

**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE
CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

***“MODELLI DI ORGANOIDI CEREBRALI COME BASE DI STUDIO
PER LE MALATTIE NEURODEGENERATIVE”***

Relatore:

PROF. GIANFRANCO SANTOVITO

Laureando:

FEDERICO MARESCA

Matricola: **1226993**

ANNO ACCADEMICO 2021-2022

Data di laurea: 22-09-2022

Indice

1. Introduzione	5
2. Cellule staminali	6
2.1. Definizione e caratteristiche delle cellule staminali	6
2.2. Sviluppo dell'organismo	7
2.3. Classificazioni	9
2.3.1 Classificazione in base alla potenzialità	9
2.3.2 Classificazione in base all'origine	11
2.4 Riprogrammazione cellulare	13
3. Gli organoidi	16
3.1. Cellule staminali nella medicina rigenerativa	16
3.2 Organoidi	16
3.2.1 Breve storia del loro sviluppo	17
3.2.2 Caratteristiche principali	18
3.3 Il contributo della bioingegneria	22
3.3.1 Controllo della differenziazione cellulare	22
3.4 Nicchia ingegnerizzata	23
3.5 <i>Scaffold</i> biomimetico	24
3.5.1 <i>Scaffold</i> artificiali	26
3.5.2 Rigidezza	27
3.5.3 Viscoelasticità	28
3.6 Monitoraggio componenti della nicchia in vitro	29
3.7 Breve panoramica delle strategie della bioingegneria	30
4. Gli organoidi cerebrali	31
4.1 Evoluzione nello sviluppo di modelli del sistema nervoso	32
4.2 Biomateriali negli organoidi cerebrali	34
4.3 Organoidi come modello di studio per le malattie neurodegenerative	36
4.3.1 Malattia di Alzheimer	36

4.3.2 Morbo di Parkinson	38
4.3.3 Corea di Huntington	38
5. Conclusione	40
6. Bibliografia	41

1.Introduzione

L'intento di questa breve trattazione è quello di fornire una panoramica sulla potenzialità dell'utilizzo delle cellule staminali come strumento per l'interpretazione e cura delle malattie neurodegenerative. Ci si soffermerà in particolare sugli organoidi che, per le loro proprietà e complessità, si presentano come un affascinante settore della ricerca scientifica in continua evoluzione e innovazione.

Nella prima parte verranno presentate le caratteristiche generali delle cellule staminali e le loro classificazioni, delineando in maniera più approfondita le hPSCs e le iPSC. Grazie a quest'ultime, infatti, si possono ottenere gli organoidi che saranno la tematica principale della seconda parte insieme alla delineazione delle strategie bioingegneristiche che possono essere usate per garantire la formazione di modelli sempre più fedeli alla rappresentazione in vivo. In ultima analisi, si presenteranno gli organoidi cerebrali e si confronteranno alcune prospettive future sul loro utilizzo per lo studio di particolari malattie neurodegenerative.

L'approfondimento su questi argomenti è dettato dalla volontà di mostrare la trasversalità della tematica che spazia tra le più diverse discipline, rivelando come è intrinseca la necessità di un approccio sinergico per ovviare alle problematiche che, se affrontate individualmente da ogni settore, permetterebbero di raggiungere solo parzialmente gli obiettivi preposti.

2. Cellule staminali

2.1. Definizione e caratteristiche delle cellule staminali

Le cellule staminali possono essere definite come una popolazione di cellule indifferenziate caratterizzate dalla capacità di proliferare ampiamente; di auto-rinnovarsi (*self-renewal*); di formarsi a partire da una singola unità (*clonality*) e di differenziarsi in vari tipi cellulari, ognuno con peculiari proprietà, producendo una progenie funzionale (*potency*) [1].

Proprio da questa definizione si evincono le principali caratteristiche che le contraddistinguono:

- ~ *Auto-rinnovamento*: è definita come la proprietà per la quale le cellule sono in grado di riprodurre sé stesse. Infatti, dalla divisione mitotica si generano due cellule figlie, ma solo una di esse intraprende il percorso di differenziamento (che può avvenire più o meno velocemente). L'altra cellula figlia, appunto, rimane staminale.

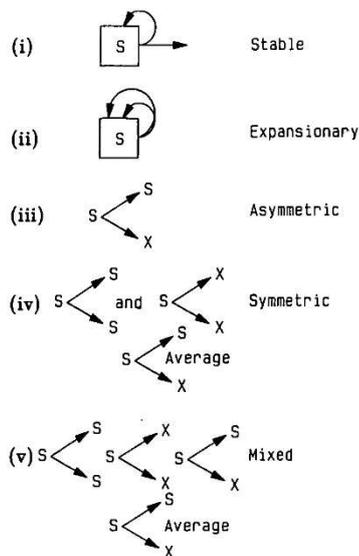


Figura 2.1 Possibilità di divisione mitotica

La divisione mitotica è, infatti, di norma regolarmente asimmetrica: la cellula madre presenta in un solo polo del suo citoplasma dei particolari fattori che vengono ereditati da una sola delle due cellule figlie, presentando poi il medesimo fenotipo di quella materna. Tuttavia, esistono alcune eccezioni (Figura 2.1), a questa canonica divisione, che principalmente possono essere causate da problematiche intrinseche alla cellula oppure dalle particolari condizioni climatiche in cui essa si viene a trovare.

Vi è, dunque, un controllo sia genetico che ambientale.

- ~ *Differenziamento*: è inteso come il processo mediante cui una singola cellula non specializzata origina una progenie, comprendente differenti tipi cellulari con specifiche caratteristiche (Figura 2.2). Ciò si esplica in un cambio qualitativo del fenotipo cellulare in conseguenza dell'inizio della sintesi di nuovi prodotti genici, che grazie a una loro diversa modalità di espressione andranno ad assumere un ruolo funzionale (ad esempio a causa di un cambio della morfologia cellulare o dell'attività enzimatica o della composizione proteica).

Il processo di differenziamento e, quindi, di specializzazione delle staminali è fortemente influenzato sia da fattori esterni, come il contatto tra cellule o le secrezioni chimiche dai tessuti circostanti, che dai segnali interni, come il controllo genico.

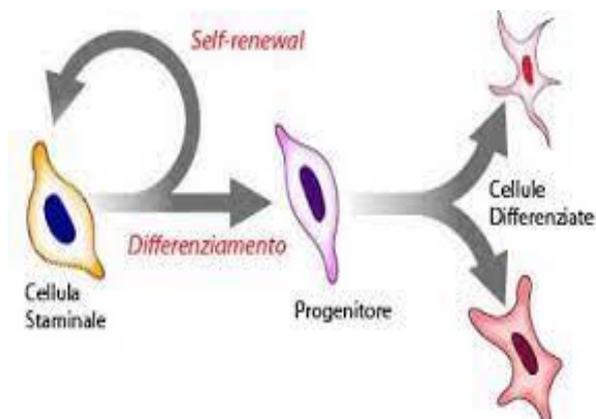


Figura 2.2 La staminale è in grado sia di generare una progenie con medesimo potenziale di quella di partenza che differenziarsi in cellule mature.

~ *Frequenza replicativa*: le cellule staminali sono in grado di replicarsi durante tutto il ciclo vitale e per questo si dicono “senza limite”. Il ritmo replicativo decresce all’avanzare dell’età (senescenza replicativa) a causa dell’accorciamento dei telomeri. La loro divisione è ponderata, lenta e dipendente da ciò che succede nel contesto tissutale della cellula (ad esempio se vi è una lesione, le cellule staminali devono essere indotte alla divisione). Per questi motivi la frequenza replicativa si considera tessuto-specifica [2].

Si può fornire, inoltre, un’ulteriore definizione di queste cellule su base funzionale: una staminale si può considerare come tale quando, per l’intera durata della vita dell’organismo, è in grado di generare le diverse componenti cellulari del tessuto in cui si trova [3].

2.2. Sviluppo dell’organismo

I principali e più immediati esempi di staminali sono quelli presenti nell’embrione, nel feto e negli stadi adulti dello sviluppo che permettono, grazie alla loro differenziazione, la formazione degli organi e tessuti.

Subito dopo la nascita e nelle successive fasi di vita, le cellule staminali tessuto-specifiche si trovano negli organi e sono uno strumento necessario nel processo di riparazione a seguito di un danno.

È curioso notare come l'idea della riparazione autonoma del corpo e dei tessuti in seguito a lesioni, ma anche la rigenerazione di organi ha accompagnato l'intera umanità. Infatti, si può scovare nell'antica Grecia il mito di Prometeo: questo, titano simbolo per eccellenza della ribellione e del contrasto verso le logiche autoritarie precostituite, viene punito da Zeus reo dell'aver introdotto il fuoco e aver portato la conoscenza all'essere umano. Prometeo per espiare la colpa viene legato a una roccia e un'aquila ogni giorno gli mangia parte del fegato che, costantemente, si rigenera [1].

A parte questo curioso aneddoto, col passare degli anni si è riusciti a delineare sempre più dettagliatamente e a classificare le staminali secondo più categorie. Una di queste è proprio la loro distinzione in base all'apparizione temporale durante lo sviluppo dell'organismo (Figura 2.3).

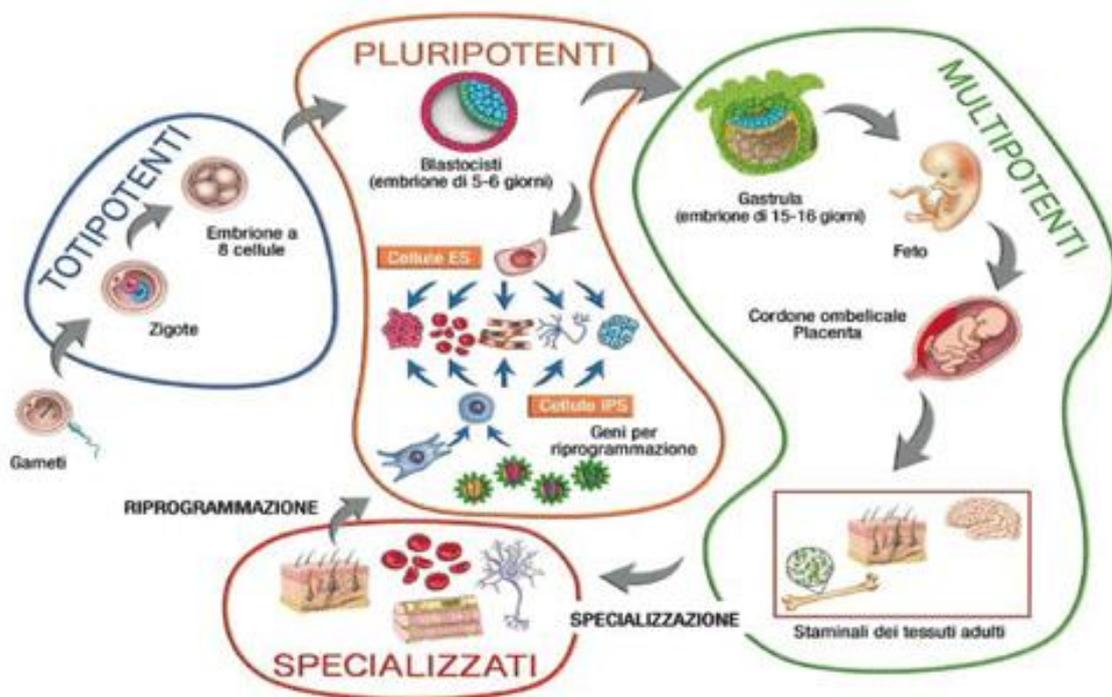


Figura 2.3 Tipologia staminali presenti durante le varie fasi dello sviluppo dell'organismo

Il processo inizia quando, una volta avvenuta la fecondazione, si va incontro alla formazione dello zigote: ovvero la cellula diploide da cui origina il completo sviluppo dell'essere umano. Ciò avviene grazie a una successione di divisioni mitotiche che, però, non provoca un accrescimento (*cleavage*). La caratteristica peculiare dello zigote è la totipotenza, ovvero la capacità di poter diventare qualsiasi cellula differenziata dell'organismo. Questo stato viene mantenuto fino a quando la massa è composta da 8 cellule, mentre la successiva divisione mitotica porta alla conversione in morula, le cui singole cellule prendono il nome di blastomeri. Questo processo di scissione, associato a fenomeni di migrazione cellulare, porta alla genesi

della blastocisti, dalla cui massa interna è possibile isolare in vitro cellule con caratteristiche di pluripotenza. Infatti, si distingue uno strato marginale nominato trofoblasto, da cui si svilupperanno gli annessi embrionali, e un polo embrionale, ovvero una massa cellulare pluripotente. In seguito, la blastocisti si impianta nell'utero materno e procede con lo sviluppo andando incontro alla formazione della gastrula, in cui si delineano i tre foglietti germinativi: questi sono i precursori da cui si originano tutti i tessuti e si sviluppano gli organi [4].

Nel proseguire di queste divisioni mitotiche e processi fisiologici si ha quindi un progressivo restringimento della potenza di differenziazione.

