretto funzionamento e dei cambiamenti dovuti ad infezioni o malattie.

Le colture cellulari più largamente utilizzate vengono definite come piatte o bidimensionali (2D) e possiedono questo primato unicamente perché sono le prime ad essere state assemblate e studiate. Le recenti ricerche descrivono, infatti, un progressivo orientamento verso le più complesse strutture tridimensionali (3D) che vedono l'impiego di microambienti biochimici e biomeccanici molto più vicini e affini al modello in vivo.

L'utilizzo di questi agglomerati cellulari si ritrova nella ricerca biomedica, nell'ingegneria tissutale, nella medicina rigenerativa e addirittura nelle pratiche industriali.

1.1 Storia e sviluppo

La storia delle colture cellulari fonda le sue radici a partire dalla metà del ventesimo secolo, periodo nel quale vennero concluse alcune scoperte fondamentali che rappresentano ancora tutt'oggi delle pietre miliari per l'applicazione dei modelli in vitro.

Uno dei principali limiti nell'utilizzo delle cellule era rappresentato dal numero finito di replicazioni che si potevano ottenere una volta che le cellule somatiche sane venivano isolate. A tal fine i risultati ottenuti da *Earle W.R.* nel 1940 rappresentarono un enorme progresso nella facilità di applicazione delle colture cellulari, in quanto riuscì ad isolare e successivamente rendere immortali dei fibroblasti di topo usando degli specifici agenti cancerogeni [4].

Il vero pilastro, tuttavia, in questa rincorsa all'immortalità delle colture cellulari fu decisamente l'isolamento delle cellule *HeLa* della cervice uterina della paziente *Henrietta Lacks* affetta da una grave forma di carcinoma.

Tale biopsia sequenziata nel 1951 contribuì rapidamente alla diffusione e al miglioramento delle tecniche di applicazione dei metodi in vitro in tutto il mondo perché la possibilità di utilizzare una coltura cellulare immortalata e omogenea garantiva risultati standardizzati e di facile riproduzione.

Il progresso nell'uso di tale metodo biologico, quindi, volse molto rapidamente il suo sguardo verso lo sviluppo di terreni di coltura e di integratori che permettessero alle cellule di proliferare e mantenere una buona longevità nel corso del tempo. Molti studi, infatti, vennero condotti già diversi anni prima delle scoperte sopra citate e tutti avevano come comune denominatore lo scopo di migliorare le conoscenze sugli aminoacidi, sulle vitamine e sugli integratori che erano fondamentali per la crescita delle cellule [5]. Un crescente interesse nacque anche in seguito alla formulazione del principio delle 3R teorizzato da *Russel e Brunch* nel 1959 che prevedeva la riduzione (*Reduction*) del numero di animali usati per uno studio specifico, il raffinamento (*Refinement*) dei disegni sperimentali volto a diminuire lo stress e la sofferenza degli animali e il rimpiazzo (*Replacement*) della sperimentazione sugli animali con metodi alternativi come appunto i modelli in vitro.

Nella figura 1.1 sottostante sono rappresentate le descrizioni delle principali tappe legate alla scoperta di supporti e applicazioni delle colture cellulari.

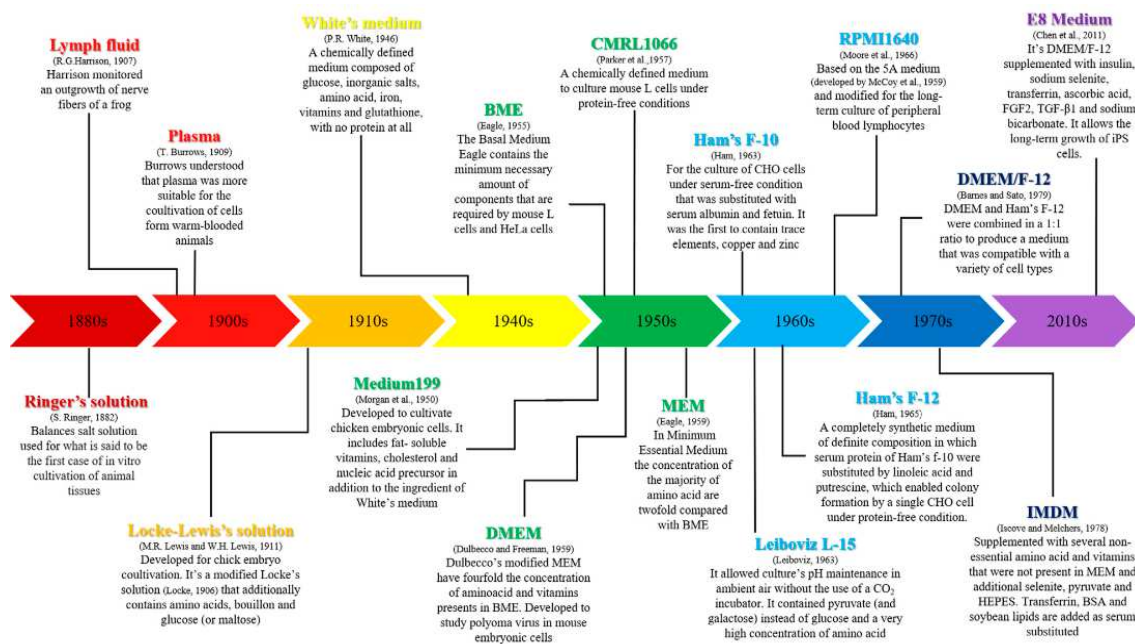


Figura 1.1: le scoperte delle colture cellulari nel corso del tempo [4].

Si inizia a parlare di “coltivazioni” cellulari e di terreni di coltura addirittura alla fine del diciannovesimo secolo con il primo esempio di modello in vitro ossia la soluzione isotonica di *S. Ringer* al quale interno si poteva trovare una bilanciata miscela di quattro diverse tipologie di sali tuttora utilizzata in ambito medico per test in vitro su tessuti muscolari.

Nella decade poi del sequenziamento delle *HeLa Cells* vennero sintetizzati numerosi terreni basali come il *Basal Medium Eagle* (BME) da *Eagle* nel 1955, che conteneva esattamente i

valori nutrizionali minimi per la corretta proliferazione delle HeLa Cells e delle cellule L isolate dal topo, oppure come il DMEM (Dulbecco e Freeman) che aumentava di quattro volte la concentrazione degli amminoacidi e delle vitamine della precedente BME col lo scopo di approfondire lo studio del polyomavirus nelle cellule embrionali del topo.

Inoltre, un'altra versione della BME venne completata da *Eagle* nel 1959 nella quale aumentava la concentrazione della maggior parte degli amminoacidi di circa due volte e alla quale venne dato il nome di MEM ossia "*In Minimum Essential Medium*".

Tutte queste versioni di terreni di coltura sintetizzate durante il secolo scorso sono le fondamenta degli attuali modelli in vitro e la dimostrazione di questo viene rispettata dall'ultima scoperta avvenuta nel 2010 con la creazione del *E8 Medium* che va a migliorare i ben già conosciuti DMEM e F12 di *Ham* (1965) grazie all'aggiunta di diversi composti tra i quali l'insulina e l'acido ascorbico con l'obiettivo di permettere una crescita a lungo termine delle cellule staminali pluripotenti indotte (iPs) [6].

Il progresso delle biotecnologie, dei materiali sia naturali che artificiali e dei terreni di coltura ha permesso quindi un rapido sviluppo di nuovi approcci verso l'applicazione delle colture cellulari in relazione anche al continuo e crescente impiego di queste ultime in svariati ambiti della ricerca. È stato, quindi, possibile classificare le colture cellulari viste in precedenza come modelli 2D formati cioè da un singolo strato di cellule (*monolayer*) inserito in uno specifico terreno basale ricco di nutrienti che permetteva la proliferazione delle cellule stesse.

Tali modelli però presentavano delle importanti limitazioni nell'imitare la complessa natura del nostro corpo biologico dotato di legami intrinseci che difficilmente si potevano rappresentare con un modello bidimensionale. Per tali ragioni e grazie ad un continuo miglioramento delle tecniche utilizzate vennero introdotti i modelli 3D.

Tale passaggio risulta di fondamentale importanza nel mondo della ricerca biomedica in quanto i modelli tridimensionali permettono una crescita armonica delle colture cellulari che maggiormente si avvicina a ciò che avviene in vivo. Inoltre, garantiscono una maggiore complessità nella costruzione di matrici extracellulari sulle quali le nostre colture crescono aprendo a nuove prospettive di studio che prima erano impossibili con i soli modelli 2D [4].

1.2 I modelli 2D

I modelli 2D sono caratterizzati da una struttura relativamente semplice composta da una coltura cellulare posta all'interno di un terreno basale con caratteristiche specifiche che permettono e favoriscono la proliferazione della stessa.

La coltura cellulare prima di essere inserita nel relativo terreno deve andare incontro ad uno specifico processo di evoluzione, il quale parte con il prelievo delle cellule da un campione prestabilito, procede poi con una dissezione meccanica e un trattamento con enzima come la tripsina con lo scopo eliminare i contatti tra le varie cellule. Successivamente viene bloccata la digestione enzimatica attraverso un inibitore e ne viene controllata la vitalità utilizzando ad esempio trypan blue.

Una volta terminato tale processo la nostra linea cellulare è pronta e viene quindi posta su una superficie piana tipicamente una capsula Petri di vetro o polistirolo con il fine di fornire supporto meccanico alle cellule. Le condizioni di coltura rappresentano un altro aspetto fondamentale per i nostri modelli in vitro in quanto deve essere mantenuta la sterilità completa del terreno al fine di non andare incontro alla presenza di microorganismi in grado di secernere eventuali sostanze tossiche per le cellule stesse. Inoltre, la temperatura e il livello del pH sono delle caratteristiche da tener ben presenti al fine di permettere una buona crescita della linea cellulare [3]. Il mezzo di coltura poi dipende dalle caratteristiche delle cellule ma in generale può essere composto da una base come la DMEM nella quale troviamo aggiunti amminoacidi, vitamine, dei sali inorganici, glucosio, glutammina ed eventualmente antibiotici o del siero.

La crescita in monostrati bidimensionali permette alle cellule di aver accesso a delle quantità di nutrienti che sono praticamente identiche e ciò garantisce uno sviluppo che risulta essere pressoché omogeneo. Tale caratteristica legata alla semplicità e alla buona efficienza rende molto appetibile l'utilizzo di tali modelli nella ricerca biomedica [7].

1.2.1 Le principali applicazioni

I modelli in vitro 2D vedono un'ampia serie di svariate applicazioni in diversi ambiti della ricerca. Rappresentano infatti, una buona base di partenza per ottenere delle informazioni che restano comunque abbastanza generiche e che dovranno, successivamente, essere integrate da altre rilevazioni fatte con modelli più specifici come i 3D o direttamente in vivo.

I modelli 2D li ritroviamo applicati soprattutto nello studio di alcuni processi cellulari che sottoposti a definite condizioni controllate possono darci delle informazioni in merito al comportamento della nostra linea cellulare.

Vengono, inoltre, impiegati anche nello studio dei meccanismi molecolari di una patologia con le finalità di definire una diagnostica oppure individuare le caratteristiche che sottendono all'insorgenza e la conseguente evoluzione di una determinata malattia.

Il loro principale ambito di applicazione rimane però lo studio di “*drug discovery*” ossia la verifica dell’effetto di vari composti chimici e farmaceutici su specifici tipi cellulari.

Tale utilizzo dei modelli 2D apre la strada al loro impiego non solo nel mondo della ricerca biomedica ma anche in universi ad essa collegati come ad esempio quello farmaceutico e cosmetico sotto la spinta di una continua richiesta di test di nuovi composti da inserire nei nuovi prodotti commerciali [3].

L’ultimo ambito di impiego rimane poi lo studio dell’utilizzo delle cellule per la generazione di tessuti in provetta col fine di applicarli nella medicina rigenerativa.

Come abbiamo appena visto quindi i modelli 2D comprendono un ampio uso di applicazioni in mondi della ricerca che hanno scopi che potenzialmente sono molto diversi tra di loro.

Rimangono, però, uno strumento pressoché limitato perché risulta molto difficile riuscire ad imitare l’enorme complessità del corpo umano con dei modelli così semplici e il loro continuo impiego ha sollevato diversi dubbi soprattutto in quei settori come il farmaceutico e il cosmetico che necessitano di conclusioni certe ed in tempi brevissimi.

Sebbene tali limiti siano reali e difficilmente superabili, i modelli 2D rimangono tuttora uno standard di fondamentale importanza per moltissimi ambiti della ricerca in quanto sono molto economici e facilmente replicabili [8].

