

Bologna 29-1-2024

Gli organoidi e loro recenti applicazioni

Motivazione: su invito di Padre Bertuzzi.

Premessa. Mi occupo di modelli teorici tra cui Intelligenza artificiale basata su algoritmi di apprendimento automatico (machine learning, deep learning) per analisi di dati di tipo biologico. Purtroppo o per fortuna non sono un medico (che pure si avvale delle mie conoscenze in campo molecolare) e che spesso se all'avanguardia utilizza gli organoidi per svolgere ricerche. Ma abbiamo avviato discussioni a carattere metafisico, quindi mi focalizzerò su quegli aspetti che possono essere utili per una discussione in questo ambito.

Introduzione

Partiamo dal presupposto che **la cellula è l'unità fondamentale del vivente**. La prova più convincente di ciò è che il nucleo (che contiene il patrimonio genetico) può essere trapiantato da una cellula intera ad un'altra priva dello stesso, e solo se questo accade, la cellula poi comincia a funzionare decodificando il patrimonio genetico trapiantato. Come a dire che "la vita" affonda la sua essenza nelle interazioni ancora in gran parte non chiarite tra citoplasma (interno della cellula) e nucleo (materiale genetico).

Ora le cellule (di vari organismi, organi, tessuti...) possono essere coltivate in vitro...(le famose capsule Petri con agar e terreno/mezzo di coltura)...Questo approccio ebbe inizio nei vegetali nei primi anni del 1900 ad opera di Haberlandt il quale, basandosi sul concetto di **TOTIPOTENZA**, riprese e ampliò la teoria cellulare formulata da Schwann e Schleiden 60 anni prima. Per Totipotenza si intende la proprietà delle cellule vegetali o di una singola cellula **staminale** (dal latino stamen, filo dell'ordito, o più semplicemente indifferenziata) animale di svilupparsi in un intero organismo e persino in tessuti extra-embryonali. Da allora la tecnica di coltivazione in vitro si è evoluta ed è diventata di uso abituale anche in diagnostica medica, dove qualsiasi cellula o gruppo di cellule può essere amplificato (fatto crescere) a scopo analitico.

Problema: La biologia cellulare ci insegna che le cellule hanno potenzialità diverse e che quando si trovano in vivo, cioè integrate in organi e tessuti, riescono molto bene ad interagire fra di loro. Questa interazione è alla base della complessità di complessità che caratterizza tali assemblamenti. **Le cellule cresciute in vitro però non si organizzano come quelle in vivo.**

Soluzione: Gli organoidi. Potremmo definire un organoide come **un modello in vitro ingegnerizzato di tessuto**, contenente cellule. Quindi nell'organoide le cellule interagiscono tra loro "come nel" tessuto. Ora però recentemente (2021), dopo uno studio accurato che ha coinvolto esperti da 16 paesi, la definizione di organoide va vista in relazione al tipo di cellule da cui deriva. **L'organoide può definirsi tale se è costituito da cellule primarie, ossia derivate direttamente dalla dissociazione di un tessuto, sano o malato (ad esempio da un tumore).** Non sarebbero quindi classificabili come organoidi i sistemi cellulari a tre dimensioni derivati da linee cellulari, ossia da cellule che sono state isolate da un tessuto ma che hanno subito moltissimi passaggi in vitro fino ad acquisire caratteristiche omologhe e standardizzate, anche tra laboratori diversi. Le linee cellulari sono più facili da coltivare in laboratorio rispetto alle cellule primarie, ma non sviluppano le differenze naturali che esistono tra gli individui. Non consentono quindi ai ricercatori di testare se determinate terapie funzionano su gruppi specifici di pazienti. Lo studio è partito dai ricercatori dell'Università di Utrecht (Olanda), che per primi (circa 2009) hanno sviluppato organoidi derivati da un tessuto intestinale grazie all'ingegnerizzazione di una matrice tridimensionale appropriata.

Per arrivare ad un organoide quindi occorrono cellule staminali non differenziate (totipotenti, pluripotenti, multipotenti, oligopotenti, e unipotenti) purchè di origine tissutale e non dopo coltivazione in vitro. In sintesi le cellule devono non essere differenziate e la crescita in una matrice tridimensionale porta alla riproduzione miniaturizzata del tessuto o organo di partenza [la potenza è indice di capacità progressiva di

differenziarsi a partire dalle totipotenti a livello di zigote; per ulteriori chiarimenti sulle nomenclature cellulari si veda https://it.wikipedia.org/wiki/Cellula_staminale]

Qualche informazione

Dal 2009 la letteratura scientifica sugli organoidi ha raggiunto volumi considerevoli ad indicare l'interesse per questo tipo di modello in vitro. Le matrici tridimensionali che supportano la crescita 3D possono essere di materiale svariato (tra cui il collagene) e naturalmente la loro implementazione è brevettata.