Infine, sempre con l'avanzamento dello sviluppo dell'organismo, si possono trovare le cellule staminali nei tessuti ai vari stadi dello sviluppo del feto, nel sangue cordonale, nei tessuti post-natali e adulti [3].

2.3. Classificazioni

Differentiation potential	Origin
Totipotent or omnipotent	
Pluripotent	ESCs, iPSCs
Multipotent	Fetal stem cells
Oligopotent	Adult or somatic stem cells
Unipotent	

Tabella 2.1 Classificazione cellule staminali in base alla loro potenzialità di differenziazione e alla loro origine.

2.3.1 Classificazione in base alla potenzialità

L'abilità di differenziamento è una delle più importanti caratteristiche delle cellule staminali e, come si è sopra accennato, varia a seconda della loro origine e della loro derivazione. Infatti, il principio con cui possono essere racchiuse in una classificazione è proprio quello della loro potenzialità di differenziamento e, più precisamente, possono essere raggruppate nei seguenti 5 gruppi (Tabella 2.1).

Cellule totipotenti

La totipotenza, o onnipotenza, è la capacità di dare origine a ogni tipo cellulare, incluso l'intero feto e la placenta. Le cellule dotate di questa caratteristica sono le più indifferenziate e hanno, quindi, capacità illimitate potendo formare l'intero essere umano, inclusi gli annessi embrionali.

Nello sviluppo temporale, questa tipologia si trova nelle primissime fasi post fecondazione, ovvero nello zigote e, anche, dopo le iniziali divisioni mitotiche fino a quando l'embrione si trova nello stadio in cui è costituito da 8 cellule.

La totipotenza, quindi, è la massima potenzialità di differenziazione; proprio per questo, la sfida ancora adesso apertissima nel campo della ricerca è il riuscire a replicare in vitro le condizioni che permettano alla cellula di mantenerla [1][3][5].

Cellule pluripotenti

La pluripotenza è la capacità di formare i derivati di tutti i tre foglietti germinativi (ectoderma, mesoderma e endoderma), ma non dell'intero organismo. Tuttavia, anche questa potenzialità di differenziamento risulta essere molto elevata in quanto, infatti, si possono generare le staminali tessuto-specifiche e le tipologie di cellule funzionalmente mature che da esse derivano (si stima siano circa 200), ad eccezione di quelle presenti nei tessuti extra-embryonali.

Si possono distinguere due tipologie principali: le cellule embrionali staminali (hESCs), che sono derivate dalla massa cellulare interna della blastocisti, e le cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs), che sono state generate dalla riprogrammazione delle cellule somatiche e condividono simili proprietà con le hESCs [1][3][5].

Cellule multipotenti

La multipotenza è la capacità di dare origine a un range limitato di cellule. Queste si trovano nella maggior parte dei tessuti e si differenziano a partire da un singolo foglietto germinativo. Sono, quindi, le cellule adulte e tessuto-specifiche presenti nei diversi tessuti del feto e dell'organismo adulto.

Le cellule staminali mesenchimali (MSCs) sono le più riconosciute e possono derivare da diversi tessuti come il midollo osseo, il tessuto adiposo, il tessuto osseo, il sangue. Queste hanno la potenzialità di differenziare nel derivato tessuto del mesoderma come il tessuto adiposo, l'osso, la cartilagine e il muscolo.

Tuttavia, grazie ad alcuni lavori scientifici si è riusciti a differenziare una MSCs in un tessuto neuronale, che è un derivato dell'ectoderma. Questo fenomeno, dove una cellula proveniente da un foglietto germinativo riesce a differenziarsi in uno differente, è chiamato trans-differenziamento, che si oppone alle canoniche leggi dello sviluppo embrionale [6].

Bisogna sottolineare come le cellule staminali adulte (del sangue, della pelle, del muscolo, del sistema nervoso...), nonostante vengano raggruppate in un'unica tipologia, comprendono categorie ben distinte dovute alle differenti caratteristiche, possibilità di isolamento ed espansione, potenzialità differenziativa e potenziali impieghi terapeutici [3].

Cellule oligopotenti

L'oligopotenza è la capacità di essere in grado di auto-rinnovarsi e formare due o più tipologie cellulari (*lineages*) all'interno di uno specifico tessuto. Un esempio è rappresentato dalle cellule staminali ematopoietiche che possono differenziare nella *lineage* mieloide o nella linfoide [1].

Cellule unipotenti

L'unipotenza è la capacità di replicarsi ripetutamente e di differenziarsi in un solo specifico tipo cellulare formando una singola *lineage*, così come le cellule del muscolo danno vita a quelle del muscolo maturo e non ad altre tipologie [1].

2.3.2 Classificazione in base all'origine

Un'ulteriore classificazione e categorizzazione delle cellule staminali può essere effettuata in base alla loro origine (Tabella 2.1).

Cellule staminali embrionali

Le hESCs sono per natura pluripotenti e provengono dalla massa cellulare interna della blastocisti, uno stadio di preimpianto dell'embrione, 5-6 giorni dopo la fecondazione. Queste cellule possono differenziarsi in un tessuto dei tre foglietti germinativi diventando cellule staminali pluripotenti, oppure possono mantenersi in una condizione di indifferenziazione per un lungo periodo in coltura.

La blastocisti è contraddistinta dalla presenza di uno strato che compone la massa cellulare interna (ICM), responsabile della genesi dell'embrione, e dal trofoblasto, ovvero una massa di cellule esterne da cui si dipartirà la formazione della placenta. Per lo sviluppo delle hESCs, la ICM viene separata dalla porzione esterna e trasferita in coltura in particolari condizioni. Queste cellule sono identificate dalla presenza dei fattori di trascrizione Nanog e Oct4 che le mantengono in uno stato indifferenziato, capaci di auto-rinnovarsi.

In vitro, le hESCs si differenziano spontaneamente in terreni di coltura ad alta densità oppure, quando le condizioni sono sub-ottime, producono una varietà di tipologie di cellule differenziate. L'interesse verso queste staminali deriva proprio dal fatto che hanno la potenzialità di dare origine a tutti i tipi cellulari del corpo umano, ad eccezione dei derivati extraembrionali. Si è, inoltre, visto come le hESCs possano causare teratomi, ovvero tumori benigni contenenti un vario numero di staminali (alcune altamente differenziate, altre solo

parzialmente, provenienti dai foglietti germinativi, altre indifferenziate), a testimonianza del loro multiforme potenziale differenziativo [1][7].

Cellule staminali adulte o somatiche

Come già suggerisce il nome, queste cellule derivano dai tessuti adulti, sono indifferenziate oligopotenti e si trovano su tutto il corpo umano dopo lo sviluppo. Le loro principali funzioni sono di permettere la guarigione, crescita e la sostituzione delle cellule che ogni giorno ogni organismo perde. Diversi studi hanno proprio dimostrato che il trapianto di cellule adulte ristabilisce il danno degli organi in vivo, come il riparo del tessuto osseo e la rivascularizzazione a seguito di un'ischemia cardiaca, grazie al loro differenziamento e la generazione di cellule specializzate. Tuttavia, vista la loro potenzialità, possono dare origine a un ristretto range di tipologie cellulari diverse [1][7].

Per esempio, dalle cellule neuronali possono originarsi i neuroni e i corrispettivi supporti, ovvero oligodendrociti e astrociti.

Ovviamente l'abbondanza delle cellule adulte è molto differente nei vari tessuti in quanto dipende dalla capacità e necessità rigenerativa che ognuno di essi richiede. Infatti, mentre le staminali del sangue, per soddisfare il fabbisogno di ricambio cellulare, producono giornalmente miliardi di eritrociti, piastrine e leucociti, le staminali del tessuto nervoso sono, invece, di numero esiguo e poco attive [3].

L'attenzione crescente verso queste cellule somatiche è dovuta a una loro maggiore accessibilità, alla capacità in vitro di mantenere un alto potenziale differenziativo e, soprattutto, dalla possibilità di poterle riprogrammare a cellule pluripotenti.

Cellule staminali tessuto residenti

L'abilità di alcuni tessuti e negli organi adulti di ripristinare e riparare i danni è fortemente dipendente dalle cellule staminali tessuto-residenti che generano specifici tessuti che, a loro volta, differenziano in peculiari cellule. Dagli studi si rileva che queste cellule si sono originate durante l'ontogenesi e rimangono in uno stato di quiescenza fino a quando uno stimolo locale attiva la loro proliferazione, differenziazione o migrazione [1].

Le staminali risiedono in una nicchia, ovvero un ambiente ricco di nutrienti che controlla il loro differenziamento e auto-rinnovamento. C'è una notevole evidenza di come questo microambiente tramite fattori estrinseci influenza la funzione di tali cellule. Come già detto la maggior parte di questa tipologia cellulare sono quiescenti e vengono attivate da specifici segnali in situazioni di danno e riparo. Anche questo stato di quiescenza è influenzato dalla nicchia, nonostante il meccanismo non sia ancora ben noto.

Cellule staminali fetali

Sono cellule multipotenti e adulte che sono presenti nei tessuti già specializzati. Temporalmente si collocano tra le cellule embrionali e quelle somatiche. Hanno proprietà simili a quelle adulte, però sono più plastiche e quindi hanno un potenziale terapeutico maggiore [7].

Cellule staminali pluripotenti indotte

Nonostante la pluripotenza possa essere riscontrata nelle cellule staminali dell'embrione, le iPSCs sono prodotte a partire dalle cellule somatiche adulte dopo essere state geneticamente riprogrammate fino ad assumere una potenzialità come quella delle hESCs.

2.4 Riprogrammazione cellulare

Una delle maggiori rivoluzioni nell'utilizzo e nello studio delle cellule staminali ha avuto luogo in Giappone, nel 2006, con l'uscita del lavoro scientifico di Shinya Yamanaka. In particolare, il ricercatore era riuscito a riprogrammare le cellule somatiche adulte inducendole a diventare cellule staminali pluripotenti nuovamente, in uno stadio simile a quello delle hESCs e denominandole cellule pluripotenti indotte (iPSCs).

La riprogrammazione consiste nel processo che porta una cellula staminale a manifestare un fenotipo cellulare diverso da quello previsto. Yamanaka riuscì ad utilizzare questa tecnica grazie alla messa appunto, dopo 6 anni di lavoro, di 4 fattori di staminalità: Oct3/4, Sox2, Klf4 e c-Myc [1]. Se quest'ultimi, infatti, vengono veicolati, tramite l'utilizzo di vettori retrovirali (adesso si usano anche altre metodologie più sicure), all'interno di cellule somatiche adulte, queste possono ritornare ad uno stadio embrionale. Le cellule in coltura faranno così emergere una colonia di pluripotenti indotte (IPS) che verranno successivamente coinvolte in un processo di differenziamento endodermico o mesodermico o ectodermico a seconda delle esigenze del paziente (Figura 2.4).

Queste cellule, infatti, sono molto simili alle hESCs per la morfologia, la proliferazione, gli antigeni sulla superficie, l'espressione genica, lo stato epigenetico dei geni specifici per le staminali pluripotenti, l'attività telomerasica e la possibilità di differenziarsi in tutti e tre i foglietti germinativi in vitro.

I vettori retrovirali, usati per introdurre i fattori di riprogrammazione nelle cellule adulte, e gli oncogeni, come il c-Myc, limitano l'utilizzo delle iPSCs negli studi clinici in quanto i mezzi

utilizzati per la loro veicolazione possono causare lo sviluppo di cellule cancerogene. Le nuove tecniche, che si stanno sempre più delineando e sviluppando, hanno l'obiettivo comune di generare delle sicure iPSCs senza compiere una manipolazione genomica [8].

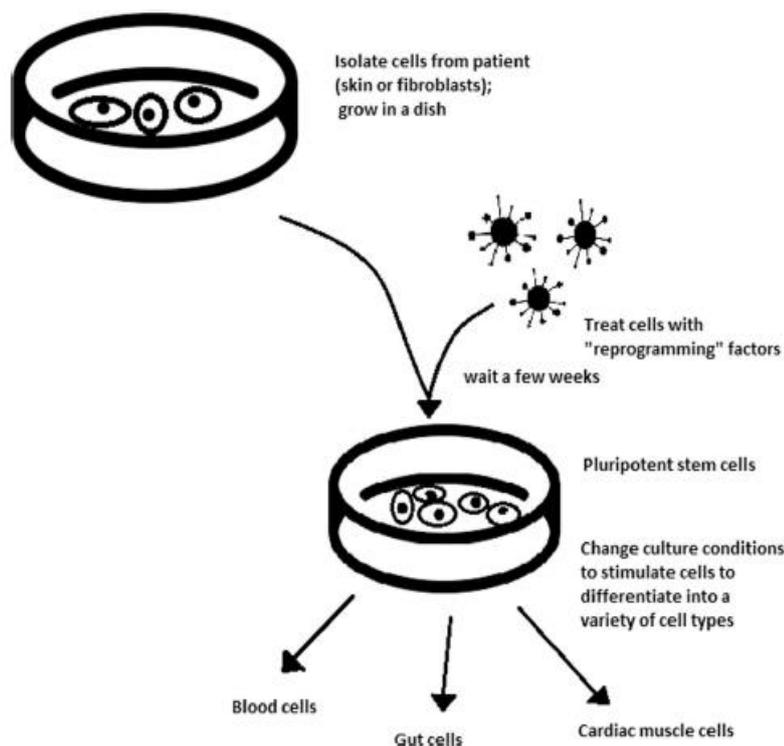


Figura 2.4 Processo riprogrammazione cellulare

La scoperta delle iPSCs ha aperto enormi prospettive per il loro utilizzo nello studio delle malattie ed in ambito clinico. Esse associano la pluripotenza e la potenzialità differenziativa delle cellule hESCs al fatto di poter essere ottenibili dall'individuo stesso. Quindi permetterebbero lo sviluppo di terapie cellulari personalizzate basate sull'impianto di cellule iPSCs ottenute dai propri fibroblasti e successivamente istruite a generare i sottotipi di cellule specializzate di interesse; inoltre, proprio la peculiarità di essere autologhe, evitano ogni rischio di rigetto immunitario.