1.3 I modelli 3D

Dalla prima scoperta della possibilità di riprodurre un ambiente specifico che imitasse il modello in vivo, l’approccio 3D è subito diventato una favolosa innovazione nel panorama dei metodi applicabili. Una coltura 3D, infatti, può essere definita come “una coltura cellulare che può imitare l’organizzazione e la microarchitettura di un organo vivente” rendendola di fatto uno strumento molto più vicino al modello in vivo rispetto ai 2D precedenti [9].

La coltura cellulare in questo modello può crescere con una struttura tridimensionale utilizzando diversi supporti anche chiamati come sistemi di impalcatura. Questi possono essere di tipo sintetico come le ceramiche, i metalli e i polimeri o di tipo naturale come i polisaccaridi, le proteine, i derivati della ECM oppure idrogel. In alternativa, è possibile che le cellule crescano libere da eventuali impalcature come nel caso degli sferoidi e degli organoidi [4].

Abbiamo, quindi, visto che i modelli 3D fanno crescere le cellule in aggregati/sferoidi 3D con l’utilizzo (figura 1.2 B, C) o meno (figura 1.2 D) di una impalcatura. Le colture 3D basate su tale supporto possono essere generate seminando le cellule su una matrice 3D acellulare o disperdendo le cellule in una matrice liquida seguita da solidificazione o polimerizzazione.

I materiali di sostegno comunemente utilizzati includono sistemi di impalcature di derivazione biologica e materiali a base sintetica [7].

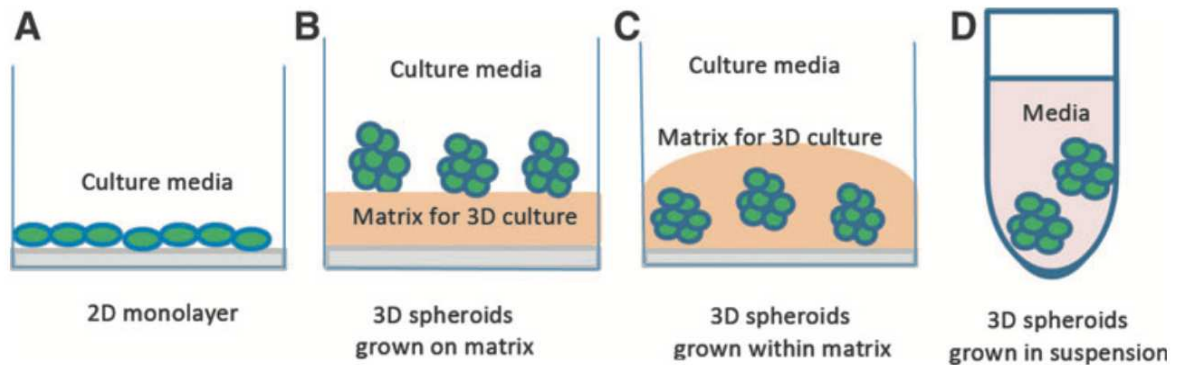


Figura 1.2: comparazione delle colture 3D in diversi terreni di coltura [7].

Prodotti reperibili in commercio come la matrice di membrana basale *BD Matrigel™* (BD Sciences), l'estratto di membrane basale *Cultrex®* (BME; Trevigen) e l'acido ialuronico sono tutti esempi di matrici di derivazione naturale o biologica comunemente usati. [7]

Il glicole polietilene (PEG), invece, l'alcol polivinilico (PVA), il polilattide-co-glicolide (PLG) e la policaprolattone (PLA) sono i materiali più frequenti utilizzati per formare delle impalcature di tipo sintetico [10]. Gli sferoidi cellulari 3D, infine, così come gli organoidi possono crescere sia con che senza impalcature. In questo secondo caso sarà necessario proteggere la loro natura generandoli in sospensione con la matrice extracellulare (ECM) e il loro relativo microambiente come nel caso della figura 1.2 D [10].

1.3.1 Matrice extracellulare (ECM)

La matrice extracellulare nei tessuti e negli organi è composta da una rete 3D di proteine che formano fibre, come collagene, elastina, fibronectina e glicosamminoglicani. Ha la funzione fondamentale di fornire un'impalcatura fisica per le cellule ed infatti le macromolecole che la costituiscono sono sintetizzate da buona parte dei tipi di cellule presenti nel nostro corpo.

Nei nostri modelli 3D, pertanto, è di fondamentale importanza ricreare dei composti che possano imitare il più verosimilmente possibile le caratteristiche che ritroviamo in natura.

Nei modelli in vitro, infatti, la ECM svolge dei compiti che sono di fondamentale importanza in quanto è responsabile dell'adesione cellulare, del corretto trasporto di gas, nutrienti e fattori di crescita verso le cellule promuovendo di fatto la sopravvivenza, la proliferazione e la differenziazione delle cellule. L'ECM, inoltre, garantisce la costruzione di una rete di

comunicazione cellula-cellula e cellula-ECM che permette di preservare la specificità e l'omeostasi della nostra linea cellulare. Esistono diverse tipologie di ECM caratterizzate da una composizione naturale oppure sintetica che garantiscono dei vantaggi/svantaggi differenti a seconda delle necessità di studio. In ogni caso tutti gli esempi fatti nel precedente capitolo rappresentano delle varietà di matrici extracellulari [11].

1.4 Le principali applicazioni

I modelli 3D rappresentano sicuramente un mondo in continua evoluzione nella ricerca non solo biomedica ma anche farmaceutica e cosmetica. Sarebbe quindi molto complicato racchiudere tutte le numerose applicazioni e pertanto verranno trattate quelle di maggiore importanza.

1.4.1 *Drug discovery*

Il processo della *drug discovery* consta nella scoperta di nuovi farmaci o composti da utilizzare in prodotti a contatto diretto con l'uomo. Tali farmaci prima di ottenere l'idoneità per la commercializzazione devono superare una serie di test col fine di dimostrare la non tossicità degli stessi una volta che entrano a contatto col corpo umano. Tra questi test sono presenti una fitta rete di prove da completare su colture cellulari. Quindi come per i 2D anche i ben più complessi modelli 3D presentano una larga applicazione nel mondo della *drug discovery* con esiti che risultano nella maggior parte dei casi molto più specifici e attendibili rispetto al solo impiego dei bidimensionali. La dimensione aggiuntiva delle colture 3D, infatti, non solo influenza l'organizzazione spaziale dei recettori della superficie cellulare impegnati nelle interazioni con le cellule circostanti, ma induce anche dei vincoli fisici alle cellule stesse.

Inoltre, questi aspetti spaziali e fisici nelle colture 3D influenzano la trasduzione del segnale dall'esterno all'interno delle cellule e, in definitiva, influenzano l'espressione genica e i relativi comportamenti cellulari [7]. Le risposte cellulari ai trattamenti farmacologici nelle colture 3D si sono dimostrate più simili a ciò che si verifica in vivo rispetto alla cultura 2D.

Un certo numero di studi ha scoperto che le cellule coltivate in modelli 3D sono più resistenti ai farmaci antitumorali rispetto alle colture 2D. Ad esempio, nello studio della attività di alcuni farmaci contro il cancro ovarico i risultati ottenuti indicavano che tutti i farmaci erano altamente attivi nella coltura monostrato 2D mentre negli sferoidi 3D risultavano inizialmente meno attivi e gradualmente persero completamente la loro attività [12].

1.4.2 *Organs-on-a-chip*

Il termine “*Organ-on-a-Chip*” (OOAC) si riferisce a una biotecnologia che attualmente rappresenta uno degli sviluppi più promettenti ed entusiasmanti nel combinare biologia e ingegneria.

Attraverso l'uso di tecniche di produzione all'avanguardia come la soft-litografia è stata recentemente dimostrata la possibilità di ingegnerizzare piattaforme biomimetiche su *chip* [9]. Il termine "*chip*" si riferisce ai principi di progettazione e alle tecniche di microfabbricazione che vengono utilizzate, mentre il termine "*organ*" deriva dalla personalizzazione dell'architettura del microambiente ispirata alle funzioni a livello dell'organo in vivo.

Tali piattaforme permettono di simulare importanti segnali fisiologici, come ad esempio la vascolarizzazione, rendendo migliore l'emulazione delle condizioni fisiologiche in vivo per lo studio di moltissimi processi biologici.

I principali vantaggi risiedono in prima battuta nella enorme semplicità di fabbricazione alla quale si aggiunge una elevata versatilità e riproducibilità dato che il design del *chip* può essere facilmente modificato. Inoltre, il grande vantaggio della microscala è quello di poter creare un ambiente controllato e dinamico in grado di imitare i segnali meccanici e fisiologici che provengono dalle colture cellulari rendendolo in tutto e per tutto un ambiente complesso come quello che troviamo nel corpo umano. Infine, tale modello di organo presenta anche dei costi relativamente limitati e dei tempi di fabbricazione molto rapidi [13].

Questi *biochip* sono, pertanto, candidati promettenti e assolutamente potenziali per sostituire i modelli animali che attualmente vengono impiegati con scarsi risultati nel prevedere le risposte umane date le diversità intrinseche tra le specie e sempre al centro di giustificati dibattiti legati alla relativa eticità di tali impieghi. La crescita di questi *minichip* è sempre più accelerata e favorita grazie anche all'integrazione delle conoscenze multidisciplinari di biologia, ingegneria, chimica, materiali e fisica.

Le loro applicazioni sono potenzialmente infinite basti pensare che in un futuro prossimo potrebbero essere la base di partenza dei test sulla tossicità dei farmaci o di cosmetici ma trovano un largo impiego anche nella medicina rigenerativa e in quella personalizzata [4].

CAPITOLO 2. Gli organoidi

Il termine organoide in passato era stato vagamente utilizzato per definire la formazione di aggregati 3D ottenuti grazie ad una coltivazione in vitro in assenza di un substrato di adesione. Al giorno d'oggi la definizione di organoide è associata ad una struttura cellulare 3D derivata da cellule staminali e mantenente architetture e funzionalità simili agli organi in vivo dai quali deriva. Gli organoidi, infatti, possono essere generati dalle cellule staminali embrionali pluripotenti (ES), dalle loro controparti sintetiche ossia le iPS e dalle ASC specifiche per organo multipotente [14].

Da queste ereditano buona parte delle loro proprietà e tali verranno trattate in una sezione a parte più avanti. Nell'ultima decade, inoltre, i loro impieghi sono in rapido aumento soprattutto perché potenzialmente ogni organo del nostro corpo può avere il suo corrispettivo organoide in laboratorio.

Nel capitolo successivo verranno trattati la loro storia e il loro sviluppo nel corso del tempo.

2.1 Storia e sviluppo

La storia degli organoidi inizia in verità da molto lontano perché esperimenti che potessero avvicinarsi a tali modelli li troviamo già nei primi anni del 1900 con obiettivi e successivi risultati che inizialmente erano di difficile comprensione.

Già nel 1907, infatti, *Henry Van Peters Wilson* descrisse il primo tentativo di rigenerazione in vitro dell'organismo, nel quale riuscì a dimostrare che le cellule di spugna dissociate potevano auto-organizzarsi per rigenerare un intero organismo. Successivamente dopo qualche decennio diversi gruppi di ricercatori hanno eseguito degli esperimenti di dissociazione e riaggregazione per generare diversi tipi di organi dal pronefro di alcuni anfibi dissociati e da embrioni di pulcino [1]. Una tappa fondamentale venne scritta nel 1964 anno nel quale *Malcolm Steinberg* introdusse l'ipotesi di adesione differenziale, proponendo che la separazione e il riarrangiamento delle cellule potessero essere influenzate dalla termodinamica mediata dall'adesione differenziale superficiale [15].

Le decadi successive videro prosperare gli studi sulle cellule staminali in relazione soprattutto all'importante isolamento, avvenuto nel 1981, delle prime cellule staminali pluripotenti (PSC) ottenute partendo dagli embrioni di topo. Si dovette però aspettare fino al 1998 per essere in grado di isolare e coltivare per la prima volta delle cellule staminali embrionali derivate da delle

blastocisti umane. Nella figura 2.1 di seguito vengono raffigurate le principali tappe dello sviluppo di tali mini-organismi nel corso del tempo [16].