Sono stati descritti organoidi per molti organi di topo e di uomo. Questi includono cervello, intestino, stomaco, fegato, polmone, rene, vasi sanguigni e cuore.

Uso degli organoidi: mentre per piante ed animali l'utilizzo è in ambito biotecnologico, gli organoidi umani vengono largamente utilizzati per comprendere i meccanismi molecolari dello sviluppo, rigenerazione e riparazione dei tessuti, per diagnostica, per modellizzare le malattie, tra cui i tumori, per capire l'efficacia dei farmaci, come banco di prova per nuovi farmaci, e in ambito di medicina personalizzata, per capire direttamente a livello molecolare come una stessa patologia possa manifestarsi in modo diverso e con reattività diversa da individuo ad individuo (<https://www.microbiologiaitalia.it/didattica/gli-organoidi-mini-organi-a-cavallo-tra-in-vitro-in-vivo-e-uomo/>)

PS: vorrei qui ricordare che la bistecca artificiale di cui in questi giorni si parla e che l'Italia ha "bannato" niente altro è una coltivazione in matrice tridimensionale di cellule muscolari di bovino...

Applicazioni recenti

- 1) **Gli organoidi cerebrali vengono utilizzati per studiare la neurobiologia umana all'interfaccia tra in vitro and in vivo**

Tra le svariate applicazioni, mi è parsa particolarmente interessante quella pubblicata di recente su Nature Electronics (Cai et al, dicembre 2023).

Sappiamo come il successo dell'Intelligenza artificiale (AI) sia sostanzialmente dovuto allo sviluppo delle Reti Neurali Artificiali, che processano enormi moli di dati con chip computazionali al silicio. L'addestramento di queste reti è comunque estremamente costoso, visto la quantità di energia necessaria al suo funzionamento e il tempo necessario per compierlo. I chip contengono transistor e il numero di transistor che un chip può montare ha raggiunto il limite fisico dettato dal problema della miniaturizzazione (la legge di Moore [il numero di transistor in un microchip raddoppia ogni due anni] è in saturazione). Per questa ragione tecnicamente c'è molto interesse per i chip neuromorfici. In un chip neuromorfico si sfrutta la complessità tridimensionale della rete cerebrale sinaptica. **Inciso:** Il cervello umano è una complicata rete tridimensionale di circa 200 miliardi di cellule, connesse da centinaia di milioni di miliardi di sinapsi (dimensioni il nanometro). Il cervello umano ha bisogno di circa 20 watt (joule/sec) per funzionare mentre una rete NN per funzionare necessita di almeno 8 milioni di watt; altro problema è il riscaldamento che le architetture AI producono. Quindi anche se l'architettura di un organoide al momento è una frazione risibile del volume cerebrale, la speranza è di utilizzare la naturale complessità cerebrale. Lo studio su Nature Electronics descrive **Brainware**, una interessante integrazione di organoidi cerebrali con un hardware consono.

"Il dispositivo è composto da un organoide formato da cellule cerebrali a vari stadi di sviluppo, collegate con degli elettrodi ad un computer tradizionale, responsabile della gestione di input e output. L'apparato è stato sviluppato utilizzando un protocollo di machine learning noto come reservoir computing, in cui le informazioni vengono elaborate da un reservoir (l'organoide in questo caso) che viene addestrato in modo non supervisionato, cioè senza nessuno che gli dica se quello che fa è giusto o sbagliato, mentre i suoi output vengono interpretati da un algoritmo addestrato sotto la supervisione degli sviluppatori.

Praticamente, il minicervello biologico viene lasciato libero di cambiare i propri stati interni e le connessioni tra neuroni in funzione degli input elettrici che riceve, senza che nessuno intervenga in questo processo, mentre un hardware elettronico legge i dati in uscita e viene addestrato per interpretarli ed effettuare previsioni e classificazioni su di essi.

Per verificare le capacità del loro Brainware i ricercatori lo hanno infatti messo alla prova su due compiti affidati di norma alle AI: il riconoscimento vocale e la soluzione di un problema matematico. Nel primo caso, al sistema sono state fornite 240 clip audio contenenti otto voci maschili che pronunciavano delle vocali, e gli è stato chiesto di identificare la persona registrata in ognuna delle clip. Nel secondo, è stato messo invece alla prova chiedendogli di prevedere l'evoluzione di un sistema dinamico, noto in matematica come attrattore di Hénon.