Sicuramente la riprogrammazione cellulare ha aperto enormi nuovi spiragli nella ricerca scientifica in questo settore. Anche dal punto di vista etico. Le iPSCs bypassano la necessità di utilizzo degli embrioni per ricavare, appunto, cellule pluripotenti. Inoltre, le staminali indotte sembrano mantenere molte delle caratteristiche delle staminali embrionali, inclusa la potenzialità differenziativa, anche se ormai si è concordi che non corrispondano esattamente. Infatti, si è visto come le cellule adulte di partenza mantengono una certa memoria epigenetica e quando riprogrammate predispongono le cellule a differenziare in modo preferenziale ad alcuni elementi cellulari. Uno svantaggio è, proprio, rappresentato dalla difficoltà di caratterizzazione fenotipica, in quanto risulta molto difficile capire quando una cellula è

effettivamente diventata staminale indotta e, in aggiunta, vi è la possibilità che possano nascondere una pericolosa attività proliferativa tale da trasformarsi in cellule tumorali.

Infine, dando una panoramica anche sullo stato attuale e sullo sviluppo della ricerca scientifica in questo settore, recenti studi hanno mostrato come si può implementare la strategia della riprogrammazione attraverso una conversione diretta di una tipologia cellulare in un'altra mediante l'introduzione di geni specifici. In questo modo, ad esempio, è possibile convertire una cellula cutanea in una cellula nervosa senza la necessità di uno stadio di pluripotenza intermedia.

3. Gli organoidi

3.1. Cellule staminali nella medicina rigenerativa

L'utilizzo delle cellule staminali nella medicina moderna è di vitale importanza sia per il contributo che forniscono nella ricerca di base sia per le opportunità che garantiscono per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche cliniche. Il loro più grande potenziale è il ripristino dei tessuti danneggiati e anche la rigenerazione degli organi. Infatti, le hESCs e le iPSCs sono dei perfetti strumenti per la comprensione dello sviluppo umano e della organogenesi; inoltre, possono essere un modello per lo studio dei meccanismi patogenetici e contribuiscono ad assistere al progressivo delineamento delle principali cause delle varie malattie. Ormai, grazie alla terapia cellulare, si sta investigando su ogni tipologia di patologia, soprattutto per merito delle iPSCs che hanno, come già detto in precedenza, permesso il superamento delle controversie etiche riguardo l'utilizzo delle hESCs, che portavano la conseguente distruzione dell'embrione [9].

In questo capitolo, appunto, verrà trattata una modalità che sta fornendo dei modelli biologici utili alla comprensione e delineazione delle principali cause delle malattie ancora adesso meno note e garantiscono la base di studio per l'utilizzo sperimentale di nuovi farmaci per future terapie: si tratta degli organoidi.

3.2 Organoidi

Gli organoidi sono un cluster cellulare 3D in vitro, derivanti dalle iPSCs o dalle hESCs, che spontaneamente si auto-organizzano spazialmente e differenziano in cellule funzionali in modo da replicare un corrispettivo organo in vivo. Questi modelli permettono di riepilogare l'eterogeneità cellulare, la struttura e le funzioni dell'organismo umano, a partire da processi molecolari [10].

Proprio dovuto a questo aspetto, sono usati come strumento di ricerca trasversale per la medicina rigenerativa, la scoperta di nuovi farmaci e la medicina di precisione.

3.2.1 Breve storia del loro sviluppo

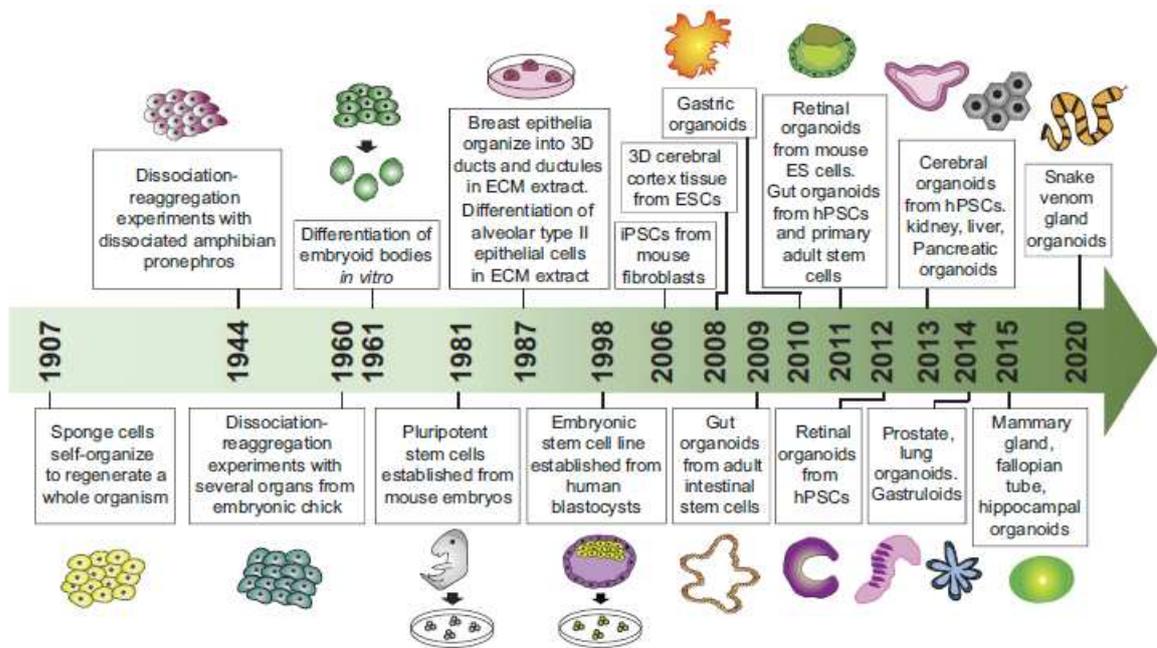


Figure 3.1 Cronistoria sviluppo organoidi

Il 1907 può essere considerata come la data che segna l'inizio nel processo di scoperta e di sviluppo degli organoidi. In quell'anno, Henry Van Peters Wilson descrisse il primo tentativo di rigenerazione di un organo in vitro, nel quale riuscì a dimostrare che delle cellule definite come 'spugnose' potevano arrangiarsi autonomamente per la formazione dell'intero organismo. Nelle successive decadi ci furono diversi gruppi di ricerca che concentrarono la sperimentazione sulla dissociazione e riaggregazione cellulare per la generazione di diversi organi a partire da embrioni di pollo e pronefroni di anfi.

Nel 1964, Malcolm Steinberg introdusse per primo l'ipotesi dell'adesione differenziale (DAH), teorizzando che la ricombinazione cellulare potesse essere spiegata attraverso la termodinamica, mediata dalla differente adesione sulle superfici.

La prima volta in cui venne isolata una cellula staminale pluripotente fu nel 1981, quando a partire dall'embrione di un topo si riuscì nell'intento. La vera svolta può essere posta nell'anno 1988 (Figura 3.1); infatti, Thompson et al. riuscirono a isolare e coltivare una staminale embrionale derivata da una blastocisti umana. Ovviamente, quando tramite la riprogrammazione si riuscirono ad ottenere le iPSCs ci fu un ulteriore e deciso impatto nel settore della ricerca sugli organoidi e sulle staminali stesse.

Un altro aspetto determinante per lo sviluppo degli organoidi fu il miglioramento delle condizioni delle colture cellulari, ottenuto simulando in maniera sempre più accurata il microambiente presente in vivo. Infatti, nel 1987 Li et al. dimostrarono che l'epitelio del seno

può formare i condotti e il lume 3D quando vengono fatti crescere nella matrice ECM, dove sono in grado di sintetizzare e secretare la proteina del latte, a differenza di quanto accade in una coltura 2D. Questo testimonia l'importanza del legame cellula-matrice per il mantenimento e differenziazione dei tessuti.

Nel 2008 Sasai et al. generarono il tessuto della corteccia cerebrale 3D da cellule pluripotenti e, l'anno successivo, Clevers et al. riuscirono ad ottenere organoidi di intestino da staminali intestinali pluripotenti umane. Questo fu il primo esempio di coltura cellulare 3D ottenuta a partire da una singola cellula adulta, che lasciò la scena all'avvento e produzione di altre di vari tipi.

Ad esempio, nel 2013 si riuscirono proprio a generare organoidi cerebrali da cellule staminali pluripotenti cresciute in Matrigel [10][11].

3.2.2 Caratteristiche principali

Il corpo umano può essere considerato come la somma di un gran numero e una grande varietà di materiali cellulari e non-cellulari organizzati in maniera altamente specifica (come cellule, tessuti, organi), così come l'intero interattoma che include interne (cellula-cellula, cellula-matrice) ed esterne (cellula-ambiente) interazioni.

Per ricapitolare e spiegare la fisiologia umana si possono e sono stati utilizzati diversi modelli:

- ~ *Modelli animali*: l'utilizzo di modelli animali per spiegare la fisiologia umana in vivo presenta dei limiti dovuti all'accessibilità del campione in osservazione, la presenza di variabili confondenti, la difficile usabilità e le differenze biologiche che sussistono con l'essere umano.
- ~ *Colture cellulari 2D*: il semplicistico modello di *scaffold 2D* permette di isolare cellule

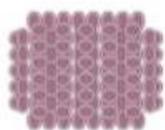


Figura 3.2 Coltura 2D

staminali dal tessuto e disporle ordinatamente utilizzando approcci densità-gradiente dipendenti. Queste risultano facili da realizzare e richiedono anche un basso costo.

Tuttavia, spesso mancano delle interazioni cellula-cellula e cellula-matrice che sono richieste per mantenere e definire il fenotipo in situ; comportano la perdita del pathway del segnale e, quindi, anche della sua rappresentazione funzionale; contribuiscono alla perdita dell'architettura specifica del tessuto e della stabilità genetica; infine, risulta difficoltoso il loro mantenimento, provocando di conseguenza un'alta mortalità cellulare.

~ *Sferoidi*: è la prima tipologia di rappresentazione 3D che è stata usata per lo studio in



Figura 3.3 Sferoide

vitro di tipologie neoplasiche. Il suo utilizzo per colture uni e multi-cellulari è risultato efficiente per ottimizzare e superare le limitazioni convenzionali dei sistemi in vitro. Garantisce la presenza di contatti cellula-cellula, però non riuscendo a permettere una diffusione adeguata di ossigeno e

nutrienti. Inoltre, altri limiti di questo modello sono l'accumulo frequente sia di cataboliti che tossine nella zona centrale dello sferoide e la comparsa di tessuto necrotico e/o ipossico per modelli con diametri superiori ai 400-500 μ m.

~ *Organoidi*: rappresentano un'evoluzione modellistica rispetto agli sferoidi. Grazie



Figura 3.4 Organoide

all'integrazione tra l'approccio biologico e ingegneristico, si è riuscito a generare un sistema capace: di presentare interazioni cellula-cellula e cellula matrice; di garantire stabilità genetica e un'organizzazione architettonica in grado di mantenere la funzione dell'organo; di controllare la nicchia manipolandola per rispondere alle varie esigenze; di permettere la

crioconservazione e, soprattutto, di riprodurre il contesto dell'organo in vivo.

Tuttavia, ovviamente, si riscontrano anche degli svantaggi dovuti principalmente alla tempistica elevata, alla difficoltà di realizzazione che si coniuga con l'assenza di protocolli procedurali unificati.

Gli organoidi, come precedentemente affermato, possono essere originati sia dalle staminali pluripotenti che da quelle adulte, replicando i fenomeni fisici e biochimici alla base dello sviluppo dei tessuti e dell'omeostasi.

La loro formazione è permessa dalla capacità delle cellule di riorganizzazione e segregazione per la formazione di strutture con proprietà di istogenesi analoghe a quelle in vivo.

Infatti, per la costituzione di organismi pluricellulari è richiesta la loro aggregazione in masse, tramite un riconoscimento reciproco e la capacità di instaurare interazioni stabili attraverso processi che mirano al raggiungimento di una configurazione termodinamicamente stabile (Figura 3.5).