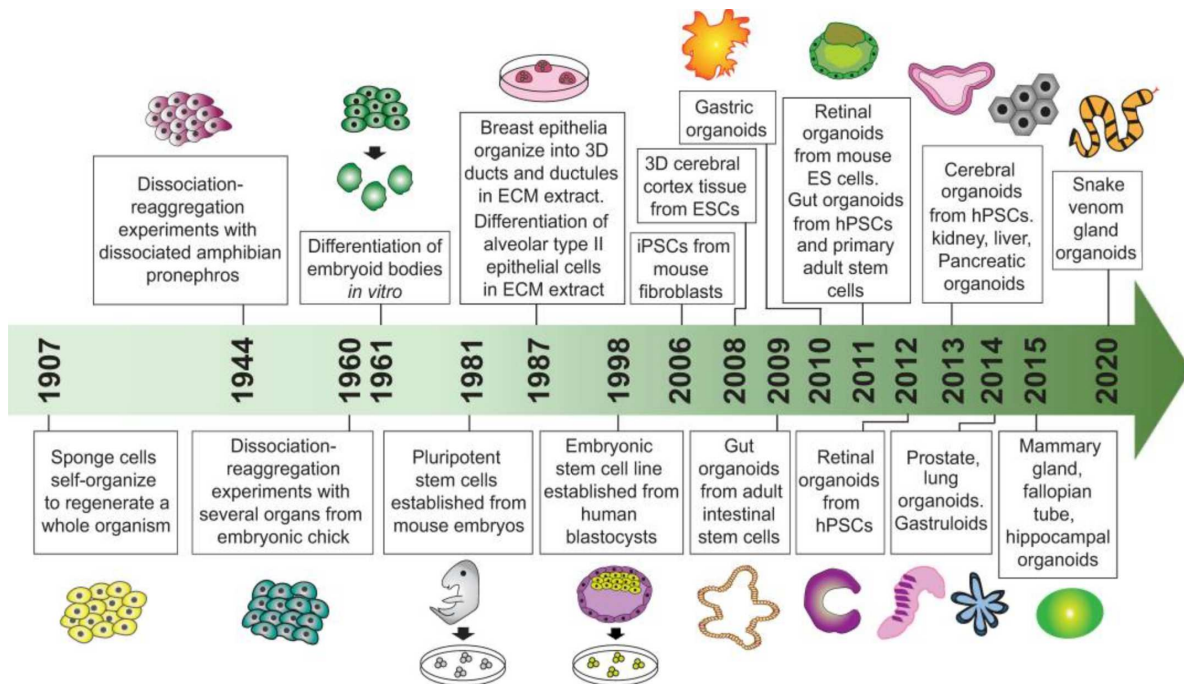


Figura 2.1: storia e sviluppo organoidi col passare degli anni [1].

Più tardi, gli iPSC sono stati successivamente ricavati dalla riprogrammazione dei fibroblasti di topo e umani, assestando un impatto significativo sulla ricerca delle cellule staminali e degli organoidi. La prossima tappa fondamentale venne descritta nel 2009, quando lo storico studio di *Sato* e colleghi dimostrò che una singola ripetizione di leucina, contenente cellule staminali intestinali adulte accoppiate con proteine G (*Lgr5*), poteva formare organoidi intestinali 3D in *Matrigel* che si auto-organizzavano e si differenziavano in assenza di una nicchia mesenchimale. Questo è stato il primo vero e proprio rapporto sulla creazione di una coltura organoide 3D derivata da un singolo ASC, che di fatto ha posto le basi per molte altre tipologie di organoidi successivi. Negli anni a venire, infatti, sono stati ottenuti i primi organoidi gastrici di retina, cervello, fegato, polmone e pancreas [17]; molti altri sono tutt'ora in fase di lavorazione perché, come già detto, potenzialmente ogni organo può avere un proprio mini-organismo in laboratorio e ciò postula il perfezionamento dei metodi per ottenerli, che verranno trattati nelle parti successive in seguito ad un approfondimento sulle cellule staminali.

2.2 Le cellule staminali.

Le cellule staminali sono delle cellule molto particolari del nostro corpo. Si dice, infatti, che queste siano delle cellule non specializzate, ossia che durante il loro sviluppo siano in grado di

diventare qualsiasi cellula del nostro organismo. Possiedono, inoltre, la proprietà di autorinnovamento che permette loro di andare incontro a numerosi cicli di divisione cellulare senza perdere il loro stato indifferenziato. Le cellule staminali sono presenti sia nell'individuo adulto che nell'embrione in fase di sviluppo. In particolare, in questa seconda condizione sappiamo che le cellule staminali vengono prodotte a partire dalle blastocisti.

Una blastocisti si forma dopo la fusione della cellula uovo con lo spermatozoo ossia nella fase iniziale della fecondazione. Le blastocisti sono composte da due tipi di cellule distinte: la massa cellulare interna (ICM), che si sviluppa in epiblasti e induce lo sviluppo di un feto, e il trofotoderma (TE). Le cellule staminali embrionali derivano proprio dalla ICM [18].

Sebbene esistano molte tipologie di cellule staminali, verranno trattate le tre principali che permettono di derivare gli organoidi.

2.2.1 Cellule staminali embrionali pluripotenti (ESC).

Gli ESC sono derivati dalla massa cellulare interna della blastocisti, che è una fase dell'embrione che si forma circa quattro giorni dopo la fecondazione della cellula uovo.

Dopo di che, queste cellule vengono collocate in un piatto di coltura ricco di nutrienti e strutture di sostegno che formano il terreno di coltura delle stesse. Una volta operato tale passaggio di *sub-culturing* in altri piatti le cellule sono pronte per l'impiego in laboratorio.

Queste cellule possono essere descritte come pluripotenti perché sono in grado di differenziarsi in ogni tipo di cellula presente nell'organismo. Tuttavia, dall'inizio dei loro studi, ci sono state restrizioni etiche legate all'uso medico degli ESC nelle terapie [18].

Infatti, sebbene la maggior parte delle cellule staminali embrionali sia sviluppata da ovuli che sono stati fecondati in una clinica in vitro e non in vivo, tale procedura richiede comunque l'utilizzo di una cellula uovo che se messa nelle ideali condizioni potrebbe creare una nuova vita. Per tale motivo, quindi, l'utilizzo di queste cellule risulta estremamente limitato ma tali problematiche vengono risolte dalle iPSC.

2.2.2 Le cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC).

Le cellule staminali pluripotenti indotte rappresentano una delle scoperte fondamentali nel mondo della ricerca biomedica in quanto riescono a superare il limite dell'eticità imposto alle ESC. Le iPSC, infatti, derivano direttamente dalle cellule somatiche della pelle o dei fibroblasti del paziente. Tali cellule una volta che vengono isolate dal paziente vanno incontro ad un

processo di riprogrammazione grazie all'utilizzo di alcuni fattori che permettono la conversione da cellule somatiche a iPSC. La riprogrammazione si concentra sull'espressione di alcuni oncogeni come i *Myc* ed i *Klf4* ed è favorita da una tecnica di *downregulation* dei geni che promuove la stabilità generale del processo [19].

Tutti questi passaggi, però, possono causare un potenziale rischio mutageno e successivamente portare ad un aumento del numero di mutazioni nelle nostre colture cellulari. Sebbene, tali mutazioni fossero effettivamente presenti, dagli studi condotti si riuscì a determinare che provocavano delle alterazioni genomiche non severe e pertanto non mettevano a rischio il metodo di riprogrammazione appena descritto. La scelta di utilizzare i fibroblasti come fonte da cui attingere per creare le iPSC deriva dal fatto che riescono a mantenere una stimolazione più veloce e meglio controllata rispetto ad altre linee cellulari più semplici da ottenere come quelle derivate dal sangue periferico o dalle cellule epiteliali renali presenti nelle urine [20].

2.2.3 *Le cellule staminali adulte specifiche per organo multipotente (ASC).*

Le ASC sono delle cellule indifferenziate che si trovano nei tessuti specializzati dell'organismo adulto e possiedono solo in parte le caratteristiche morfologiche, strutturali, molecolari e antigeniche che si riscontrano nelle cellule differenziate del tessuto di appartenenza.

Presentano, inoltre, le caratteristiche tipiche delle cellule staminali, quali la capacità di auto-mantenersi indefinitamente e la clonogenicità. A differenza di quanto conosciuto per le ESC, risulta ancora molto complesso definire con certezza in quale fase dello sviluppo embrionale abbiano origine le cellule staminali adulte. La teoria più accreditata sostiene che si sviluppino subito dopo la gastrulazione e poco prima del *commitment* tissutale e ciò spiegherebbe il fatto che il loro potenziale di differenziazione sia limitato al solo foglietto embrionale di origine.

Una pista secondaria, invece, afferma che tale fase dello sviluppo avviene prima della gastrulazione, mantenendo, quindi, ancora un alone di incertezza su quale sia la strada corretta. Le cellule staminali adulte sono in grado di dare origine a tutti i tipi cellulari del tessuto a cui appartengono ma risultano ancora molto rare e soprattutto di difficile individuazione.

Tali cellule, inoltre, diminuiscono il loro numero con il progressivo sviluppo dell'organismo arrivando a dei valori minimi e stabili in età adulta ossia nella fascia del loro potenziale isolamento. La strada migliore per gli organoidi rimane pertanto l'utilizzo delle iPSC [18].

2.3 I metodi per ottenere gli organoidi.

La maggior parte degli organoidi si forma attraverso il processo che coinvolge la meccanica intrinseca dei tessuti e le interazioni interne programmate, note come auto-organizzazione.

L'auto-organizzazione può essere classificata in tre categorie note come auto-assemblaggio, *auto-patterning* e auto-morfogenesi. Un altro compito fondamentale nella formazione dell'organoide è riservato al terreno di coltura con i suoi fattori di crescita che indirizzano lo sviluppo delle cellule staminali nella via desiderata. La funzione strutturale, infine, viene lasciata alla matrice extracellulare. Tutte queste componenti sono fondamentali nella costruzione del nostro organoide e verranno trattate nelle sezioni successive [20].

2.3.1 Auto-assemblaggio.

L'autoassemblaggio è il controllo delle posizioni relative delle cellule da parte delle regole locali del tessuto durante l'evoluzione temporale. In senso stretto, l'autoassemblaggio si riferisce alla formazione spontanea di una struttura modellata mediante aggregazione selettiva di cellule o mediante un riarrangiamento delle posizioni relative delle cellule all'interno della struttura. Una struttura complessa e altamente ordinata può emergere dall'auto-assemblaggio di uno o pochi tipi di elementi, per esempio l'auto-formazione dei fiocchi di neve. A livello tissutale, l'esempio classico è lo studio di dissociazione-riassembaggio di spugne marine, in cui emergono architetture tissutali che assomigliano alle strutture in vivo. La formazione del modello nel tessuto riassembleto può essere guidata da processi complessi, come l'affinità differenziale tra elementi distinti, il controllo spaziale di nuovi siti di attaccamento, i movimenti cellulari attivi e i riarrangiamenti cellulari [21].

2.3.2 Auto-patterning.

L'*auto-patterning* è il controllo spazio-temporale dello stato cellulare, con la finalità che le cellule acquisiscano delle proprietà eterogenee specifiche del tessuto di appartenenza da una popolazione di cellule omogenee. I modelli tissutali complessi possono apparire spontaneamente da un aggregato cellulare omogeneo (o foglio cellulare) attraverso il controllo spazio-temporale dello stato cellulare con regole locali e senza segnali esterni [21].

2.3.3 *Auto-morfogenesi.*

La auto-morfogenesi è il controllo spazio-temporale della meccanica intrinseca dei tessuti. Durante l'organogenesi, forme tissutali complesse ma stereotipate si sviluppano attraverso la deformazione, la crescita locale e il rimodellamento. Nell'auto-organizzazione, la morfogenesi multicellulare è guidata dalla meccanica intrinseca dei tessuti e si verifica autonomamente in assenza di forze esterne o vincoli spaziali. Tale tecnica autoguidata dovrebbe comportare controlli complessi nella generazione locale di forze interne dirette e nella modifica dinamica della rigidità e della viscosità dei tessuti, nonché il controllo dinamico della risposta alla forza meccanica. Questi meccanismi funzionano anche nella migrazione collettiva delle cellule [21].

2.3.4 *Terreni di coltura.*

La formulazione dei terreni di coltura risulta essere una componente critica nella tecnologia organoide, in quanto al suo interno sono disciolti dei fattori di crescita che hanno la finalità di sviluppare correttamente il nostro mini-organo.

I principali fattori di crescita impiegati sono le *R-spondine* e i *Gremlin 1* o *Noggin*; i primi vengono applicati per potenziare il percorso *Wnt* nelle cellule staminali epiteliali, mentre i secondi per inibire i segnali di differenziazione della via BMP.

Attualmente, l'impiego dei sistemi di espressione eucariotica è la via più vantaggiosa per la produzione di fattori di crescita, i quali vengono direttamente secreti dalle cellule nel mezzo di coltura e, successivamente, diluiti nei terreni di coltura organoide.

Le linee cellulari che esprimono le *R-spondine* e i *Gremlin 1/Noggin*, tuttavia, non sono ampiamente disponibili e l'uso di supporti condizionati presenta dei problemi di variazione dell'attività del fattore di crescita. Una valida soluzione potrebbe essere l'applicazione di fattori di crescita purificati, ma anche questi risultano molto costosi e difficilmente utilizzabili in larga scala. Inoltre, tali preparati commerciali possono trattenere delle impurità, impedendo una determinazione accurata e riproducibile delle loro attività cellulari [17].