Brainware è stato messo al lavoro per due giorni sul primo problema, ottenendo un'accuratezza del 78% nel riconoscimento degli otto diversi parlanti delle clip audio. Un po' peggio, ma non di molto, di quanto ottenuto da rete neurale artificiale tradizionale. Nel secondo problema i risultati del biocomputer sono stati invece superiori a quelli di una rete neurale priva di memoria a lungo-breve termine (un meccanismo che permette di mantenere in memoria le informazioni elaborate in precedenza, fondamentale per il deep learning delle reti neurali), e di poco inferiori a quelle di una rete neurale con memoria a lungo-breve termine, che però necessita dell'equivalente di 50 giorni di addestramento di Brainware per raggiungere questi risultati (vedi <https://www.wired.it/article/computer-biologico-brainware-neuroni-umani-come-funziona/>)

Ritengo che questo tipo di ricerca all'avanguardia necessiti di riflessione.

2) Gli organoidi vengono utilizzati per comprendere le fasi dello sviluppo embrionale umano

Problema. A che punto è lo studio dell'auto-organizzazione delle cellule durante lo sviluppo e il differenziamento in vivo degli embrioni umani?

La crescita in substrati bidimensionali di cellule staminali ha permesso di ottenere importanti risultati (Dna replicazione, trascrizione, traduzione, ciclo cellulare e trasduzione del segnale). Il differenziamento tuttavia è un'attività tipica della organizzazione tridimensionale come discusso sopra.

Il livello di organizzazione di organoidi in questo settore vede la descrizione di blastoidi da blastociti (la prima ben organizzata struttura all'inizio dello sviluppo), e più recentemente di gastruloidi derivati da gastrulociti. Ricordiamoci che la gastrulazione è il processo complesso che codifica per il progetto del corpo portando alla differenziazione dei tre foglietti basilari dello sviluppo dell'embrione: ectoderma, mesoderma e endoderma da cui poi avrà origine il corpo. I gastruloidi recentemente descritti esprimono strutture che contengono cellule di tipo neurale, mesodermale ed endodermale. Inoltre se inserite in una apposita matrice (matrigel) mostrano somitogenesi (Nature 2020, 582, 405-409), cioè i prodromi di quei segmenti che nei vertebrati portano alla formazione di muscolo scheletrico, cartilagine, tendini, endotelio e derma.

Dalla pagina web del CNR (<https://www.cnr.it/it/comunicato-stampa/9952/gastruloidi-una-nuova-frontiera-per-la-ricerca>)

Oggi i ricercatori hanno a disposizione un nuovo strumento che apre prospettive inedite per la ricerca biomedica. "I gastruloidi sono organoidi embrionali e costituiscono un eccellente sistema modello, sia per studiare lo sviluppo di tessuti in condizioni normali o patologiche, sia per identificare geni, nutrienti (aminoacidi, lipidi, zuccheri), e condizioni fisicochimiche (temperatura, pressione di ossigeno, ecc.) che garantiscono un corretto sviluppo embrionale", prosegue la ricercatrice. "Il nostro team ha dimostrato che non tutte le cellule staminali embrionali di topo sono in grado di formare gastruloidi e che la loro competenza dipende dallo stato di pluripotenza. Mentre le cellule staminali più immature (naïve) sono in grado di

generarne, quelle in uno stadio più avanzato (primed) formano aggregati cellulari che non riescono a svilupparsi correttamente”.

Gli studi sui gastruloidi sono solo all’inizio e affiancano i tradizionali studi “in vivo”. L’aspettativa è quindi che, sul lungo termine, gli organoidi possano ridurre e in parte sostituire la sperimentazione animale. “Definire funzionalmente una cellula staminale richiede, ad oggi, l’utilizzo di modelli animali, i nostri studi suggeriscono che l’efficienza di formazione di un gastruloide è un valido modello “in vitro” per definire lo stato di pluripotenza di una cellula staminale. “Inoltre, la particolare configurazione e l’efficienza del metodo messo a punto dai ricercatori per generare gastruloidi, fa di questa metodologia una piattaforma ottimale per screening genetici e farmacologici sia per studi di ricerca di base che applicata”.

Da LE SCIENZE

(20 giugno 2023) Un gruppo di ricerca ha creato modelli di embrioni umani da cellule staminali (<https://www.theguardian.com/science/2023/jun/14/synthetic-human-embryos-created-in-groundbreaking-advance>)

(19 gennaio 2024): Il primo organoide di cervello ottenuto da tessuto fetale umano

Conclusione: Che sia arrivato il momento di riflettere? Possibili sviluppi futuribili: l’uomo artificiale? (da discutere)