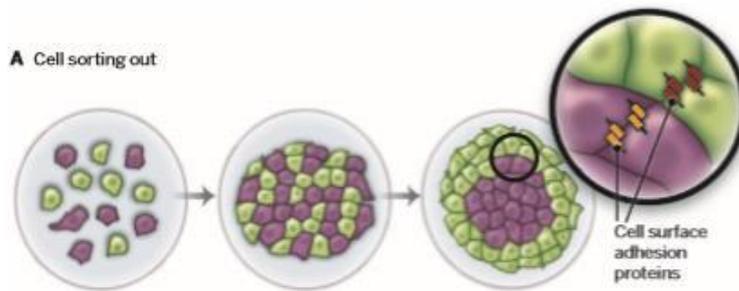


Figura 3.5 Meccanismo di adesione cellulare verso la configurazione termodinamica più stabile

Inoltre, i limiti spaziali del tessuto e la loro orientazione permettono alle cellule figlie, dopo essersi differenziate da quelle progenitrici, di posizionarsi superficialmente per promuovere la loro differenziazione attraverso un meccanismo definito di ‘stratificazione iterativo’ (Figura 3.6).

B Spatially restricted lineage commitment

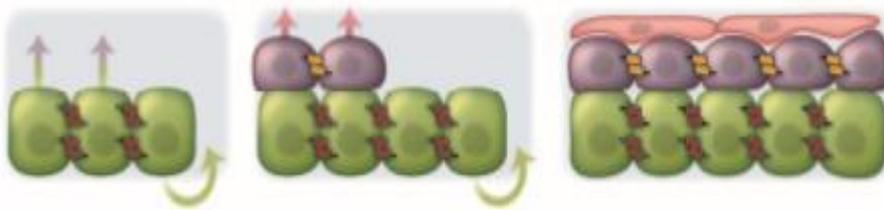


Figura 3.6 Meccanismo di stratificazione cellulare

In base alla tipologia di cellula di partenza si possono classificare, quindi, in questo modo:

- *AdSCs*: possono dare origine all’organoide del tessuto da dove sono state prelevate se vengono create delle condizioni che simulano quelle della nicchia naturale.

In coltura si espandono mantenendo la loro stabilità genetica e l’organizzazione del loro tessuto originario.

Gli organoidi generati possono derivare dalle cellule progenitrici adulte oppure da frammenti del tessuto di origine (Figura 3.7).

Esempi sono: pancreas, esofago, intestino, fegato, prostata, stomaco.

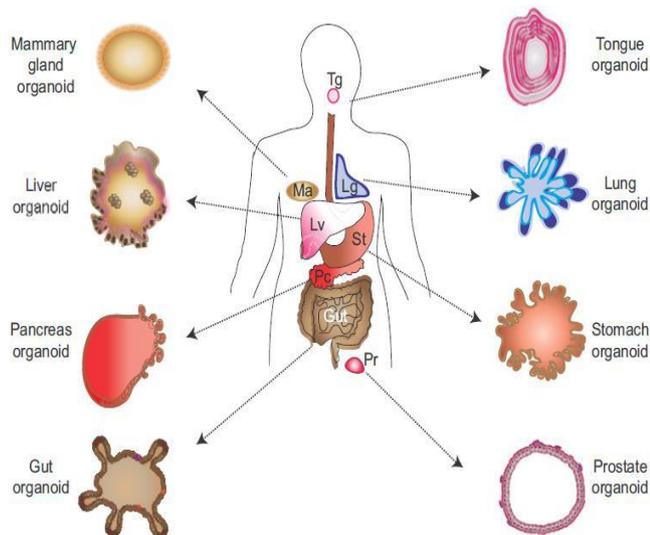


Figura 3.7 Esempi organoidi ricavati dalle AdSCs

- *PSCs (hESCs, iPSCs)*: queste cellule potendo essere derivate dai tre strati embrionali, in vitro possono essere ricavate attraverso protocolli di differenziazione graduale (Figura 3.8). Si possono poi trasferire in sistemi 3D che riproducono fedelmente gli step evolutivi che si verificherebbero in vivo.

Per la generazione degli organoidi, attraverso questa tipologia di cellule, è necessaria l'integrazione con il Matrigel per favorire lo sviluppo dello *scaffold*; sono fondamentali i fattori che promuovono la modellazione dei rispetti strati germinali e la differenziazione per produrre gli organi voluti. Inoltre, la conoscenza dettagliata del pathway della linea cellulare è necessaria per riprodurla. Tutte queste combinazioni permettono di ovviare ai limiti della disponibilità del materiale di partenza e generare proprio gli organoidi [10].

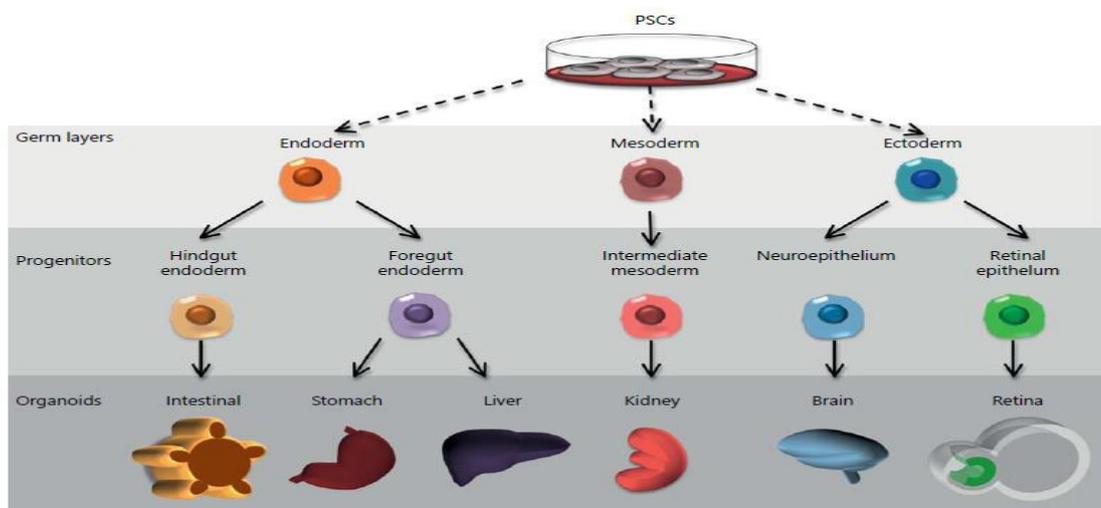


Figura 3.8 Derivazione cellule dalle iPSCs

3.3 Il contributo della bioingegneria

Nel processo di formazione degli organoidi, per il controllo della differenziazione e della riorganizzazione, vengono usati diversi fattori; infatti, sia quelli di crescita che l'aggiunta di piccole molecole sono utilizzati per manipolare i pathway per la trasmissione multipla dei segnali, fondamentali per la proliferazione e auto-rinnovamento delle staminali. Oltre alle componenti biochimiche, il Matrigel è il più comune e importante elemento del sistema che garantisce uno *scaffold* e un supplemento addizionale di segnali, sottoforma di membrana basale che permette l'adesione e la sopravvivenza delle cellule, così come la formazione degli stessi organoidi.

Spesso, questo complesso sistema è governato dal microambiente in cui è immersa la cellula staminale, ovvero la nicchia. Quest'ultima si può considerare la sede delle staminali nel nostro organismo che varia di tessuto in tessuto; più che una regione fisica, si intende un'area nella quale le cellule riescono ad interagire al meglio dal punto di vista biochimico, di irradiazione, dei fattori di crescita, di citochine e che, perciò, garantisce un ambiente ricco di nutrienti e fattori chimici per assicurarne la sopravvivenza.

La bioingegneria ha per lungo tempo aspirato a destrutturare il complesso biologico in modo da comprenderne nella maniera più dettagliata possibile tutti i meccanismi che la regolano, alla ricerca di strumenti in grado di manipolare e ricostruire il sistema in maniera controllata. Infatti, questo approccio ingegneristico ha permesso di guidare il comportamento e l'organizzazione cellulare, processi fondamentali nello sviluppo degli organoidi [12].

3.3.1 Controllo della differenziazione cellulare

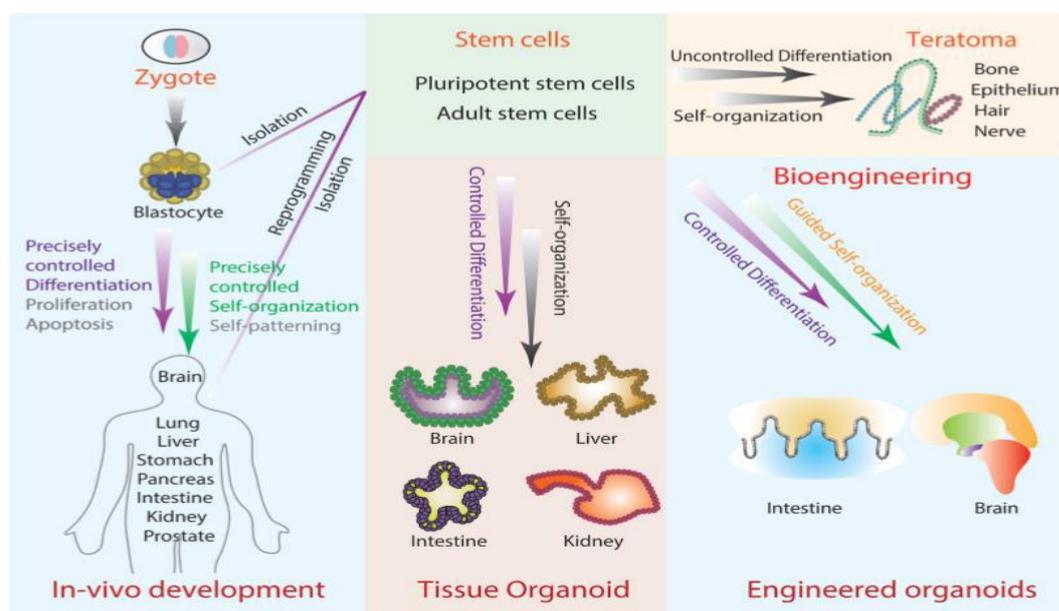


Figura 3.9 Contributo della bioingegneria nello sviluppo degli organoidi

Il processo di formazione degli organoidi è simile a quello dello sviluppo di un organismo a partire dallo zigote. Questo processo di maturazione richiede un preciso controllo della differenziazione, proliferazione e apoptosi associata all'autorganizzazione cellulare e allo specifico *pattern*, che conduce alla delimitazione di diversi tessuti maturi.

Nel caso di differenziazione non controllata (specialmente seguente il trapianto), le cellule pluripotenti producono teratomi, ovvero tumori benigni ricchi di varie tipologie di tessuti auto-organizzati.

Per, invece, indurre la differenziazione in una precisa direzione si possono usare due metodi:

- *Diretto*: strategia in cui porzioni di DNA vengono inserite, eliminate o sostituite nel genoma della cellula tramite nucleasi (tecnica di *genome editing*).

In questo modo si riescono ad eliminare le mutazioni monogeniche patologiche ereditarie.

- *Indiretto*: è rappresentato dalle tecniche bioingegneristiche che consistono nel controllo tramite la manipolazione del microambiente: dai segnali esogeni di natura enzimatica a quelli di natura meccanica e chimica.

Queste sono usate proprio per sviluppare modelli più rappresentativi dei tessuti in vivo [10].

3.4 Nicchia ingegnerizzata

Come abbiamo già visto, il comportamento delle cellule è fortemente controllato dal microambiente. Negli organoidi, i componenti della nicchia sono derivati direttamente dalle cellule (nel caso dei segnali autocrini o paracrini) oppure risultano essere esogeni, ovvero aggiunti al sistema (ECM, piccole molecole e fattori di crescita). L'interazione di tutti questi componenti crea un ambiente dinamico dal punto di vista strutturale e funzionale, che è spazialmente e temporalmente coordinato per il continuo connubio tra auto-rinnovamento/differenziazione e assemblamento delle cellule per la genesi degli organoidi.

Per migliorare il controllo di tutti questi processi strettamente e inscindibilmente connessi, le strategie ingegneristiche (metodo indiretto) sono necessarie per manipolare ogni processo strutturale nella formazione dell'organoide.

In particolare, un aspetto chiave per raggiungere l'obiettivo è il controllo del microambiente. Questo è inteso come un complesso array di segnali meccanici, che forniscono supporto alla cellula come la ECM, e forze meccaniche, così come le condizioni sistemiche e fisicochimiche espresse, ad esempio, attraverso il pH e il livello di ossigenazione.

I componenti che garantiscono la dinamicità della nicchia integrano segnali fissi ad altri a breve termine sia per mantenere lo stato di quiescenza che per indurre, quando necessario, il conseguimento del pathway dello sviluppo o garantire rapide risposte per la rigenerazione tissutale [13][14].

In particolare, mi soffermerò sull'ingegnerizzazione della nicchia attraverso la personalizzazione dello *scaffold* per indirizzare la differenziazione delle staminali verso la formazione di un tessuto maturo funzionale.