2.3.5 *Matrice extracellulare (ECM).*

Il modo più comune per promuovere la caratteristica 3D degli organoidi è quello di utilizzare le ECM solide che supportano l'adesione e la crescita cellulare.

Matrigel, una ECM naturale purificata dal sarcoma di topo, è la matrice più utilizzata per la derivazione organoide 3D. Gli organoidi intestinali, cerebrali, gastrici e delle ghiandole

mammarie sono solo alcuni degli esempi che sono stati generati con successo utilizzando *Matrigel* o idrogel simili che imitano le membrane basali.

Ci sono stati anche alcuni rari esempi dell'uso di matrici di collagene di tipo I per la derivazione di organoidi delle ghiandole mammarie e intestinali. Il vantaggio principale di queste matrici naturali è la presenza di un complesso mix di componenti ECM e fattori di crescita che rende la crescita e la differenziazione cellulare molto efficienti; tuttavia, questa complessità e la variabilità della composizione rendono più difficile il controllo dell'ambiente cellulare e possono ridurre la riproducibilità. Per tali motivi, gli idrogel chimicamente definiti sono stati recentemente introdotti al fine di sostenere la coltura organoide intestinale e cerebrale come valido sostituto delle matrici naturali. Questi idrogel consentono di controllare la biochimica e la meccanica dell'ambiente di coltura ma sono intrinsecamente meno bioattivi e devono essere personalizzati per soddisfare le esigenze specifiche dei diversi organoidi [1].

2.4 Tipologie di organoidi ottenuti da iPSC.

Gli organoidi possono essere ottenuti da tre classi di cellule staminali. Come già visto in precedenza non vi sono grandi differenze tra le ESC e le iPSC e pertanto i mini-organi che otteniamo da queste due categorie di cellule presentano delle caratteristiche che sono praticamente assimilabili. Si dice, infatti, che tali organoidi siano derivati da una classe di cellule chiamata come PSC che di fatto racchiude sia le ESC che le iPSC.

La generazione degli organoidi ruota attorno a tre fasi principali. La prima di queste avviene durante la fase di differenziazione delle cellule staminali e consta nell'inibizione delle principali vie di segnalazione al fine di sviluppare un'importante identità cellulare. In secondo luogo, si procede con la generazione di una matrice che consenta un'adeguata differenziazione dei tipi di cellule necessari all'organoide. Infine, le cellule vengono coltivate per propagarsi in tre dimensioni combinandole in strutture 3D o implementandole in una matrice 3D [21].

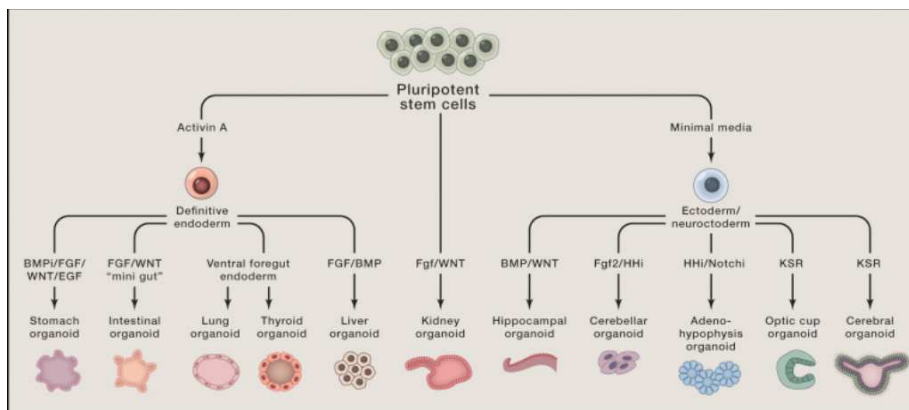


Figura 2.2: Diversi modelli di differenziazione delle cellule staminali e tipologie di organoidi generati [22].

Nella figura 2.2 sono indicate i diversi modelli di differenziazione che le cellule staminali raggiungono se trattate con determinati fattori di crescita. Esistono quindi tre categorie di organoidi: quelli che derivano dall'endoderma, quelli che discendono dal mesoderma e gli ultimi creati dall'ectoderma. Nei capitoli successivi verranno trattati questi tre diversi modelli aventi come progenitrici la stessa classe di cellule ossia le PSC.

2.4.1 Gli organoidi derivati dall'endoderma.

Gli organoidi derivati dalle PSC sono stabiliti a seguito della differenziazione diretta delle cellule staminali pluripotenti, che richiede una prima specifica fondamentale dello stato germinale (endoderma, mesoderma o ectoderma) seguita poi da induzione e maturazione [21]. In questo capitolo verranno trattati i principali organoidi che derivano dall'endoderma.

Una volta terminate le tre fasi elencate in precedenza le cellule staminali vengono trattate con un particolare fattore di crescita ossia la “*Activin A*” che ha il compito di accompagnare il nostro mini-organo nella sua differenziazione finale.

Il primo tipo di organoide in esame è l'organoide del fegato. L'obiettivo per la creazione di tale mini-organo era quello di generare dei tessuti che potessero ricordare il germoglio epatico umano. Quest'ultimo è una massa di tessuto condensato che si forma durante l'epatogenesi precoce e deriva dall'endoderma anteriore. Le PSC umane sono state indotte nelle cellule epatiche endodermiche attraverso il trattamento con activina e in seguito con bFGF/BMP4 in una coltura 2D. Le cellule epatiche derivate sono state poi mescolate con cellule staminali mesenchimali ed endoteliali. Infine, in seguito ad un processo di placcaggio ad alta densità su uno strato di *Matrigel* si sono ottenuti degli aggregati 3D simili a delle gemme di fegato contenenti dei vasi sanguigni che si ricollegavano ai vasi ospiti entro 48 ore. Tali mini-organi vennero impiantati con grande successo in alcuni topi salvandoli da una grave insufficienza epatica indotta da alcuni farmaci [22].

Il secondo organoide trattato è quello polmonare. Le vie possibili per ottenere tale mini-organo sono molte e si differenziano principalmente per le tecniche di crescita e di coltura alle quali sono sottoposte le PSC. In questo elaborato verrà trattata la via più promettente e dai risultati più incoraggianti ossia quella ottenuta da *Spence* e colleghi.

Questi ricercatori, infatti, dopo aver trattato le PSC con “*Activin A*”, hanno avuto l'intuizione di aggiungere degli inibitori (TGF β /BMP, FGF4) e degli attivatori (*Wnt*) al terreno di coltura che permettessero di istruire le cellule verso un destino ventrale anteriore. Una volta terminata

l'azione dell'attivatore, le PSC sono state incorporate in *Matrigel* e la successiva esposizione prolungata a *Fgf10* ha permesso la creazione di organoidi polmonari maturi.

Tali colture ottenute, inoltre, avevano il vantaggio di poter essere mantenute per diversi mesi senza perdere la loro incredibile somiglianza alle vie aeree prossimali.

L'ultimo organoide trattato in tale sezione sarà quello tiroideo perché i rimanenti gastrointestinali verranno descritti in un capitolo a parte [22].

I tentativi di creare degli organoidi tiroidei hanno comportato l'espressione forzata dei fattori di trascrizione specifici del lignaggio NKX2.1 e PAX8 e hanno portato in modo incoraggiante alla formazione di follicoli in vitro. *Kotton* e colleghi hanno, però, applicato una versione migliorata attraverso l'impiego di un successivo trattamento sequenziale con BMP4/FGF2 e una finale maturazione indotta mediante placcatura 3D in *Matrigel*. Questo ha permesso la formazione di un organoide tiroideo che imitasse in buona parte le caratteristiche dei follicoli tiroidei [23].

2.4.2 *Gli organoidi derivati dal mesoderma*

Gli organoidi derivati dal mesoderma prevedono una fase iniziale di coltura che permette alle cellule staminali di differenziarsi grazie all'azione di particolari fattori di crescita come l'Activina A e il BMP4. Il principale organoide derivante dal mesoderma per il momento è l'organoide renale.

Il rene, con i suoi oltre 20 tipi di cellule specializzate, presenta la più alta complessità architettonica di tutti gli organi al di fuori del SNC. Fino a poco tempo fa, il complesso controllo spaziale e temporale dell'organogenesi ha ostacolato una comprensione molecolare dettagliata dei singoli tipi di cellule. Nonostante ciò, sono stati compiuti rapidi progressi nella creazione di protocolli per la differenziazione dei PSC umani in "mini-reni" [24].

Esistono diversi metodi per ottenere tale tipologia di organoide, ma qui di seguito verrà trattato il protocollo perfezionato di *Little* e colleghi perché rappresenta la migliore soluzione tra tutte le vie provate. In questo fondamentale studio i PSC umani sono coltivati in 2D in presenza di segnali *Wnt* per 4 giorni, seguiti poi da un'esposizione di 3 giorni a *Fgf9*.

Passato tale periodo di tempo le cellule vengono agglomerate e coltivate come organoidi 3D per un massimo di altre tre settimane.

Il numero di nefroni è fortemente aumentato con una breve esposizione (1 ora) con *Wnt* all'inizio della coltura dell'organoide e tale conclusione ci fa dire che il risultato ottenuto è il migliore modello per ottenere un "mini-rene" in laboratorio [24].

2.4.3 Gli organoidi derivati dall'ectoderma.

Gli organoidi derivati dall'ectoderma prevedono una iniziale differenziazione delle PSC e un conseguente trattamento con fattori come *Wnt* e BMP4. I mini-organi che discendono da questa categoria sono quelli della retina, dell'adenoipofisi, del cervelletto e del cervello [21].

La "mini-retina" ha l'obiettivo di imitare la continua stratificazione in fotorecettori e i tipi di cellule come quelle orizzontali, bipolari e amacrine della sua controparte umana. Gli organoidi sviluppati fino ad ora su cellule staminali di topo o di murine hanno dato dei risultati poco incoraggianti, mentre quelli condotti su PSC umane sono arrivati a degli esiti più positivi.

Infatti, questi ultimi hanno delle caratteristiche che si avvicinano molto alle loro controparti animali ma migliorano dal punto di vista delle dimensioni più elevate che restano comunque lontane dalla retina vera e propria. Inoltre, la retina neurale dell'organoide cresce in un spesso tessuto multistrato contenente sia aste che coni, cosa che era stata raramente osservata in quella dei topi [22].

L'organoide dell'adenoipofisi cerca di ricapitolare il microambiente induttivo di questo campo morfogenetico al fine di promuovere la generazione simultanea di entrambi i tessuti all'interno dello stesso aggregato di cellule. I risultati ottenuti, però, sono ancora poco convincenti e anche i test fatti su cellule di topo e sul successivo impianto hanno evidenziato solo minimi miglioramenti sulle condizioni dell'animale. Sarà, pertanto, necessario attuare delle tecniche di coltura e di crescita innovative al fine di compiere dei passi in avanti significativi.

L'ultimo organoide trattato è quello cerebellare o del cervelletto. Lo studio si è concentrato sull'induzione dello sviluppo istmico nel tentativo di creare delle cellule di Purkinje che fossero simili a quelle del cervelletto. Attraverso l'impiego di *Fgf2* e la successiva aggiunta di *Fgf19* e di SDF1 alle cellule PSC differenziate si è riusciti ad ottenere una struttura polarizzata che ricordasse il cervelletto del primo semestre. Anche in questo caso, però, come nei precedenti i risultati ottenuti sono ancora scarsi e hanno bisogno di studi più approfonditi per ottenere delle cellule più mature [25]. Completamente diverso è il caso dell'organoide celebrale che verrà trattato in un capitolo a parte più avanti.

2.5 Tipologie di organoidi derivati da ASC

A differenza degli organoidi basati su PSC che sfruttano i processi di sviluppo per il loro insediamento, gli ASC sono in grado di formare organoidi creando condizioni che imitano l'ambiente di nicchia delle cellule staminali durante l'auto-rinnovamento fisiologico dei tessuti

o durante la riparazione dei danni. Gli organoidi possono essere generati da cellule staminali progenitrici adulte isolate o da frammenti isolati di tessuto dell'organo corrispondente.

I componenti chiave della maggior parte dei protocolli di coltura con ASC sono gli attivatori *Wnt* come il *Wnt3A* o le *R-spondine*.

Infatti, le cellule staminali marcate con *Lgr5*, ossia un particolare recettore per tali tipi di attivatori, appaiono attive nella maggior parte degli epiteli [26].