3.5 Scaffold biomimetico

La nicchia è, quindi, costituita da una miriade di componenti in interazione tra loro che includono la ECM, l'elemento principale nel garantire il supporto strutturale e la mediazione dei segnali per la polarizzazione cellulare, differenziazione, quiescenza e mobilità.

La nativa matrice extra-cellulare risulta composta da una serie di proteine e polisaccaridi quali collagene, laminina e fibronectina che creano il contesto fisico in cui interagiscono le cellule, a loro volta legate meccanicamente con la matrice attraverso proteine transmembrana, come le integrine [15].

Le proprietà meccaniche della ECM che risultano di particolare interesse per la costruzione dello *scaffold* sono:

- *Rigidità*: è la capacità della microstruttura di opporsi al meccanismo di deformazione in presenza di uno stimolo esterno (oppure quanto facilmente il materiale si deforma sotto l'azione della forza). Viene solitamente descritta attraverso il modulo di Young (o modulo di elasticità longitudinale, che, a sua volta, è definito come il rateo dello stress applicato sullo sforzo (cioè la relativa deformazione), valido per piccole perturbazioni.

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon_l} \text{ [Pa]}$$

Per fornire un'idea numerica di questo valore, le cellule sono solitamente coltivate in una piastra di polistirene, con un modulo elastico dell'ordine di 1 GPa.

Tuttavia, la descrizione della rigidità attraverso questi parametri implica il presupposto di considerare l'impalcatura come un materiale elastico e quindi tempo-indipendente, che però è un'assunzione semplicistica [13][16].

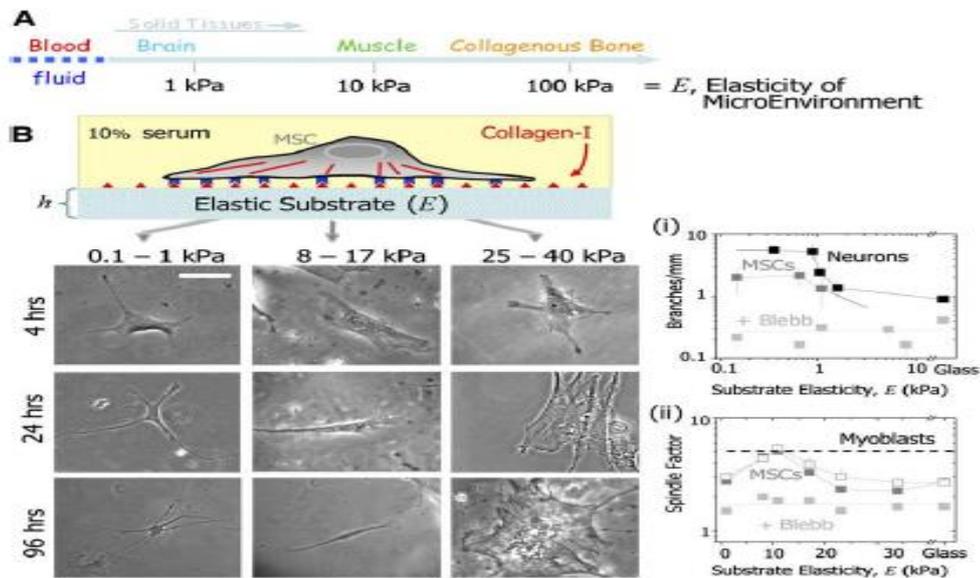


Figura 3.10 Range rigidezza tessuti ed esperimenti in gel per controllare il valore di E

- *Viscoelasticità*: è un fenomeno fisico che dipende dalla natura molecolare e microstrutturale, che regola il comportamento meccanico dei materiali polimerici in dipendenza dal tempo; in parte risulta simile a quello dei fluidi viscosi e in parte a quello dei solidi elastici.

Infatti, la matrice nativa esibisce proprio questa dipendenza dal tempo con le catene polimeriche che rispondono in maniera differente in relazione al carico applicato [13].

Per simulare la ECM nativa possono essere utilizzati diversi approcci, tra cui *scaffolds* 3D prodotti con biomateriali personalizzati o che, alternativamente, possono essere prodotti decellularizzando la matrice.

La modalità con cui si è riusciti a fornire un supporto adeguato allo sviluppo degli organoidi, replicando le condizioni della ECM, è rappresentata dall'utilizzo di un particolare tipologia di hydrogel naturale, ovvero il Matrigel (Figura 3.11).

Gli hydrogel sono polimeri formati da una rete tridimensionale di macromolecole legate tra di loro chimicamente o fisicamente, che possono assorbire e ritenere solventi. Sono caratterizzati dalla presenza di numerosi gruppi o domini idrofilici e possono essere composti sia da occorrenze naturali che da materiali sintetici; inoltre, il loro contenuto d'acqua può arrivare fino al 99%. Possono anche assorbire altre sostanze in modo da mimare al meglio il rapporto dei fluidi biologici con la matrice extracellulare.



Figura 3.11 Matrigel

Il Matrigel, infatti, è una miscela gelatinosa di proteine prodotta dalle cellule prese da un ammasso tumorale nell'epitelio di topo, che a 24-37°C forma il gel. Presenta una composizione eterogenea in modo da stimolare il comportamento cellulare con elementi quali: laminina, entactina, collagene di tipo IV, fattori di crescita e altre varie proteine. La quantità e la tipologia di questi componenti è variabile a seconda del momento dello sviluppo in cui si trova il tessuto in coltura e, quindi, dipende anche dal livello di differenziazione delle cellule. Insieme, questi elementi, cooperano dando origine a specifiche interazioni che garantiscono supporto all'integrità tissutale, agiscono come meccanorecettori, garantiscono la diffusione dei nutrienti, mantengono la differenziazione delle cellule e indirizzano lo sviluppo dei tessuti in una particolare direzione.

Tuttavia, data proprio la sua composizione eterogenea, questo particolare tipo di *scaffold* porta all'assemblaggio di organoidi molto diversi tra loro in termini di dimensioni, forma, vitalità e, spesso, contribuisce a una disposizione randomica dei tessuti. È importante, inoltre, sottolineare come l'insieme dei fattori di crescita e delle cascate dei segnali nel Matrigel lavorano simultaneamente, inibendo i pathways complementari, rendendo complesso il controllo e la modifica nel processo di trasduzione dei segnali nell'organogenesi.

Per sopperire a questi limiti si sta virando verso l'utilizzo di *scaffolds* di biomateriali sintetici in cui è possibile incorporare i segnali tipici della nativa ECM per la realizzazione di una nicchia sempre più personalizzata.

Infatti, grazie a questi materiali si sta riuscendo a replicare sempre più fedelmente la dimensione del microambiente, l'architettura, la resistenza meccanica, la viscoelasticità e i rapporti biochimici [16][17].

3.5.1 Scaffold artificiali

Lo sviluppo di *scaffolds* sintetici ha permesso il controllo della composizione fisica, chimica e cellulare degli organoidi. Infatti, il design di queste matrici specifiche può essere modulato in base ai risultati di molteplici tecniche di controllo come l'utilizzo di biochip ad alta densità (*microarrays*), studi sulla meccanica della membrana e l'utilizzo di sequenziamenti automatici per processare velocemente molti campioni cellulari.

I biomateriali possono ulteriormente migliorare le funzioni degli organoidi con un controllo spazio-temporale. Questo si esplica nella stimolazione cellulare attraverso segnali meccanici e segnali chimico/enzimatici.

- I segnali meccanici applicati dai tessuti circostanti giocano un ruolo fondamentale nella modulazione dei processi cellulari in vivo; l'assenza di queste forze in vitro può portare alla formazione di strutture con differenze significative dal punto di vista morfogenetico, come la mancanza della formazione dei villi negli organoidi intestinali. Per replicare, allora, le proprietà meccaniche del microambiente possono essere utilizzate tecnologie basate sull'utilizzo di materiali fotosensibili.

Infatti, un hydrogel a base PEG può contenere crosslink fotolabili che possono andare incontro a una locale degradazione quando esposti alla luce, producendo un rilassamento della membrana.

Un'alternativa è la presenza di determinati foto-attivatori all'interno della matrice che, emettendo luce, possono favorire le reticolazioni e la rigidità locale.

Queste strategie sono importanti in quanto possono essere usate per la creazione di gradienti di forze in una risoluzione su microscala. Per cui associate alla quantità di esposizione alla luce, queste tecniche permettono di replicare le naturali variazioni della rigidità della membrana nativa.

- Un altro aspetto fondamentale da implementare è l'ingegnerizzazione dell'interfaccia cellulare per renderla bioattiva, ovvero avere una composizione chimica tale da garantire l'adesione cellulare offrendo specificità e flessibilità. Una modalità è l'utilizzo di rivestimenti con film proteici quali glicina-arginina-acido aspartico (RGD) oppure l'immobilizzazione di proteine sensibili alle reazioni enzimatiche in modo da modificare la matrice circostante. Proprio l'utilizzo di *scaffolds* degradabili può essere sfruttato per promuovere la migrazione cellulare in una specifica posizione a priori designata [12].

3.5.2 Rigidezza

Proprio l'utilizzo di *scaffolds* sintetici è stato utile nello studio e realizzazione delle proprietà della ECM nativa.

Inizialmente, per studiare gli effetti della rigidità della matrice sullo sviluppo delle staminali si era utilizzato un hydrogel poliacrilammide in una coltura 2D.

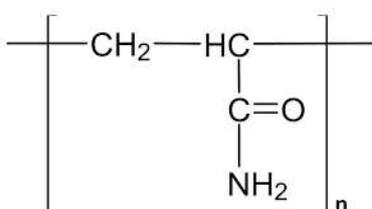


Figura 3.12 Formula poliacrilammide

Il gel di poliacrilammide (Figura 3.12) è un copolimero *cross-linked* preparato polimerizzando monomeri di acrilammide reticolati. Nel modello elastico ideale, la teoria prevede che aumentando le reticolazioni aumenti anche la rigidità e, quindi, si era riusciti a generare un hydrogel con un modulo elastico anche dell'ordine di 100kPa. Inoltre, si era visto che,

per facilitare l'adesione cellulare e il lavoro meccanico con il substrato, il gel di poliacrilammide poteva essere modificato covalentemente con proteine della ECM.

Tuttavia, essendo la nicchia tridimensionale, il gel di poliacrilammide non poteva essere usato nell'incapsulamento a causa la citotossicità dei monomeri. Allora attualmente si è deciso di utilizzare un insieme di polimeri quali il glicole polietilenico (PEG), alginato e acido ialuronico per preparare il substrato. Questi materiali vengono reticolati chimicamente e resi funzionali assieme alle proteine di adesione cellulare. Anche in questo caso, la densità di reticolazioni permette di modulare la rigidità della matrice, che spesso è collegata alle variazioni delle proprietà dei singoli elementi [13].

3.5.3 Viscoelasticità

Anche in questo caso, lo studio sull'impatto della viscoelasticità sul fenotipo delle staminali inizialmente fu studiato su gel di poliacrilammide 2D. Variando le proporzioni tra i vari monomeri, si riuscì ad ottenere un substrato con lo stesso *storage modulus* (elemento elastico), ma diverso *loss modulus* (elemento viscoso).

Con:

$$\text{Storage modulus: } E_1 = \frac{\sigma_0}{\epsilon_0} \cos\alpha \text{ [Pa]}$$

$$\text{Loss modulus: } E_2 = \frac{\sigma_0}{\epsilon_0} \sin\alpha \text{ [Pa]}$$

Mentre i gel hanno la stessa rigidità iniziale, la loro dissipazione tempo-dipendente in risposta all'applicazione delle forze è differente.

Recentemente, attraverso altri modelli di hydrogel per capsule 3D si è mostrato come le fisiche reticolazioni tra calcio e alginato sono intrinsecamente viscoelastiche a causa della reversibile natura dei legami. Allora è stata sviluppata una famiglia di hydrogels alginati con una rigidità e rilassamento delle tensioni indipendenti. In questo modo attraverso la concentrazione dei legami del calcio si può variare la rigidità del gel, mentre una diminuzione del peso molecolare dell'alginato porta ad un aumento del rateo del rilassamento delle tensioni. Inoltre, un ulteriore aumento del rateo può essere raggiunto accoppiando il PEG con molecole a basso peso molecolare di alginato [13].

3.6 Monitoraggio componenti della nicchia in vitro

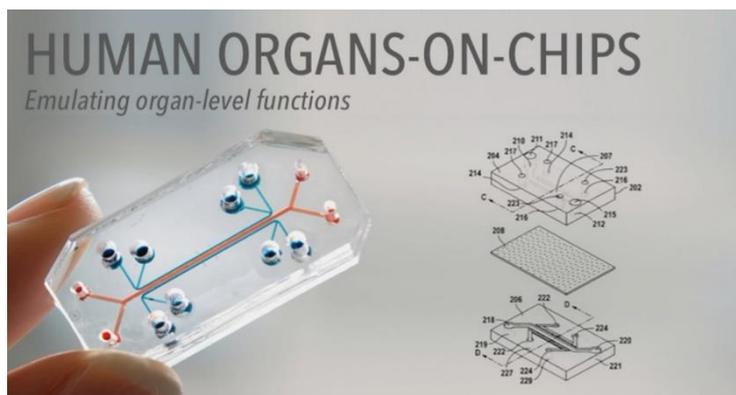


Figura 3.13 Organ-on-a-chip

Una delle più grandi sfide nel costruire *scaffolds* artificiali in vitro è la fedele rappresentazione spaziale del pathway dei segnali e il loro monitoraggio nel tempo. Per risolvere questa difficoltà sono stati creati dei sistemi chiamati *organ-on-a-chip* (Figura 3.13), ovvero dispositivi ottenuti in un chip

microfluidico sviluppati in polidimetilsilossano (PDMS), che consentono di seguire lo stato della cellula in diretta.

Le tradizionali colture 3D per organoidi possono sviluppare una maggiore quantità di massa tissutale, permettendo ai ricercatori di eseguire esperimenti analitici che normalmente richiedono grandi campioni per essere svolti. Inoltre, garantiscono lo *scaffold* per la crescita dell'architettura dell'organo in macroscale, lo sviluppo della grande complessità e eterogeneità dei tessuti che non potrebbero essere supportati in una microscale. Lo sviluppo dei chip microfluidici, inoltre, richiede competenze in micro-ingegneria e, durante la fabbricazione, il processo è suscettibile sia alla contaminazione batterica che alla formazione di bolle, elementi che potrebbero interferire della salute della cellula e nel funzionamento del chip stesso.

Nonostante questi elementi, i sistemi *organ-on-a-chip* offrono una straordinaria flessibilità nel controllo e monitoraggio di diversi elementi come la posizione delle cellule e dei tessuti, del processo fluidodinamico e dei parametri meccanici, aiutando a capire il loro aiuto nelle funzioni degli organi stessi. Ancora più importante è la possibilità di superare il lato negativo delle colture macroscopiche 3D: ovvero l'inaccessibilità dei tessuti conseguente lo sviluppo di *scaffold* sempre più funzionali e complessi che, se da un lato hanno garantito una rappresentazione sempre più fedele al vivo, dall'altro lato hanno portato una difficoltà nel controllo dell'attività cellulare. Grazie a queste tecnologie e al PDMS utilizzato per produrle (infatti, è un biomateriale trasparente), le cellule possono essere facilmente analizzate e seguite attraverso la microscopia a fluorescenza, microfluorimetria, *array* multipli di elettrodi, spettroscopia visibile UV e altri dispositivi [12].

L'utilizzo di tale modello ha permesso, inoltre, lo studio di farmaci (*drug screening*) per la valutazione della sicurezza delle sostanze chimiche sugli organi umani.

3.7 Breve panoramica delle strategie della bioingegneria

Ovviamente quelli sopra descritti sono solo alcuni esempi delle molteplici applicazioni della bioingegneria nello sviluppo degli organoidi. L'immagine sottostante (Figura 3.14) testimonia quante possibilità di sviluppo ci siano per la realizzazione di modelli sempre più realistici, ma anche quante risorse la comunità scientifica possenga per il raggiungimento dell'obiettivo.

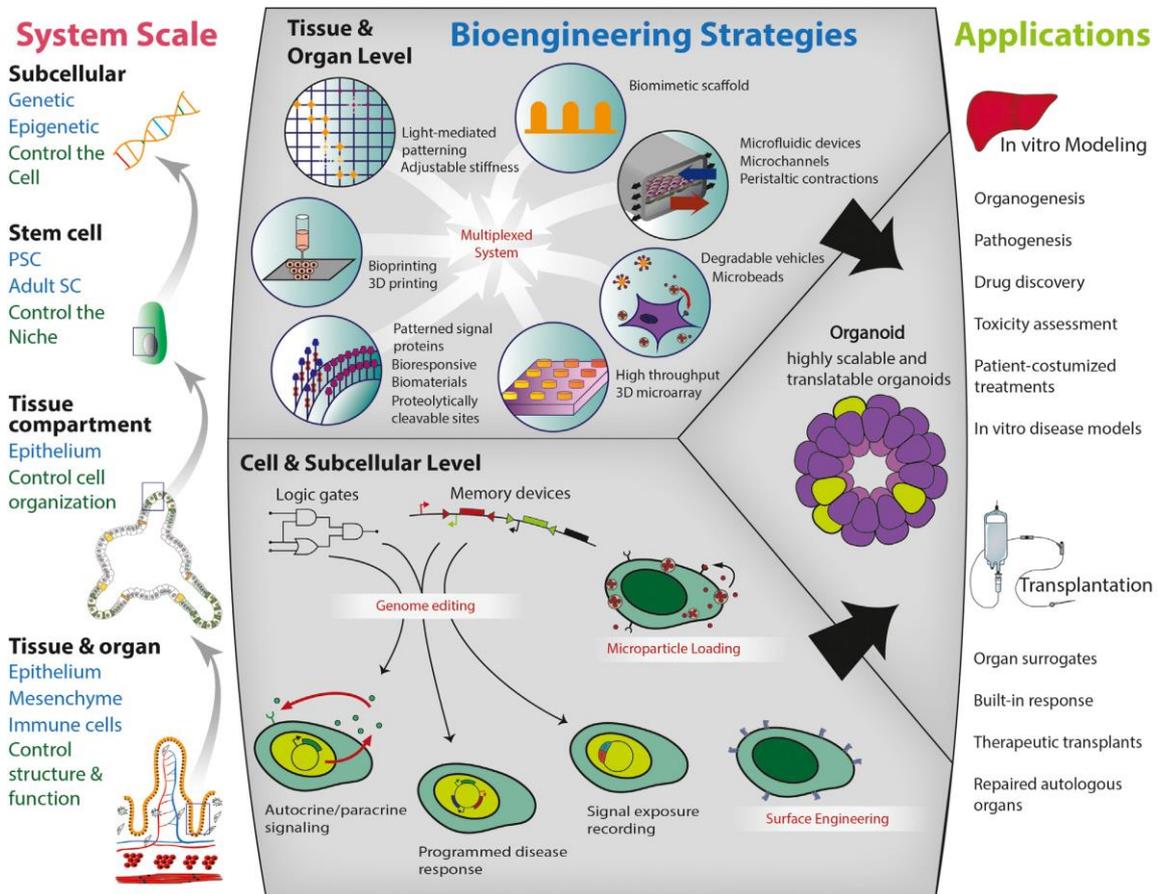


Figura 3.14 Approcci bioingegneristici nella ricerca per lo sviluppo degli organoidi e nelle terapie

4. Gli organoidi cerebrali

Il cervello umano è uno degli organi che ha, da sempre, suscitato l'interesse della comunità scientifica sia per la sua complessità sia per la sua limitata accessibilità in vivo; ciò ha contribuito a far rimanere ignote particolari caratteristiche del processo dello sviluppo cerebrale e alcune cause delle malattie neurodegenerative.

Il cervello risulta essere il principale elemento capace di gestire i segnali in ingresso e in uscita, al fine di essere il comando centrale nella modulazione dei comportamenti e del movimento. Tuttavia, i più basilari elementi del tessuto nervoso, che i modelli in vitro riescono a replicare, possono fornire le basi per la conoscenza del pathway sia dei segnali chimici che di quelli elettrici, ma, soprattutto, per la delineazione dell'intera struttura cerebrale [18].

L'architettura del sistema nervoso origina da tre sezioni (Figura 4.1):

- *Prosencefalo*, il quale nell'organogenesi si dividerà in:
 - Telencefalo: che darà origine alla corteccia cerebrale e alle tre meningi;
 - Diencefalo: da cui si origineranno talamo e ipotalamo;
- *Mesencefalo*, ovvero ciò che rappresenterà la regione più rostrale del tronco encefalico (quest'ultimo elemento coinvolto nella trasmissione di informazioni tra la corteccia cerebrale e il soma, con ruolo chiave nella regolazione fisiologica del ciclo cardiaco e respiratorio);
- *Rombencefalo*, il quale sarà ulteriormente diviso in:
 - Metencefalo: da cui si svilupperanno ponte e cervelletto (coinvolto nel controllo motorio);
 - Mielencefalo: che originerà la regione più caudale del tronco encefalico, ovvero il bulbo (struttura che si continua con il midollo allungato, accolto nel rachide).

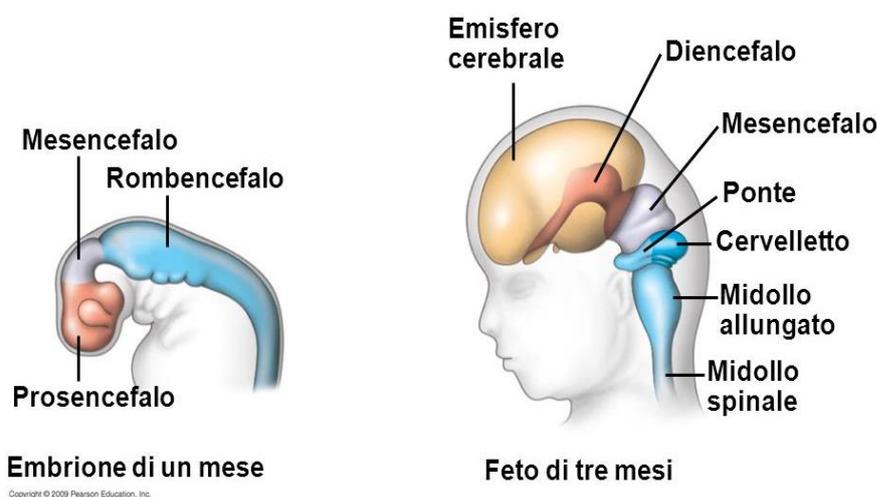


Figura 4.1 Sviluppo sistema nervoso a partire dal prosencefalo, mesencefalo e rombencefalo

Il tessuto nervoso è costituito da cellule specializzate, ovvero i neuroni, tenute in situ dalle cellule gliali che svolgono una funzione trofica e di sostegno grazie alle loro espansioni citoplasmatiche, che permettono di creare una rete perfettamente organizzata per ricevere, condurre ed elaborare gli stimoli provenienti dalle diverse parti del corpo.

4.1 Evoluzione nello sviluppo di modelli del sistema nervoso

L'obiettivo comune nella costruzione di modelli base in vitro del sistema nervoso è nella ricerca di replicare l'intrigata architettura e composizione cerebrale, al fine di comprendere il più dettagliatamente possibile i meccanismi che regolano ogni funzione.

A causa delle peculiari caratteristiche dello sviluppo del cervello umano, come la rapida espansione e le modalità uniche comportamentali delle sue cellule, risulta difficile esaminare questo organo in modelli animali.

Nello sviluppo degli organoidi si è sempre sfruttata la capacità di auto-organizzazione delle staminali. Infatti, i primi modelli sviluppati utilizzarono le cellule pluripotenti (solo successivamente, con la scoperta delle iPSCs si riuscì ad utilizzare quelle somatiche riprogrammandole) e si notò come le cellule neuronali, derivate per differenziamento dalle hESCs, mantenessero questa capacità di assemblamento anche in un ambiente 2D formando le "rosette neuronali". Quest'ultime sono delle associazioni di cellule a geometria radiale con un lume centrale attorno al quale i progenitori neurali sono disposti a raggiera; possono essere considerate come l'equivalente di sezioni trasversali del tubo neurale, ovvero la struttura che durante lo sviluppo embrionale precede la formazione del sistema nervoso centrale. Per cui le staminali riproducevano l'architettura del sistema nervoso in fase di sviluppo; tuttavia, il fatto di svilupparsi in un ambiente bidimensionale e non come quello fisiologico tridimensionale, portava a formare solo una fetta del tubo neurale [19].

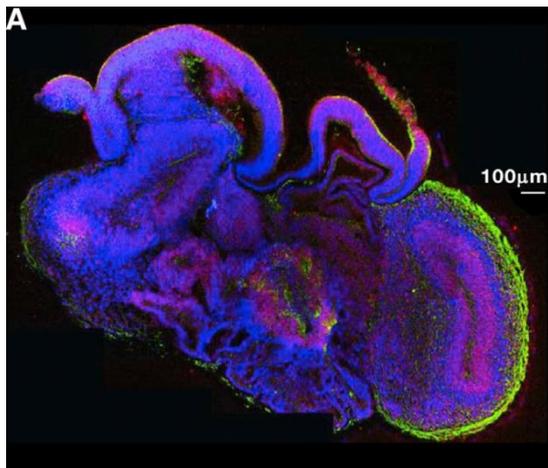


Figura 4.2 Sezione di un organoide cerebrale

Un deciso progresso avvenne nel 2013, nel laboratorio di Jurgen Knoblich a Vienna dove la ricercatrice M. Lancaster, dopo aver per settimane cercato di generare cluster di cellule capaci di differenziare in diversi tipi di neuroni, notò come le cellule non rimanessero adese al fondo della piastra di coltura, ma galleggiavano formando sfere strane e lattiginose, presentando uno strano pigmento. Studiando questa sporgenza al

microscopio notò come, in realtà, era un assemblamento di una varietà di neuroni che stavano formando la retina. Per cui abbandonò l'uso di pathway di fattori di crescita, in favore alla creazione di un ambiente e condizioni di crescita che ricalcassero quello in vivo (Figura 4.3). A seguito di queste considerazioni, sviluppò un metodo per la coltivazione a lungo termine, in sospensione, di cellule neurali derivate da staminali pluripotenti: essendo in un ambiente 3D e non adese al terreno permettevano la formazione di “neurosferi”, ovvero strutture sferiche, che col tempo crescevano in dimensioni grazie alla proliferazione dei progenitori neurali [20].