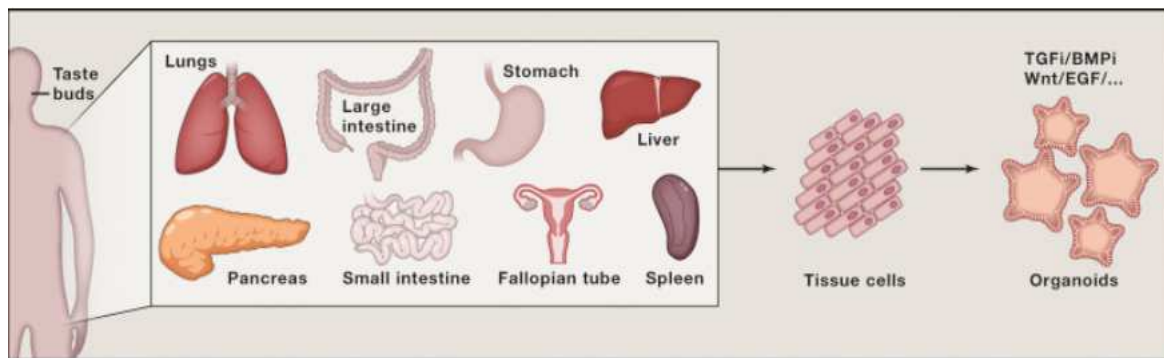


Figura 2.3: Schema delle varie regioni del corpo che possono essere coltivate come organoidi derivati da aSC [22].

Nella figura 2.3 vengono elencate le varie regioni del corpo che hanno il loro corrispettivo mini-organo coltivato attraverso l'utilizzo di colture ASC. Nei capitoli successivi verranno analizzati gli organoidi del pancreas, delle tube di Falloppio e delle ghiandole mammarie.

2.5.1 L'organoide del pancreas

Gli organoidi del pancreas possono essere generati placcando le cellule progenitrici pancreatiche embrionali del topo in una matrice di *Matrigel*. Infatti, *Grompe* e i suoi colleghi nell'indagare l'identità delle cellule epiteliali attraverso l'utilizzo di specifici marcatori di superficie cellulare hanno scoperto che i trascrittomi delle due popolazioni si sovrapponevano ampiamente. Inoltre, le cellule degli organoidi pancreatici avevano la capacità inaspettata di generare delle cellule simili a degli epatociti utilizzati nel trapianto in un modello di danno epatico del topo. Pertanto, queste due popolazioni progenitrici sono legate da una parentela stretta dal punto di vista biologico [1].

2.5.2 L'organoide delle tube di Falloppio

Sulla base del protocollo che ha portato alla formazione dell'organoide gastrointestinale, sono state stabilite delle colture di organoidi 3D stabili a lungo termine delle tube di Falloppio

umane. Le singole cellule staminali epiteliali hanno dato origine a organoidi clonali contenenti sia le cellule ciliate che quelle secretorie, stabilendo così un sistema sperimentale per lo studio dell'epitelio della tuba di Falloppio umana in salute e malattia [22].

2.5.3 L'organoide delle ghiandole mammarie

L'organoide delle ghiandole mammarie rappresenta ancora uno di quei mondi da scoprire in quanto fino ad oggi non sono stati ancora definiti dei protocolli che permettano la creazione di tale mini-organo a lungo termine. Tuttavia, in modo incoraggiante, le cellule epiteliali mammarie umane appena isolate sono state coltivate per due o tre passaggi in gel di collagene in presenza di un inibitore della chinasi per formare dei dotti ramificati con alveoli alle loro punte. I marcatori basali e luminali sono stati espressi nelle posizioni corrette e i condotti hanno mostrato contrattilità tale da concludere che gli organoidi assomigliavano alle unità funzionali della ghiandola mammaria [26].

2.6 Le principali applicazioni degli organoidi

Gli organoidi stanno diventando uno degli strumenti tradizionali di coltura cellulare in molti studi biomedici. L'ampia gamma di tipi di tessuto, la capacità di espansione a lungo termine e l'architettura fisiologica 3D degli organoidi li rendono una nuova potente tecnologia per molte applicazioni biologiche e cliniche.

Gli organoidi vengono ampiamente utilizzati per lo sviluppo e la modellazione delle malattie, la medicina di precisione, gli studi tossicologici e la medicina rigenerativa (figura 2.4).

Di seguito, ci concentriamo sulle applicazioni degli organoidi nella modellazione delle malattie, nel biobanking, nella medicina preventiva e nella medicina rigenerativa [1].

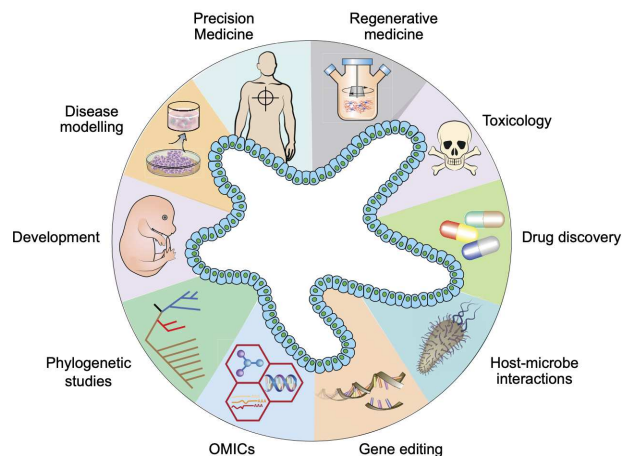


Figura 2.4: applicazioni organoidi [1]

2.6.1 Modellazione di malattie

L'utilizzo degli organoidi in questo ambito è fortemente aumentato e ha ricevuto un incredibile incremento soprattutto nelle ultime decadi, periodo nel quali si sono concretizzati molti degli studi su tale risorsa. I mini-organoidi, infatti, sono stati impiegati con grande successo nella modellizzazione di malattie e batteri come la fibrosi cistica, il virus Zika, *l'Escherichia coli*, *Helicobacter pylori* e molti altri. Numerosi passi avanti, poi, sono stati fatti nella lotta contro il cancro dove l'impiego degli organoidi ha aperto ad un approccio senza precedenti. Gli xenotrapianti derivati dal paziente (PDX), infatti, risultavano molto costosi e richiedono dei tempi molto lunghi. L'utilizzo delle cellule staminali ha permesso, quindi, di creare i primi organoidi che modellizzassero, ad esempio, il tumore al seno, l'adenocarcinoma duttale pancreatico, il cancro al fegato e molti altri, andando a risolvere i limiti elencati in precedenza che nella ricerca scientifica in generale rappresentano sempre dei grandi problemi con cui convivere [1]. Gli organoidi, infine, sono stati applicati con grande successo anche nella lotta contro il Covid19. Il SARS-CoV2, infatti, attacca principalmente le cellule epiteliali del sistema respiratorio e nel tentativo di determinare una cura che fosse efficacemente attiva contro tale virus vennero impiegati degli organoidi polmonari alveolari (ALOs) al fine di modellizzare tale malattia ed ottenere fondamentali risultati [27].

2.6.2 Biobanking e medicina di precisione

La capacità di espansione a lungo termine degli organoidi ha aperto alla possibilità del biobanking degli organoidi derivanti da malattie. Queste biobanche rappresentano risorse preziose per applicazioni cliniche quali l'analisi omica per la stratificazione del cancro e lo screening dei farmaci per la medicina di precisione. Negli ultimi anni sono stati compiuti grandi sforzi per stabilire delle biobanche di organoidi viventi derivate da molti tipi di tumore, in quanto vari studi hanno dimostrato che gli organoidi possono riportare fedelmente le caratteristiche fenotipiche e genomiche dei tumori sia in vitro che in vivo. Gli organoidi offrono poi opportunità uniche anche nel mondo della medicina di precisione, in particolare nello screening e nei test di sicurezza dei farmaci. Il fallimento di molti sviluppi farmacologici negli studi clinici, infatti, potrebbe essere in parte attribuito alla valutazione inadeguata della tossicità del farmaco nella fase di sperimentazione preclinica. L'emergente tecnologia organoide 3D, invece, consente una corretta valutazione della tossicità del farmaco e la possibilità di

determinare le dosi ottimali ed efficaci al fine di uccidere le cellule tumorali con danni minimi al tessuto normale [1].

2.6.3 Medicina rigenerativa

Attualmente, la terapia sostitutiva per organi di tessuti malati o invecchiati si basa in gran parte sul trapianto allogenico. Tuttavia, la carenza di tessuti donatori e le complicazioni dell'immunosoppressione rappresentano alcune delle principali sfide del trapianto di organi. La recente tecnologia organoide, dotata di elevata capacità di espansione e di proprietà geneticamente stabili, potrebbe potenzialmente essere esplorata come strategia di trattamento alternativa al trapianto di organi. Risultati molto promettenti sono già stati registrati nei topi con il primo inserimento di organoidi intestinali, ma il passaggio alla controparte umana resta ancora molto complicato data anche l'imaturità degli studi condotti fino ad oggi [28].

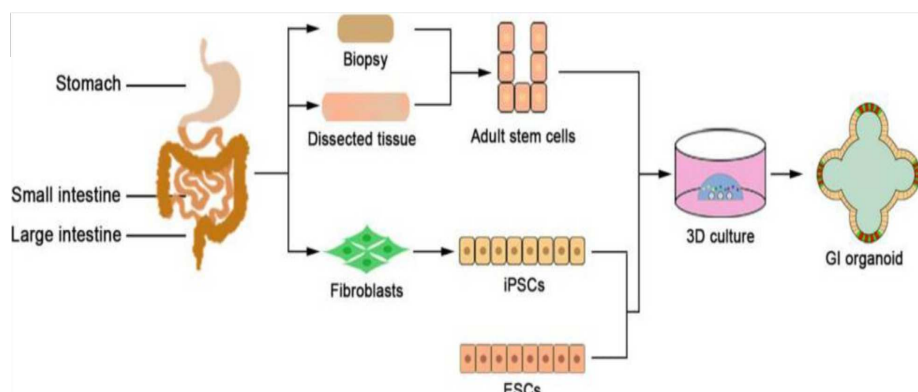
CAPITOLO 3. Gli organoidi gastrointestinale e cerebrale

In questo capitolo verranno trattati approfonditamente gli organoidi gastrointestinale e cerebrale, partendo con i protocolli utilizzati per la loro formazione, passando attraverso le ECM impiegate e terminando, infine, con il loro ruolo nella modellizzazione rispettivamente del cancro al colon e dell'insorgenza dell'Alzheimer.

3.1 L'organoide gastrointestinale

Gli organoidi gastrici e quelli intestinali possono essere generati con successo dal tessuto contenente cellule staminali adulte e da cellule staminali pluripotenti (figura 3.1). I primi mini-organi stabiliti con successo dal tratto gastrointestinale sono gli organoidi colonici. Nei capitoli successivi verranno trattati i protocolli che vengono seguiti per la formazione dell'organoide gastrointestinale a seconda che si parta da una cultura a base di ASC o iPSC [29].

Figura 3.1: Diverse tecniche per ottenere l'organoide gastrointestinale [29].



3.1.1 Organoide gastrointestinale da ASC

Sono stati segnalati vari protocolli per la formazione degli organoidi gastrointestinali, ma in tale sezione viene descritta la procedura generale più utilizzata. Una volta che i campioni sono stati raccolti dal paziente tramite biopsia o tessuto sezionato, questi vengono lavati con HBSS e successivamente isolati dallo strato muscolare superiore e dai tessuti connettivi.

I tessuti digestivi primari vengono tagliati in piccoli pezzi e trattati con 2 mM EDTA per 30 minuti su ghiaccio, provocando la separazione delle cellule epiteliali e degli aggregati cellulari grazie ad una vigorosa sospensione continua. Le singole cellule staminali possono essere ottenute mediante ordinamento FACS e successivamente vengono incorporate in *Matrigel*. In seguito alla solidificazione di quest'ultima, viene aggiunto un mezzo di coltura, il quale viene cambiato ogni tre o cinque giorni. Gli organoidi possono essere ottenuti dopo una settimana circa e sono in grado di mantenere il loro aspetto microscopico e la stabilità del genoma durante la coltura a lungo termine [30].

3.1.2 Matrice Extracellulare e terreno di coltura

L'espansione in vitro dell'organoide richiede una matrice adeguata in grado di creare una struttura 3D ed un terreno di coltura appropriato arricchito con i fattori di nicchia necessari. Attualmente il *Matrigel* è l'impalcatura più utilizzata per simulare la matrice extracellulare nella coltura organoide, ma ne vengono impiegate anche a base di idrogel oppure di estratti di membrana basale o di diversi tipi di collagene. Il *Matrigel*, inoltre, è arricchito anche con numerose proteine quali il collagene, la laminina, i proteoglicani di eparan solfato e altre.

Con l'integrazione del mezzo di coltura appropriato e dei fattori di crescita, le cellule staminali incorporate in *Matrigel* possono subire un continuo auto-rinnovamento e differenziazione [31]. Tutti i terreni di coltura contengono principalmente il EGF, l'antagonista BMP *Noggin* e un agonista *Wnt R-spondin1*. La segnalazione *Wnt*, infatti, è cruciale sia per l'omeostasi dell'epitelio che per la rigenerazione dei tessuti nel tratto gastrointestinale e, pertanto, *R-spondin1* e *Wnt3a* sono inclusi in tutti i mezzi di espansione di tali organoidi ai fini di aumentare l'attività di segnalazione *Wnt* per promuovere la crescita dell'organoide stesso [32].

Altri fattori di crescita si sono poi dimostrati fondamentali per il mantenimento dei mini-organismi gastrointestinali. Il FGF10, ad esempio, è essenziale per la generazione di organoidi gastrici, coerentemente con le sue funzioni di promozione della proliferazione cellulare e di inibizione della differenziazione. La nicotinammide, poi, promuove l'efficienza nella formazione degli

organoidi del colon. I recettori TGF- β /*Activin* e l'inibitore *p38*, infine, migliorano significativamente l'efficienza di placatura e aumentano sinergicamente il numero di passaggi degli organoidi del colon [33]. A seguito di studi più recenti l'EGF, la nicotinammide e l'inibitore *p38* sono stati sostituiti con IGF-1 e FGF-2 e ciò ha permesso di ottenere risultati migliori circa gli aspetti dell'efficienza della coltura e del mantenimento della capacità di multi-differenziazione a lungo termine degli organoidi [34].

3.1.3 *Organoide gastrointestinale da iPSC*

Il processo principale di formazione dell'organoide da iPSC normalmente include l'induzione dello stato germinale, la successiva formazione degli sferoidi specifici per il tessuto e la finale caratterizzazione dell'organoide nella tipologia cercata. Così come il sistema digestivo si sviluppa dall'endoderma anche l'organoide gastrointestinale trae le sue caratteristiche fondamentali dal modello dell'endoderma [29]. La differenziazione in questo stato è ottenuta mediante il trattamento con attivina A per tre giorni consecutivi con concentrazioni crescenti di siero bovino fetale. Successivamente, le cellule sono coltivate in un mezzo contenente il 2% di siero bovino fetale nel quale sono disciolti i principali fattori come i *Wnt3a*, i FGF4 e i *Noggin*. Terminato dopo 2-4 giorni tale trattamento, si formano degli sferoidi 3D galleggianti, i quali vengono inseriti nel *Matrigel* e sovrapposti al corrispondente mezzo di coltura definito per gli organoidi gastrointestinali adulti derivati da cellule staminali. Avviene, quindi, uno sviluppo graduale degli sferoidi che risulta essere simile a quello intestinale a livello fetale.

Una volta terminato tale processo si formano gli organoidi gastrointestinali.

Questi sono dotati di una notevole complessità e di strutture e funzioni molto simili alle controparti in vivo. Ritroviamo, infine, la presenza di un epitelio complesso con una architettura ghiandolare ben definita e un buon numero di cellule mesenchimali circostanti [35].

3.1.4 *Metodo aria-liquido*

Il vantaggio dell'approccio aria-liquido è la capacità di eseguire degli studi fisiologicamente rilevanti in condizioni pressoché controllate, dovute dal fatto che tale metodo permette una migliore ossigenazione in vitro durante la formazione dell'organoide gastrointestinale.

Il primo utilizzo di tale protocollo risale alla coltura di cellule nasali umani con la finale produzione di cellule ciliate [29]. Tale procedimento è stato, poi, perfezionato per il nostro organoide in esame grazie all'utilizzo di un doppio piatto; uno interno con un fondo di

membrana permeabile, rivestito di collagene e sovrapposto a piccoli triti intestinali incorporati nel collagene stesso ed uno esterno nel quale viene inserito il mezzo di coltura.

Lo strato cellulare viene, quindi, facilmente esposto all'aria in quanto il livello del mezzo nel piatto esterno è inferiore allo strato di gel cellulare presente. In pochi giorni gli agglomerati intestinali 3D vengono prodotti con un monostrato epiteliale polarizzato contenente vari tipi di cellule intestinali. È stato osservato che la produzione di organoidi tramite questa tecnica permette di ottenere una maggiore clonogenicità cellulare tale da favorire la creazione di un epitelio intestinale complesso con strutture simili a villi [36].

Seguendo uno dei due procedimenti, quindi, riusciamo ad ottenere un organoide gastrointestinale (figura 3.2) utilizzabile in tutte le applicazioni viste nei capitoli precedenti. Qui di seguito verrà trattato un suo impiego fondamentale ossia quello della modellizzazione del cancro al colon.

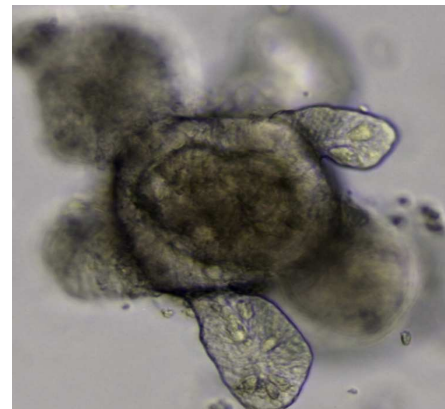


Figura 3.2: immagine di organoide gastrointestinale [48]

3.2 Modellizzazione del cancro al colon

Il cancro è la seconda causa di morte in tutto il mondo e i tumori gastrici e del colon-retto sono estremamente comuni. In passato, la maggior parte degli studi sulla carcinogenesi si basava su linee cellulari tumorali e modelli animali, ma queste non riuscivano a riprodurre fedelmente l'ambiente multicellulare di formazione del cancro [29].

Tale limite venne colmato dagli organoidi e, infatti, non appena venne sviluppato il metodo di coltura per i mini-organi gastrointestinali le prime colture di tumori colon rettali, gastrici e del fegato divennero realtà. In particolare, utilizzando la tecnologia CRISPR/Cas9 al fine di indirizzare i geni del cancro del colon-retto più comunemente mutati, si sono ottenuti degli organoidi gastrointestinali in grado di imitare le prime fasi della formazione del cancro [37].

I risultati ottenuti sono estremamente incoraggianti in quanto il tasso di successo di questi mini-organi è notevolmente più elevato rispetto all'impiego di linee cellulari tumorali primarie o di modelli di xenotrapianto derivato dal paziente (PDX).

Gli organoidi ottenuti dalle metastasi del cancro del colon-retto, infine, conservano anche la diversità genetica come le metastasi originali [38].

3.2.1 Organoidi gastrointestinali e la chemioterapia

In questo capitolo andiamo ad indagare la risposta degli organoidi gastrointestinali al trattamento con i farmaci chemioterapici convenzionali con la finalità di osservare se effettivamente questi mini-organoidi risultino dei modelli attendibili nella lotta contro il cancro.

I pazienti trattati con i chemioterapici convenzionali rispondono in vari gradi anche a seconda del loro grado di regressione istologica. Ebbene per indagare se gli organoidi riflettono queste risposte, le linee cellulari sono state trattate con i farmaci chemioterapici utilizzati normalmente nel trattamento del cancro al colon. Questi sono principalmente il fluorouracile (5-FU), l'irinotecan ed il epirubicin. I risultati ottenuti su diversi organoidi gastrointestinali hanno evidenziato che la vitalità delle cellule si attestava intorno al 64%, salvo poi scendere verso il 61,7% dopo un secondo trattamento con 1 μ M di 5-FU. In media, quindi, solo il 30% delle cellule non è stato influenzato dalla cura che è perfettamente in linea con i dati ottenuti in precedenza [39].

Per convalidare tale tesi sono stati, poi, condotti degli studi su colture 2D ottenendo dei risultati altrettanto positivi in quanto la resistenza ai farmaci irinotecan ed epirubicin era nettamente inferiore rispetto ai più verosimili valori ottenuti con gli organoidi gastrointestinali.

In conclusione, quindi, i mini-organoidi sono senza dubbio la migliore tecnologia ad oggi conosciuta per compiere dei test in vitro in quanto riescono a ricapitolare abbastanza fedelmente la complessità del corpo umano. Non bisogna, però, dimenticare che sebbene siano estremamente affidabili, comunque, le migliori risposte si ottengono sempre dai test in vivo che per il momento sono di difficile sostituzione [39].

3.3 L'organoide cerebrale.

Le metodologie per indurre la differenziazione neurale dalle iPSC sono state perseguite già dai primi anni '90, ma non tutti i sistemi di coltura neurale 3D sono considerati come organoidi.

Le neurosfere, ad esempio, benché siano delle aggregazioni 3D di diversi tipi di cellule del sistema nervoso centrale derivate dalle cellule progenitrici neurale, si differenziano notevolmente dai nostri mini-organoidi in quanto non sfruttano la capacità di auto-organizzazione delle iPSC per imitare la citoarchitettura e le traiettorie di sviluppo trovate in vivo [40].

In generale, quindi, si possono utilizzare due diversi tipi di metodologie per generare organoidi cerebrali: i metodi non guidati e i metodi guidati (figura 3.3). Mentre i metodi non guidati si basano completamente sulla morfogenesi spontanea e sulle capacità di differenziazione

intrinseca all'interno degli aggregati hPSC, i metodi organoidi guidati richiedono l'integrazione di fattori di *pattern* esterni per indurre gli hPSC a differenziarsi verso i lignaggi desiderati. Il numero e la combinazione di fattori esterni utilizzati nei protocolli di differenziazione possono variare e, conseguentemente, la scelta tra approcci non guidati e guidati è spesso vista come un compromesso tra diversità e coerenza [41].

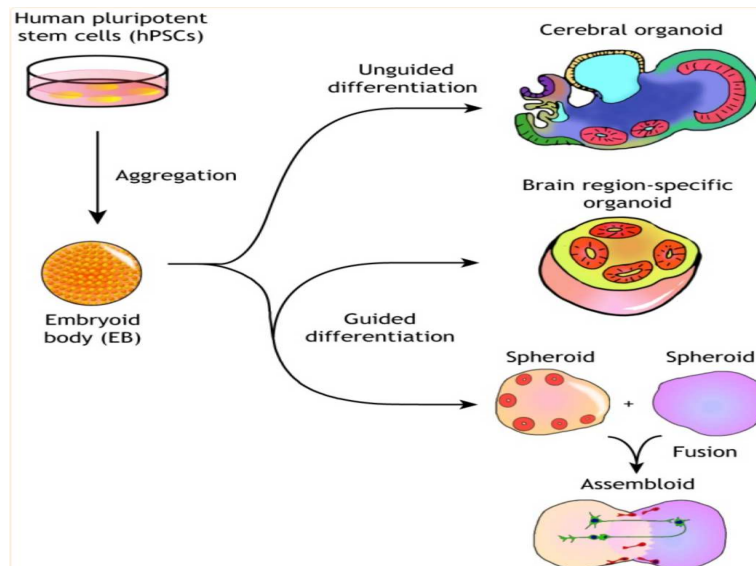


Figura 3.3: Approcci non guidati e guidati per ottenere organoidi cerebrali [41].

Esiste, infine, un ultimo metodo che è un caso particolare degli approcci guidati, il quale prevede la generazione di due o più sferoidi/organoidi, rappresentativi di diverse parti del cervello, la cui fusione permette di ottenere un “assembloide” in grado di modellare le interazioni tra le diverse regioni del cervello [41].

3.3.1 I Metodi non guidati.

Il protocollo sviluppato si basa sulla enorme capacità di auto-organizzazione delle cellule staminali pluripotenti e, pertanto, non vede l’impiego di fattori di crescita modellanti, ma fonda completamente la sua attenzione sul miglioramento della crescita cellulare e sulla creazione di un ambiente che favorisca i segnali intrinseci per influenzare lo sviluppo della linea cellulare. Nei primi sei giorni le cellule staminali vengono coltivate in sospensione con basse quantità di bFGF con la finalità di ottenere dei corpi embrionali (EBs). Successivamente questi vengono impiegati per la generazione del neuroectoderma. I tessuti neuroectodermici sono, poi, mantenuti in coltura 3D ed incorporati in goccioline di *Matrigel* col fine di fornire un’impalcatura per la crescita dei tessuti più complessi [42].

Successivamente, queste goccioline di *Matrigel* vengono trasferite ad un bioreattore rotante per migliorare l'assorbimento dei nutrienti (figura 3.4a). Tale metodo ha portato al rapido sviluppo dei tessuti cerebrali richiedendo solo 8-10 giorni per la comparsa dell'identità neurale e 20-30 giorni per la formazione di regioni cerebrali definite. Gli organoidi cerebrali nelle prime fasi (15-20 giorni) hanno permesso la formazione di un neuroepitelio di grandi dimensioni circondato da una cavità piena di liquido come mostrato nella figura 3.4b. Tali dimensioni ottenute risultavano nettamente superiori e continue a quelle trovate con un approccio classico o stazionario.