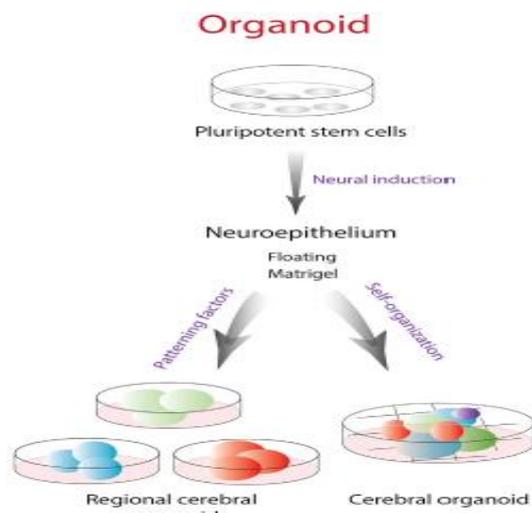


Figura 4.3 Sviluppo organoidi cerebrali in vitro

Il metodo, quindi, prevedeva un'iniziale coltura in un terreno 3D del neuroectoderma, ovvero il tessuto embrionale dal quale si originerà proprio il sistema nervoso, in una sospensione *serum-free* (in quanto il siero è una fonte naturale eccellente di sostanze nutrienti ed altri componenti necessari per lo sviluppo, proliferazione e differenziamento quali i fattori di crescita). Successivamente, il tessuto appena generato veniva posto nel Matrigel per un'ulteriore espansione senza l'aggiunta di fattori di induzione neurale e trasferito in

bioreattori rotanti sotto forma di goccioline, in modo da favorire gli scambi gassosi e di nutrienti anche all'interno delle neurosfere [21]. Dopo 8-10 giorni in coltura, si notava l'apparizione di una prima identità neurale, mentre tra i 20-30 giorni si formavano definite regioni cerebrali come la corteccia dorsale, telencefalo ventrale, plesso coroideo, ippocampo e retina.

Nonostante questi organoidi cerebrali hanno mostrato uno sviluppo nella rappresentazione di

Engineering

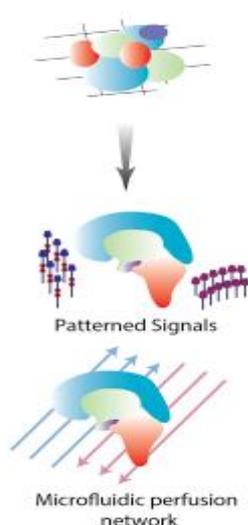


Figura 4.4 Approcci bioingegneristici

modelli sempre più congruenti a quelli osservati in vivo, presentano diversi limiti. Primo di tutti è l'incompletezza dello sviluppo di alcune regioni e la scorretta localizzazione spaziale, che si traduce in una mancanza di corrette relazioni tra le varie sezioni. Inoltre, se il non utilizzo dei fattori di *patterning* ha permesso lo sviluppo di un'unica struttura e il raggiungimento di una maggiore complessità, d'altra parte senza questi fattori è impedito, in vari livelli, il controllo sull'organizzazione tissutale [12][22].

Questi sono solo alcuni dei limiti, tuttavia il lavoro di M. Lancaster ha spianato la strada della ricerca verso lo sviluppo di modelli sempre più rappresentativi. La bioingegneria, in questo senso, attraverso il controllo spazio-temporale della differenziazione oppure

grazie all'utilizzo di *scaffold* personalizzati con segnali immobilizzati per guidare il pathway dei segnali, o ancora attraverso la microfluidica per garantire una vascolarizzazione simile a quella in vivo, ha il potenziale di guidare lo sviluppo della ricerca (Figura 4.4).

4.2 Biomateriali negli organoidi cerebrali

Uno dei settori in cui la bioingegneria può intervenire, per sopperire alle mancanze dei modelli degli organoidi cerebrali, è sull'assenza di un controllo sui segnali biologici e meccanici, che risultano cruciali nell'organizzazione tissutale.

Come si è visto in precedenza, la scelta di non utilizzare dei fattori di crescita è stata fatta per favorire l'uso dei segnali intrinseci; tuttavia, ciò ha determinato la necessità di compensare alla mancanza dei tessuti circostanti e dell'asse del corpo per il raggiungimento della geometria spaziale tipica del sistema nervoso in vivo. Per ridurre questi limiti, il microambiente può essere, proprio, conformato per presentare precisi segnali biochimici in grado di controllare la disposizione spaziale e le dimensioni dell'organoide.

Recentemente, Lindborg et al. sono riusciti a sviluppare degli organoidi cerebrali ingegnerizzati (cOrgs) dalle hPSCs usando un materiale a base di hydrogel e un mezzo di coltura definendoli chimicamente. Hanno composto l'hydrogel con sodio ialuronato (HA-Na) e chitosano (CT) protonato con acido formico (CTNH₃⁺). Grazie a questi elementi, gli organoidi sono stati in grado di formare una struttura simile al tubo neurale, delle rosette neurali e delle precoci corticogenesi; inoltre, avevano un'espressione proteica e genica che rappresentava lo sviluppo del prosencefalo, mesencefalo e rombencefalo. Coerentemente con il comportamento neurale, hanno mostrato una risposta al glutammato e delle depolarizzazioni in diverse cellule. Questi studi enfatizzano la necessità dell'utilizzo di materiali definiti chimicamente in grado di modulare le interazioni tra le cellule e cellula-matrice, ma anche definire forze meccaniche capaci di guidare un efficiente sviluppo.

A proposito dell'analisi meccanica, nel mezzo di coltura sopra descritto il modulo di Young dell'HA-CT hydrogel si è calcolato oscillare tra 9 e 13kPa, marcatamente più alto rispetto a quello nativo che si aggira tra i 0,5 e 1kPa e dei precedenti risultati in vitro. Un grosso contributo nell'interpretazioni dell'influenza di questi valori, nello sviluppo degli organoidi, è stato dato da Schaffer, il quale ha mostrato come un hydrogel più morbido (100-500Pa) promuove il differenziamento neuronale, mentre uno più rigido (1-10kPa) quello gliale. Similmente, una ECM leggera con una rigidezza simile a quella del tessuto nervoso (100-700Pa) promuove la generazione di un precoce ectoderma neurale dalle hPSCs, mentre quest'effetto è meno pronunciato con una più rigida (Figura 4.5). Questo dimostra come l'elasticità della membrana

è un potente regolatore per la differenziazione. Tuttavia, bisogna notare come la capacità di auto-rinnovamento delle staminali, invece, risulta ininfluente dalla rigidità della ECM [23].

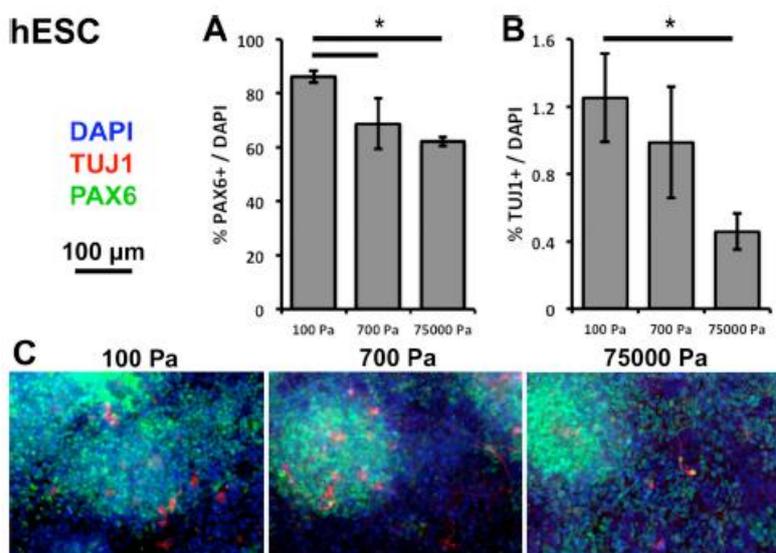


Figura 4.5 Influenza del substrato sullo sviluppo neurale

Un altro risultato importante è stato raggiunto da Schwartz et al. creando un costrutto neurale 3D combinando un hydrogel a base di PEG con hESCs, con le staminali mesenchimali e con le cellule precursori delle microglia in una coltura *serum-free*. L'obiettivo era di creare un modello predittivo sulla tossicità neurale che catturasse i principali elementi responsabili delle interazioni tra le diverse cellule durante lo sviluppo. Per cui, per realizzare questo costrutto, si è modificato il gel includendo nella matrice delle metalloproteasi degradabili, peptidi in grado di generare *cross-links* e favorendo l'attività proteolitica, e CRGDS, proteine sintetiche in grado di aumentare l'adesione cellulare. Per mimare la formazione del tubo neurale e del conseguente reclutamento delle microglia e dei vasi sanguigni, i progenitori neurali sono stati depositati nel gel; successivamente è stato fatto lo stesso prima con le cellule vascolari e poi con le microglia, rispettivamente il nono e tredicesimo giorno. Cambiamenti nell'espressione genica sono stati 9 volte su 10 classificati accuratamente tossici o non tossici, confermando la bontà del modello. Quindi, nonostante questo costrutto neurale basato sull'utilizzo dei biomateriali non possa essere classificato completamente come un organoide, la sua complessità sul tipo di cellule, la capacità di gestire le dimensioni e l'abilità di modellamento sono incoraggianti per il miglioramento degli attuali organoidi corticali.

Diversi altri polimeri e *scaffold* sintetici sono stati sviluppati seguendo gli obiettivi di migliorare l'adesione cellula-matrice, adeguare le proprietà meccaniche in relazione al contesto e garantire la formazione di organoidi con dimensioni che riproducessero gli elementi in vivo [24].

Tutte queste miglorie e studi stanno contribuendo a comprendere più dettagliatamente le cause di alcune malattie neurodegenerative e conseguentemente spingendo verso l'utilizzo di nuove terapie.

4.3 Organoidi come modello di studio per le malattie neurodegenerative

Le malattie neurodegenerative sono un gruppo di patologie caratterizzate dalla progressiva perdita di specifici neuroni nel cervello. A livello molecolare, condividono caratteristiche comuni come l'accumulo di aggregati proteici anormali nei neuroni e nelle cellule della glia, che manifestano diverse sindromi cliniche in base alle proteine e alle regioni del cervello coinvolte. La mancanza di terapie per queste patologie significa che rappresentano un'enorme sfida di salute a livello sociale.

La comprensione dei meccanismi molecolari causativi della neurodegenerazione sono stati limitati dall'inaccessibilità del cervello umano quando è in vita, dalla sovra-espressione nei modelli in vivo del gene di interesse e dalla mancanza di un sistema in vitro che permettesse la coltura di neuroni umani con il genoma del paziente affetto dalla malattia [25]. Con lo sviluppo delle iPSCs si è riusciti a superare questi problemi, generando cellule del fenotipo e/o genotipo di interesse. Infatti, con lo sviluppo degli organoidi cerebrali si è riusciti a mimare i precoci stadi dello sviluppo cerebrale, catturando sia la composizione multicellulare del cervello che i suoi elementi di base. Tuttavia, l'utilizzo di questi modelli per lo studio delle malattie neurodegenerative è ancora qualcosa in fase embrionale, limitato dalla mancanza di vascolarizzazione, microglia e oligodendrociti, l'im maturità delle colture neuronali e l'eterogeneità tra gli stessi organoidi. Inoltre, possono rappresentare solo un lasso temporale limitato permettendo, per adesso, solo lo studio di modifiche cellulari precoci.

Tuttavia, sono stati fatti molti passi in avanti e di seguito verranno presentati gli sviluppi in atto nello studio e rappresentazione di queste particolari patologie [26].

4.3.1 Malattia di Alzheimer

L'Alzheimer è la malattia neurodegenerativa progressiva più diffusa, affliggendo 50 milioni di persone nel mondo (secondo Alzheimer Research UK); proprio per questi motivi ha spinto la ricerca allo sviluppo di modelli in grado di replicare la patologia, permettendo di investigare il meccanismo alla base della malattia. È la forma più comune di demenza senile ed è un esempio di carattere multifattoriale.

Dal punto di vista macroscopico, vista la degenerazione dei neuroni, si osserva una perdita di volume a livello dell'encefalo e un aumento degli spazi vuoti (i ventricoli). Inoltre, si registra

una marcata atrofia corticale, soprattutto a livello della corteccia e dell'ippocampo. Questo porta alla compromissione di tutte le aree deputate al pensiero, alla pianificazione, al ricordo, al linguaggio e alla memoria.

Microscopicamente, invece, il cervello presenta due caratteristiche principali:

1. *Le placche amiloidi extracellulari*: sono placche composte principalmente dal peptide beta-amiloide (A β) di 40-42 amminoacidi e si formano all'esterno dei neuroni. La A β si genera a partire dalla APP, che è una proteina di membrana, che se tagliata da beta e gamma secretasi libera un frammento: il peptide amiloide, che formerà proprio le placche.
2. *Grovigli neurofibrillari*: sono grovigli intracellulari formati principalmente dalla proteina tau fosforilata. Normalmente quest'ultima serve a stabilizzare i microtubuli del citoplasma, mentre nell'Alzheimer, una volta fosforilata, si stacca andando a formare grovigli all'interno delle cellule e portando allo sfaldamento nella struttura.

Ricapitolando, si può dire che la cellula, nella malattia di Alzheimer, riceve un contributo dall'esterno dell'amiloide che comprime le strutture circostanti portando un'inflammatione locale, con produzione di danno ossidativo che contribuisce alla neurodegenerazione. Il secondo arriva dall'interno della cellula con la perdita della struttura a causa di danni citoscheletrici e la formazione di grovigli neurofibrillari. Tutto ciò concorre alla morte neuronale e al deficit colinergico, con tutte le conseguenze che questa demenza progressiva comporta.

L'identificazione delle mutazioni nella APP ha guidato lo sviluppo di modelli in vitro, che, tuttavia, presenta diverse sfide: le rappresentazioni delle condizioni tipiche della malattia nell'ambiente extra ed intra-cellulare in uno stesso modello; il tempo di ritardo che intercorre tra la formazione della A β e la sedimentazione delle placche.

I modelli di organoidi in 3D rappresentano un approccio attraente per ricapitolare le placche extracellulari in un sistema in vitro. Nonostante le colture 2D con iPSCs hanno mostrato di produrre un profilo patologico convincente, la A β secreta viene rimossa durante il processo di nutrimento cellulare, elemento che non favorisce il loro deposito. Al contrario, i sistemi 3D offrono un ambiente per queste specie inclini ad aggregarsi per poi essere sequestrati in un più grande aggregato proteico [27].

Uno dei modelli proposti è quello di Choi et al. in cui sono state usate cellule neuronali con una over-espressione di APP contenente una doppia mutazione. Le cellule furono inizialmente differenziate in 2D, prima di essere spostate nel Matrigel per generare un sistema 3D. Questo modello suscitò entusiasmo per la capacità di rappresentare sia la condizione della formazione di placche che quella dei grovigli.

Lo studio, invece, del comportamento della proteina tau risulta più difficoltoso a causa della sua regolazione durante lo sviluppo. Infatti, presenta sei isoforme che mutano in relazione dei vari stadi di crescita dell'organo e, presentando diverse proprietà, la ricapitolazione del preciso profilo strutturale risulta più complicato.

Inoltre, rimane il dubbio che negli organoidi venga accelerato il processo di apparizione delle varie isoforme. Solo una coltura prolungata nel tempo potrebbe risolvere questa domanda, delineando sia completamente il profilo della proteina sia il preciso pathway che porta alla patologia [28].

4.3.2 Morbo di Parkinson

La malattia di Parkinson affligge dai 4-5 milioni di persone nel mondo ed è quindi considerata la più comune malattia neurodegenerativa del movimento. È caratterizzata patologicamente da un deficit di dopamina causato dalla degenerazione progressiva dei neuroni dopaminergici della substantia nigra, anche se la patologia si riscontra anche nell'area corticale. Ciò è dovuto a un accumulo di proteine anormali chiamate corpi di Lewy, che sono degli agglomerati insolubili dell' α -sinucleina (mutata, danneggiata o espressa in maniera anomala).

I geni causativi sono multipli e in quantità maggiore rispetto a quelli dell'Alzheimer; per cui si riscontra un 10-15% di casi dovuti a forme familiari, mentre i restanti sono dovuti all'interazione tra fattori ambientali e geni di suscettibilità.

Alcuni dei geni causativi scoperti sono le mutazioni nel SNCA, che codifica per l' α -sinucleina; la più comune causa genetica è la mutazione nel LRRK2, implicato nella funzione lisosomiale, che è risultata fondamentale per la riproduzione di questo gene in modelli 3D sfruttando le tecniche di differenziazione diretta in organoidi arricchiti di neuroni dopaminergici nel mesencefalo. Kim et al. sono riusciti a generare proprio un organoide con questo gene mutato e hanno osservato l'accumulo della proteina nelle stesse posizioni di quello osservato in un tessuto nervoso umano dopo la morte. Un altro studio ha dimostrato la riduzione della complessità e delle ramificazioni in questi modelli, correlato ad un aumento di FOXA2.

Questi lavori suggeriscono come, oltre alla possibilità di ricapitolare gli aspetti del morbo di Parkinson, questi organoidi rivelano difetti nello sviluppo dei neuroni dopaminergici. Inoltre, l'osservazione dei corpi di Lewy nell'intestino ha portato a ipotizzare che l' α -sinucleina possa iniziare in quest'organo per poi migrare nel cervello per mezzo del nervo vago [28].

4.3.3 Corea di Huntington

La malattia di Huntington è una rara malattia neurodegenerativa autosomica dominante causata da un'espansione nel gene HTT (gene di Huntington) della ripetizione della tripletta CAG, che

codifica per la glutammina. Ciò comporta una progressiva degenerazione del nucleo della base e della corteccia.

Gli alleli normali sono quelli sotto alle 35 ripetizione della tripletta in un individuo sano; dai 36 ai 40 si ha una condizione di penetranza incompleta; sopra ai 40 gli individui hanno penetranza completa e quindi manifestano la patologia.

Proprio questa perdita della giusta sequenza *wild-type* porta alla formazione di proteine tossiche letali per l'embrione, e sia le colture 2D che 3D generate dalle iPSCs portanti la mutazione nel gene HTT hanno rilevato lo sviluppo neuronale del fenotipo associato in relazione all'aumentare delle ripetizioni di CAG. Nella coltura bidimensionale si è riuscito a descrivere tutti i difetti nella formazione della rosetta, della migrazione cellulare e della architettura. Mentre in terreni tridimensionali, attraverso il confronto tra i profili trascrittomici dell'organoide con le mutazioni nel gene HTT e uno di controllo, si è rilevata una minore espressione genica nel primo. I dati suggeriscono che il cervello rimanga in uno stadio di sviluppo precoce, senza poi avere la capacità di differenziarsi e maturare. L'analisi trascrittomica supporta questa analisi mostrando l'influenza di geni insoliti sullo sviluppo delle proiezioni neuronali e sulle sinapsi. Tuttavia, il collegamento tra queste alterazioni nello sviluppo neuronale e le malattie neurodegenerative rimane, ancora, da determinare [28].

5. Conclusione

L'abilità di generare varie regioni cerebrali, senza l'utilizzo di fattori esterni, dimostra la straordinaria capacità delle cellule staminali di possedere intrinsecamente la programmazione dettagliata delle diverse fasi atte alla differenziazione e interazione reciproca, per la formazione del complesso tissutale. Nonostante lo sviluppo in una coltura differente dalla loro naturale ambientazione, i protocolli per lo sviluppo degli organoidi cerebrali sono capaci di ricapitolare le caratteristiche peculiari delle prime fasi dello sviluppo del tessuto nervoso in maniera spazio-temporale, sia in termini di espressione genica che nella citoarchitettura.

Ancora oggi, però, ci sono limiti che impediscono lo sviluppo di modelli tali da essere considerati una perfetta replica; alcuni di questi sono la loro dimensione ristretta che limita il loro utilizzo nello studio delle fasi tardive dello sviluppo cerebrale, ma anche la mancanza di vascolarizzazione.

Lo sviluppo di nuove strategie bioingegneristiche sta aiutando a superare queste problematiche, offrendo modelli e strumenti per la manipolazione e lo studio dei tessuti, ma anche per offrire la base per il *drug screening* e trattamenti paziente specifico.

È comunque chiaro che altre sfide chiave in questo settore saranno il riuscire a standardizzare il processo di produzione di modelli multi-fenotipo e l'utilizzo degli strumenti della bioingegneria senza interferire con la naturale abilità del sistema di regolazione individuale di ogni parametro.

I passi con cui la ricerca in questo settore si sta muovendo e la trasversalità dei campi interessati sta permettendo di investigare su questioni che altrove non si riuscirebbero a porre; tuttavia, solo con la sinergia tra tutti i diversi modelli si potrà realmente aumentare la conoscenza che illuminerà il percorso, in particolare, verso la cura delle malattie neurodegenerative.

6. Bibliografia

- [1] Kolios G, Moodley Y. (2013) Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*, 85(1):3-10.
<https://doi.org/10.1159/000345615>.
- [2] Potten CS, Loeffler M. (1990) Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development*.110(4):1001-20.
<https://doi.org/10.1242/dev.110.4.1001>.
- [3] Conti L. Università di Milano. (n.d.) Cellule Staminali embrionali e adulte
http://www.agorascienza.it/application/files/8014/9908/3961/B_-stam_embriionali_adulte_Conti.pdf
- [4] De Felici M. (2009) *Embriologia umana. Morfogenesi, processi molecolari, aspetti clinici*
- [5] Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M. *et al.* (2019) Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther* 10.
<https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>.
- [6] Bongso A, Richards M. (2004) History and perspective of stem cell research. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*;18(6):827-42.
<https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2004.09.002>.
- [7] Vats A, Bielby RC, Tolley NS, Nerem R, Polak JM. (2005) Stem cells. *Lancet*. 366(9485):592-602.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66879-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66879-1).
- [8] Takahashi K, Yamanaka S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 126(4):663-76.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>.
- [9] Heather A, McCauley and James M. Wells. (2017) Pluripotent stem cell-derived organoids: using principles of developmental biology to grow human tissues in a dish. *Development*. 144(6): 958-962
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5358106>
- [10] Centro ricerca E. Piaggio. (n.d.) Organoidi.
<http://www.centropiaggio.unipi.it/sites/default/files/course/material/organoidi.pdf>
- [11] Corrà C, Novellasdemunt L, Li VSW. (2020) A brief history of organoids. *Am J Physiol Cell Physiol*. 319(1):C151-C165.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00120.2020>.

- [12] Yin X, Mead BE, Safaee H, Langer R, Karp JM, Levy O. (2016) Engineering Stem Cell Organoids. *Cell Stem Cell*. 18(1):25-38.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.12.005>.
- [13] Madl CM, Heilshorn SC. (2018) Engineering Hydrogel Microenvironments to Recapitulate the Stem Cell Niche. *Annu Rev Biomed Eng*. 20:21-47.
<https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-062117-120954>.
- [14] Vazin T, Schaffer DV. (2010) Engineering strategies to emulate the stem cell niche. *Trends Biotechnol*. 28(3):117-24.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.11.008>.
- [15] Benton G, Arnaoutova I, George J, Kleinman HK, Koblinski J. (2014) Matrigel: from discovery and ECM mimicry to assays and models for cancer research. *Adv Drug Deliv Rev*. 79-80:3-18.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.06.005>.
- [16] Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. (2006) Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. 126(4):677-89.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.044>.
- [17] Kleinman HK, Martin GR. (2005) Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol*. 15(5):378-86.
<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2005.05.004>.
- [18] Qian X, Song H, Ming GL. (2019) Brain organoids: advances, applications and challenges. *Development*. 146(8)
<https://doi.org/10.1242/dev.166074>.
- [19] Lee, CT., Bendriem, R.M., Wu, W.W. et al. (2017) 3D brain Organoids derived from pluripotent stem cells: promising experimental models for brain development and neurodegenerative disorders. *J Biomed Sci* 24, 59.
<https://doi.org/10.1186/s12929-017-0362-8>.
- [20] Rosa A. (2022) Dall'auto-organizzazione delle cellule staminali in vitro agli organoidi.
<https://www.stoccolmaaroma.it/organoidi-forse-vita-in-miniatura/>
- [21] Trujillo CA, Muotri AR. (2018) Brain Organoids and the Study of Neurodevelopment. *Trends Mol Med*. 24(12):982-990.
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.09.005>.
- [22] Benito-Kwiecinski S, Lancaster MA. (2020) Brain Organoids: Human Neurodevelopment in a Dish. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 12(8)
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a035709>.

- [23] Keung AJ, Asuri P, Kumar S, Schaffer DV. (2012) Soft microenvironments promote the early neurogenic differentiation but not self-renewal of human pluripotent stem cells. *Integr Biol (Camb)*. 4(9):1049-58.
<https://doi.org/10.1039/c2ib20083j>.
- [24] Shah SB, Singh A. (2017) Cellular self-assembly and biomaterials-based organoid models of development and diseases. *Acta Biomater*. 53:29-45.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.01.075>.
- [25] Clevers H. (2016) Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell*. 165(7):1586-1597.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.082>.
- [26] Lancaster, M., Renner, M., Martin, CA. et al. (2013) Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* 501, 373–379.
<https://doi.org/10.1038/nature12517>.
- [27] Artegiani B, Clevers H. (2018) Use and application of 3D-organoid technology. *Hum Mol Genet*. 27(R2): R99-R107.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddy187>.
- [28] Wray S. (2021) Modelling neurodegenerative disease using brain organoids. *Semin Cell Dev Biol*. 111:60-66.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.05.012>.