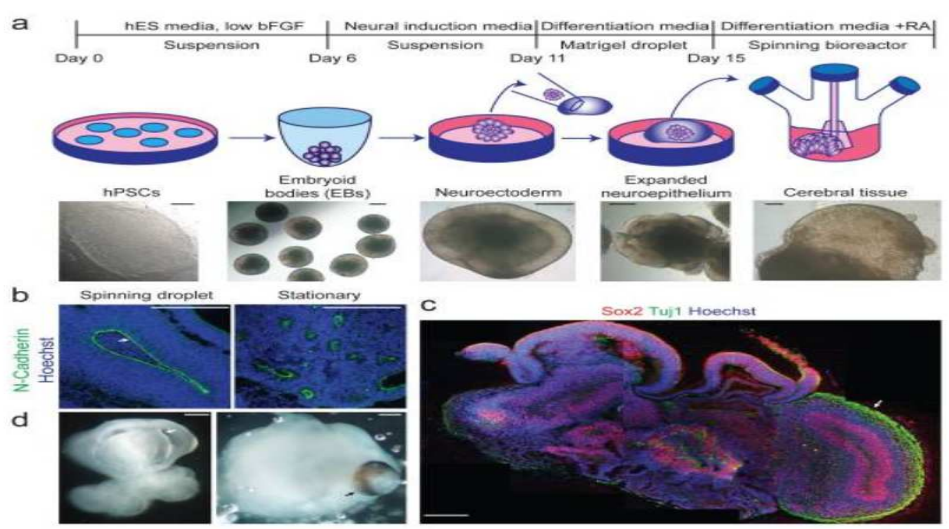


Figura 3.4: Descrizione del sistema di coltura organoide cerebrale [40].

Sebbene i tessuti abbiano raggiunto la dimensione massima nel giro di due mesi, gli organoidi cerebrali ottenuti presentavano una estensione molto elevata e dei tessuti eterogenei complessi che garantiscono al mini-organo una vita a lungo termine di circa dieci mesi se mantenuti in un bioreattore rotante [43]. Nella figura 3.4c, infine, viene immortalato l'organoide nella sua fase adulta dove possiamo notare uno sviluppo lungo l'esterno delle regioni cerebrali e una morte cellulare estesa vicino al nucleo di questi tessuti.

3.3.2 I Metodi guidati.

I metodi guidati sono una serie di protocolli che permettono di creare degli organoidi specifici della zona cerebrale. L'approccio precedente, infatti, seppur molto semplice da applicare e con risultati molto incoraggianti ci portava ad ottenere delle linee cellulari miste di difficile comprensione se impiegati in studi specifici.

In questo metodo gli organoidi vengono guidati da piccole molecole e precisi fattori di crescita, che, impiegati durante tutto il processo di differenziazione, permettono una istruzione completa

delle hPSC nella formazione di cellule e tessuti di alcune regioni specifiche del cervello come la corteccia o l'ippocampo. Queste colture, inoltre, sono anche in grado di generare delle miscele di tipi di cellule con delle proporzioni che sono coerenti con quelle in vivo mostrando minori variazioni tra lotti e linee cellulari. Gli organoidi diretti, tuttavia, contengono tipicamente delle strutture neuroepiteliali relativamente piccole e la loro citoarchitettura a volte non è ben definita. Di norma questi limiti sono dovuti da delle interferenze nel processo di auto-organizzazione delle hPSC e dall'uso eccessivo di fattori esterni che causa una elevata interazione cellula-cellula.

Interessante, infine, è l'utilizzo di alcuni biomateriali specifici per guidare fisicamente la formazione diretta degli organoidi cerebrali. Il caso più studiato è quello dell'impiego di microfilamenti polimerici che fungono da impalcatura per le linee cellulari, permettendo loro di formarsi attorno a questi con la conseguente formazione più coerente di strutture neuroepiteliali [41].

3.3.3 I metodi di fusione.

I metodi precedentemente elencati permettono di ottenere degli organoidi che assomigliano a varie regioni cerebrali con delle proporzioni e organizzazioni spaziali che sono altamente eterogenee e imprevedibili. Al fine di migliorare la modellazione delle interazioni interregionali sono stati creati nuovi protocolli che prevedono una iniziale differenziazione delle hPSC in organoidi specifici della regione del cervello ed una successiva loro fusione per ottenere mini-organi con identità regionali distinte e controllate [41].

L'esempio principale è quello della formazione di un "assembloide" ottenuto dalla fusione di organoidi del proencefalo dorsale e ventrale. Questo, infatti, è dotato di caratteristiche che si avvicinano molto di più alle condizioni in vivo di quelle ottenute con i precedenti modelli.

Nel complesso, questi recenti progressi nelle metodologie hanno ampliato le nostre possibilità nella modellizzazione dello sviluppo umano e dei disturbi ad esso collegati e la scelta tra questi dipende unicamente dall'obiettivo specifico dell'indagine. Gli organoidi non guidati, ad esempio, sono adatti per esplorare la diversità cellulare durante lo sviluppo dell'intero cervello, mentre quelli guidati riescono a ricapitolare meglio la citoarchitettura cerebrale con meno eterogeneità. Gli assembloidi, infine, consentono lo studio delle interazioni tra specifiche regioni del cervello con una caratterizzazione molecolare e funzionale più coerente [40].

3.3.4 Alzheimer e organoidi cerebrali.

La malattia di Alzheimer (AD) è una malattia neurodegenerativa progressiva senza cura, caratterizzata da placche beta ($A\beta$) amiloide extracellulari, grovigli di proteine tau (p -Tau) associate ai microtubuli fosforilati intracellulari. I principali sintomi sono inizialmente quelli della perdita di memoria seguiti da una progressiva incapacità di provvedere ai bisogni naturali della persona.

L'AD può essere classificato in AD familiare (fAD) e AD sporadico (sAD) e si ritiene che oltre 50 milioni di persone siano affette da una delle due forme. Per il momento purtroppo non esistono cure a tale malattia e i possibili motivi di questi continui fallimenti nel tentativo di trovare un farmaco affidabile sono da ricercarsi nell'intervento tardivo e nella incompleta comprensione della complessa fisiopatologia dell'AD [44]. La tecnologia delle iPSC ha trasformato i campi della biologia e della medicina rigenerativa. Le cellule staminali pluripotenti indotte dall'uomo (hiPSC) sono state utilizzate per modellare una grande varietà di malattie umane a causa della loro origine umana, della loro facile accessibilità e della capacità di dare origine a tipi di cellule rilevanti per la malattia.

La stessa cosa è stata compiuta anche per l'Alzheimer solo che l'eziologia di questa patologia è molto complessa e rimane ancora in gran parte poco chiara. La modellizzazione dell'AD, pertanto, è di difficile realizzazione ma i primi studi prevedono l'utilizzo di organoidi cerebrali ottenuti dalle iPSC esposti al siero al fine di imitare l'esposizione sierica derivante dalla rottura della barriera ematoencefalica (BBB) osservata nell'invecchiamento del cervello umano [45]. I risultati ottenuti sono stati strabilianti in quanto non solo è stato scoperto che gli organoidi cerebrali esposti al siero erano in grado di ricapitolare più aspetti dell'AD, ma, addirittura, che tale esposizione era la causa di una ridotta funzione sinaptica sia nei neuroni che negli astrociti, inducendo inoltre la risposta immunitaria in questi.

È stato, quindi, possibile concludere che l'esposizione sierica potrebbe indurre dei livelli elevati di $A\beta$ e p -Tau ma l'eventuale bloccaggio della produzione di questi non potrebbe comunque salvare la perdita sinaptica in quanto questi due fattori potrebbero non essere correlati e che la causa di ciò sia solo l'esposizione sierica stessa.

Tale tecnica, infine, presenta comunque numerosi limiti come, ad esempio, la mancanza di flusso sanguigno che impedisce una modellizzazione degli effetti derivanti dall'esposizione sierica in seguito alla rottura della barriera ematoencefalica (BBB) [45].

CAPITOLO 4. Prospettive future e conclusioni.

Degli organoidi umani si intravedono delle promettenti applicazioni in svariati campi che vanno dalla ricerca di base alla biomedicina. Grazie alla loro abilità di modellizzazione delle malattie, ad esempio, sono stati affiancati ai test preclinici nella fase di sviluppo dei farmaci e sono, inoltre, stati impiegati come screening dei farmaci nelle ricerche più recenti sul cancro.

Più recentemente, se ne è avuto un largo utilizzo nello studio di virus estremamente letali come lo ZIKV ed il COVID-19, con lo scopo di osservare e capire l'evoluzione della malattia nei vari tessuti per potenzialmente assemblare un farmaco o un vaccino in grado di fermarne la diffusione e la proliferazione nel corpo umano [46].

Gli organoidi stanno inoltre emergendo anche come potenziali fonti di tessuti trapiantabili e come tipologie di cellule funzionali per le terapie di sostituzione cellulare nella medicina rigenerativa. È stato infatti dimostrato che questi mini-organismi sono in grado di integrarsi efficacemente con il tessuto ospite e di ricostruire gradualmente la funzione dell'organo danneggiato. Sebbene tali applicazioni siano estremamente varie ed offrano degli approcci innovativi nel mondo della ricerca biomedica e, più in generale, scientifica ci sono ancora diversi ostacoli che devono essere affrontati.

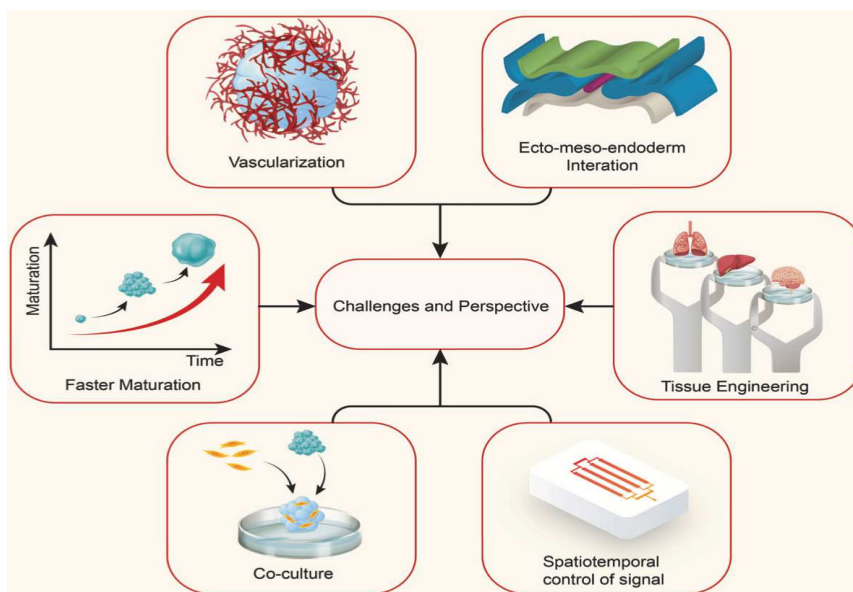


Figura 4.1: sfide e prospettive degli organoidi [46].

In primo luogo, le colture organoidi dipendono da estratti di membrana basale e da matrici extracellulari, come ad esempio il *Matrigel* che deriva direttamente dal topo. Il problema risiede nel fatto che i primi, a causa della produzione in lotti, hanno mostrato delle variazioni nelle dosi delle loro componenti che ha influenzato la replicabilità dei risultati sperimentali; mentre i secondi, data la provenienza animale, possono ostacolare il trapianto clinico diretto a causa dei

loro agenti patogeni sconosciuti e delle potenziali risposte immunitarie che potrebbero suscitare. Una possibile soluzione a tali problematiche potrebbe essere l'impiego di terreni di coltura con collagene di grado clinico al posto del *Matrigel* [47].

Nella figura 4.1 possiamo notare schematizzate le principali sfide e prospettive degli organoidi e, ciò che si evince, è che un altro fattore che limita l'uso dei mini-organici è l'incapacità di modellare le patologie multiorgano.

I metodi della co-coltura potrebbero affrontare e risolvere questa problematica, come già accaduto in alcuni studi recenti dove si sono combinati degli organoidi intestinali derivati da hPSC e cellule della cresta neurale. La migliore strada, però, sembra essere quella che porta agli *organ-on-chip* i quali permettono la creazione di sistemi 3D che consentono la connessione e la comunicazione tra più mini-organi nello stesso esperimento. Un altro grande limite è poi il tempo di maturazione, che ha portato all'ottimizzazione di diversi protocolli grazie all'aggiunta di un pretrattamento con composti formati da piccole molecole, come il BDNF261, al fine di accelerare la crescita cellulare [46].

La coltura a lungo termine è inoltre condizionata da altri due fattori ossia l'ossigenazione e la diffusione dei nutrienti, il cui miglioramento prevede, rispettivamente, l'utilizzo di bioreattori rotanti che migliorano la vitalità di tutti i tipi cellulari e l'impiego di un secondo trattamento con *Matrigel* che promuove la crescita degli organoidi sulla base di una efficiente distribuzione dei nutrienti. In questo campo, inoltre, un grande aiuto lo potrebbe dare anche l'incorporazione di biomateriali e di nanotecnologie che potrebbero migliorare ed incrementare la coltura a lungo termine degli organoidi [47].

Affrontando queste sfide, pertanto, è prevedibile che possa emergere un modello 3D relativamente accurato e riproducibile, in grado di favorire la transizione della tecnologia organoide dalla ricerca scientifica alla pratica clinica accelerando, dunque, la produzione di organoidi su larga scala per lo screening dei farmaci.

Per concludere, sebbene le applicazioni più ampie siano ancora nella fase iniziale dell'esplorazione, le tecnologie organoidi hanno già dato prova della loro utilità ai fini della ricerca biomedica, dello screening dei farmaci nella medicina individualizzata e della terapia genica. La continua evoluzione della ricerca consentirà quindi, in futuro, di rafforzare gli studi di base e clinici grazie alla capacità dei sistemi organoidi 3D di ricostruire i sistemi in vivo [46].

Bibliografia

- [1] C. Corrà, L. Novellademunt e X. V. S. Li, «A brief history of organoids,» *Am J Physiol Cell Physiol*, n. 319, pp. C151-C165, 2020.
- [2] B. P. Lucey, Nelson-Rees, W. A., Hutchins e G. M., «Henrietta Lacks, HeLa Cells, and Cell Culture Contamination,» *Arch Pathol Lab Med*, vol. 133, pp. 1463-1467, 2009.
- [3] K. Duval, H. Grover, L.-H. Han, Y. Mou, A. F. Pegoraro, J. Fredberg e Z. Chen, «Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture,» *Physiology*, vol. 32, pp. 266-277, 2017.
- [4] A. Cacciamali, R. Villa e Dotti, «3D Cell Cultures: Evolution of an Ancient Tool for New Applications,» *Frontiers in Physiology*, vol. 13, n. articolo 836480, pp. 1-15, 2022.
- [5] M. R. Lewis, «The Importance of Dextrose in the Medium of Tissue Cultures,» *J. Exp. Med.*, vol. 35, n. 3, pp. 317-322, 1922.
- [6] P. Bédard, S. Gauvin, K. Ferland, C. Caneparo, È. Pellerin e S. Chabaud, «Innovative Human Three-Dimensional Tissue-Engineered Models as an Alternative to Animal Testing,» *Bioengineering*, vol. 7, n. 3, p. 115, 2020.
- [7] R. Edmondson, J. J. Broglie, A. F. Adcock e L. Yang, «Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors,» *ASSAY and Drug Development Technologies*, vol. 12, n. 4, pp. 207-215, 2014.
- [8] G. Bassi, Grimaudo, M.A., S. Panseri e M. Montesi, «Advanced Multi-Dimensional Cellular Models as Emerging Reality to Reproduce In Vitro the Human Body Complexity,» *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, n. 1195, pp. 1-28, 2021.
- [9] D. Huh, G. A. Hamilton e D. E. Ingber, «From 3D Cell Culture to Organs-On-Chips,» *Trends Cell. Biol.*, vol. 21, n. 12, p. 745–754, 2011.
- [10] R. M e G.-H. U, «Synthetic 3D multicellular systems for drug development,» *Curr Opin Biotechnol*, vol. 23, p. 803–809., 2012.
- [11] A. D. Theocharis, S. S. Skandalis, C. Gialeli e N. K. Karamanos, «Extracellular matrix structure,» *Advanced drug delivery reviews*, vol. 97, pp. 4-27., 2016.
- [12] L. D, S. KS, L. MP, H. DW, C. JA e R. SC, «Bioengineered 3D platform to explore cell–ECM interactions and drug resistance of epithelial ovarian cancer cells,» *Biomaterials*, vol. 31, p. 8494–8506, 2010.

- [13] L. E. Knudsen, A. Smith, E. Törnqvist, A. Forsby e H. Tähti, «Nordic Symposium on "toxicology and Pharmacology without Animal Experiments- Will it Be Possible in the Next 10 Years?»,» *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 124, n. 5, p. 560–567, 2019.
- [14] H. Clevers, «Modeling Development and Disease with Organoids.,» *Cell*, vol. 165, n. 7, p. 1586–1597, 2016.
- [15] M. Steinberg, «The problem of adhesive selectivity in cellular interactions,» *Cellular Membranes in Development, edited by Locke M.*, vol. New York and London: Academic Press, 1964.
- [16] K. Takahashi e S. Yamanaka, «Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors,» *Cell*, vol. 126, pp. 663–676,, 2006.
- [17] T. Sato, R. Vries, H. Snippert, M. van de Wetering, N. Barker, D. Stange, J. van Es, A. Abo, P. Kujala, P. Peters e H. Clevers, «Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche.,» *Nature* , vol. 459, p. 262–265, 2009.
- [18] Z. Wojciech, D. Maciej, S. Maria e R. Zbigniew, «Stem cells: past, present, and future,» *Zakrzewski et al. Stem Cell Research & Therapy*, vol. 10, n. 68, pp. 1-22, 2019.
- [19] A. Quinlan, M. Boland e M. Leibowitz, «Genome sequencing of mouse induced pluripotent stem cells reveals retroelement stability and infrequent DNA rearrangement during reprogramming.,» *Cell Stem Cell*, vol. 9, n. 4, p. 366–373, 2011.
- [20] A. Hilfiker, C. Kasper, R. Hass e A. Haverich, «Mesenchymal stem cells and progenitor cells in connective tissue engineering and regenerative medicine: is there a future for transplantation?,» *Langenbecks Arch Surg.* , vol. 396, n. 4, p. 89–97, 2011.
- [21] K. Jihoon, K. Bon-Kyoung e K. Juergen A., «Human organoids: model systems for human biology and medicine,» *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 21, n. 10, p. 571–584. , 2020.
- [22] C. Hans, «Modeling Development and Disease with Organoids,» *Cell*, vol. 165, n. 7, pp. 1586-1597, 2016.
- [23] T. Longmire, L. Ikonomidou, F. Hawkins, C. Christodoulou, Y. Cao, J. Jean, L. Kwok, H. Mou, J. Rajagopal e S. Shen, «Efficient derivation of purified lung and thyroid progenitors from embryonic stem cells.,» *Cell Stem Cell.* , vol. 10, pp. 398-411, 2012.
- [24] M. Takasato, P. Er, H. Chiu, B. Maier, G. Baillie, C. Ferguson, R. Parton, E. Wolvetang, M. Roost, S. Chuva de Sousa Lopes e M. Little, «Kidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis.,» *Nature.* , vol. 526, n. 5, pp. 564-568, 2015.

- [25] K. N. A. Muguruma, H. Kawakami, K. Hashimoto e Y. Sasai, «Self-organization of polarized cerebellar tissue in 3D culture of human pluripotent stem cells,» *Cell Rep*, vol. 10, pp. 537-550, 2015.
- [26] R. Najdi, K. Proffitt, S. Sprowl, S. Kaur, J. Yu, T. M. Covey, D. M. Virshup e M. L. Waterman, «A uniform human Wnt expression library reveals a shared secretory pathway and unique signaling activities.,» *Differentiation* , vol. 84, pp. 203-213, 2012.
- [27] H. Yuling, Y. Liuliu, L. Lauretta A e C. Shuibing, «Human organoid models to study SARS-CoV-2 infection,» *Nature Methods*, vol. 19, pp. 418-428, 2022.
- [28] R. Fordham, S. Yui, N. Hannan, C. Soendergaard, A. Madgwick, P. Schweiger, O. Nielsen, L. Vallier, R. Pedersen, T. Nakamura, M. Watanabe e K. Jensen, «Transplantation of expanded fetal intestinal progenitors contributes to colon regeneration after injury.,» *Cell Stem Cell*, vol. 13, pp. 734-744, 2013.
- [29] Z. Mengxian, L. Yuan e C. Ye-Guang, «Generation of 3D human gastrointestinal organoids: principle and applications,» *Cell Regen.*, vol. 9, n. 6, pp. 1-13, 2020.
- [30] N. Bertaux-Skeirik, J. Centeno, J. Gao, J. Gabre e Y. Zavros, «Oncogenic transformation of human-derived gastric Organoids.,» *Methods Mol Biol*, vol. 1576, p. 205–213, 2019.
- [31] C. Hughes, L. Postovit e G. Lajoie, «Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture.,» *Proteomics.*, vol. 10, p. 1886–1890, 2010.
- [32] J. Van Camp, S. Beckers, D. Zegers e W. Van Hul, «Wnt signaling and the control of human stem cell fate.,» *Stem Cell Rev.*, vol. 10, p. 207–229, 2014.
- [33] B. Jung, J. Staudacher e D. Beauchamp, «Transforming growth factor beta superfamily signaling in development of colorectal Cancer.,» *Gastroenterology.*, vol. 152, p. 36–52, 2017.
- [34] M. Fujii, M. Matano, K. Toshimitsu, A. Takano, Y. Mikami, S. Nishikori, S. Sugimoto e T. Sato, «Human intestinal Organoids maintain self-renewal capacity and cellular diversity in niche-inspired culture condition.,» *Cell Stem Cell.*, vol. 23, p. 786–793 , 2018.
- [35] K. McCracken, E. Cata, C. Crawford, K. Sinagoga, M. Schumacher, B. Rockich, Y. Tsai, C. Mayhew, J. Spence e Y. Zavros, «Modelling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids.,» *Nature.* , vol. 516, p. 400–404, 2014;.
- [36] X. Wang, Y. Yamamoto, L. Wilson, T. Zhang, B. Howitt, M. Farrow, F. Kern, G. Ning, Y. Hong e C. Khor, «Cloning and variation of ground state intestinal stem cells.,» *Nature*, vol. 522, p. 173–178, 2015.

- [37] J. Drost, R. van Jaarsveld, B. Ponsioen, C. Zimmerlin, R. van Boxtel, A. Buijs, N. Sachs, R. Overmeer, G. Offerhaus e H. Begthel, «Sequential cancer mutations in cultured human intestinal stem cells.,» *Nature.* , vol. 521, p. 43–47, 2015.
- [38] F. Weeber, M. van de Wetering, M. Hoogstraat, K. Dijkstra, O. Krijgsman, T. Kuilman, C. Gadellaa-van Hooijdonk, D. van der Velden, D. Peeper e E. Cuppen, «Preserved genetic diversity in organoids cultured from biopsies of human colorectal cancer metastases.,» *Proc Natl Acad Sci U S A.* , vol. 112, p. 13308–13311, 2015.
- [39] T. Seidlitz, S. Merker, A. Rothe, F. Zakrzewski, C. von Neubeck, K. Grützmann, U. Sommer, C. Schweitzer, S. Schölch, H. Uhlemann, A. Gaebler, K. Werner, M. Krause, G. Baretton, T. Welsch, B. Koo, D. Aust, B. Klink, J. Weitz e D. Stange, «Human gastric cancer modelling using organoids.,» *Gut*, vol. 68, n. 2, p. 207–217, 2019.
- [40] M. Lancaster, M. Renner, C. Martin, D. Wenzel, L. Bicknell, M. Hurles, T. Homfray, J. Penninger, A. Jackson e J. Knoblich, «Cerebral organoids model human brain development and microcephaly.,» *Nature.*, vol. 501, n. 7467, pp. 373-379, 2013.
- [41] X. Qian, H. Song e G. Ming, «Brain organoids: advances, applications and challenges.,» *Development.* , vol. 146, n. 8, 2019..
- [42] X. Xia e S.-C. Zhang, «Differentiation of neuroepithelia from human embryonic stem cells.,» *Methods Mol Biol.* , vol. 549, p. 51–58, 2009.
- [43] M. Eiraku, «Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals.,» *Cell Stem Cell.*, vol. 3, p. 519–532., 2008.
- [44] J. Gaugler, B. James, T. Johnson, A. Marin e J. Weuve, «Alzheimers Dementia.,» *Assoc A. s.*, vol. 15, n. 3, pp. 321-387, 2019.
- [45] X. Chen, G. Sun, E. Tian, M. Zhang, H. Davtyan, T. Beach, E. Reiman, M. Blurton-Jones, D. Holtzman e Y. Shi, «Modeling Sporadic Alzheimer's Disease in Human Brain Organoids under Serum Exposure.,» *Adv Sci (Weinh).* , vol. 18, pp. 1-16, 2021.
- [46] S. W. Xiao-Yan Tang¹, W. Da, C. Chu, H. Yuan, T. Mengdan, H. Hao, X. Min, G. Xing e L. Yan, «Human organoids in basic research and clinical applications.,» *Springer Nature*, vol. 7, n. 168, pp. 1-13, 2022.
- [47] S. Yui, «Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5+ stem cell.,» *Nat. Med.*, vol. 18, p. 618–623, 2012.