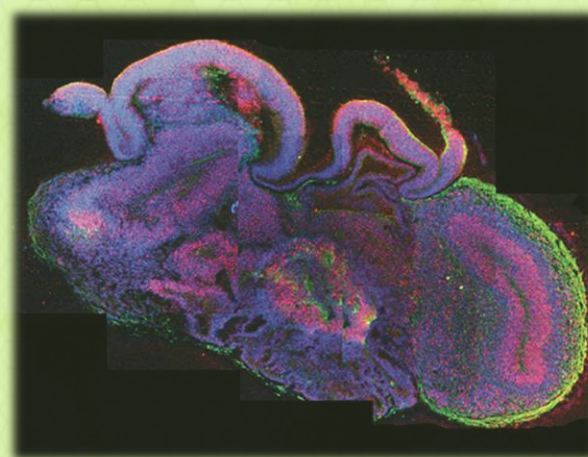


Organoidi

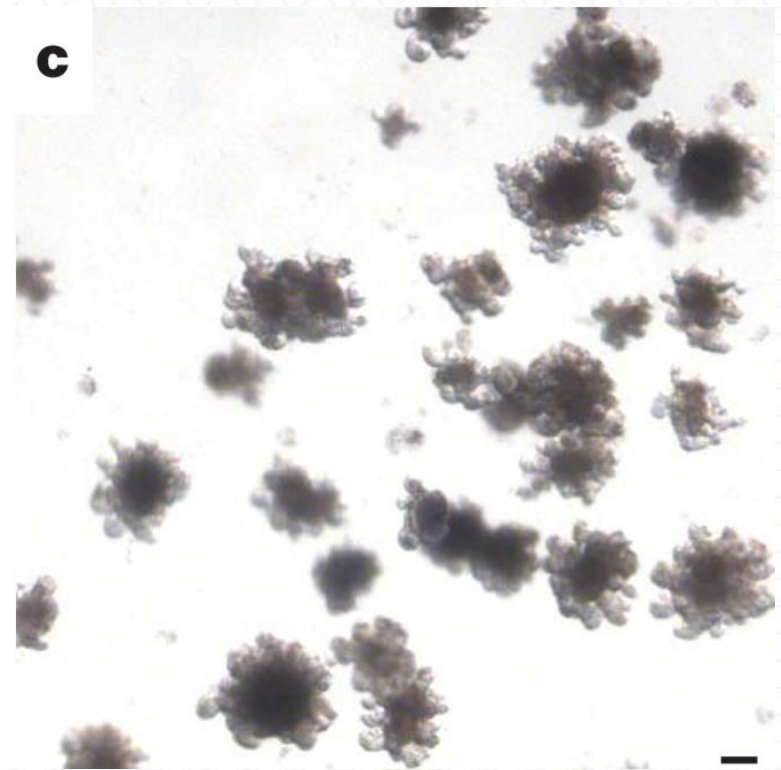
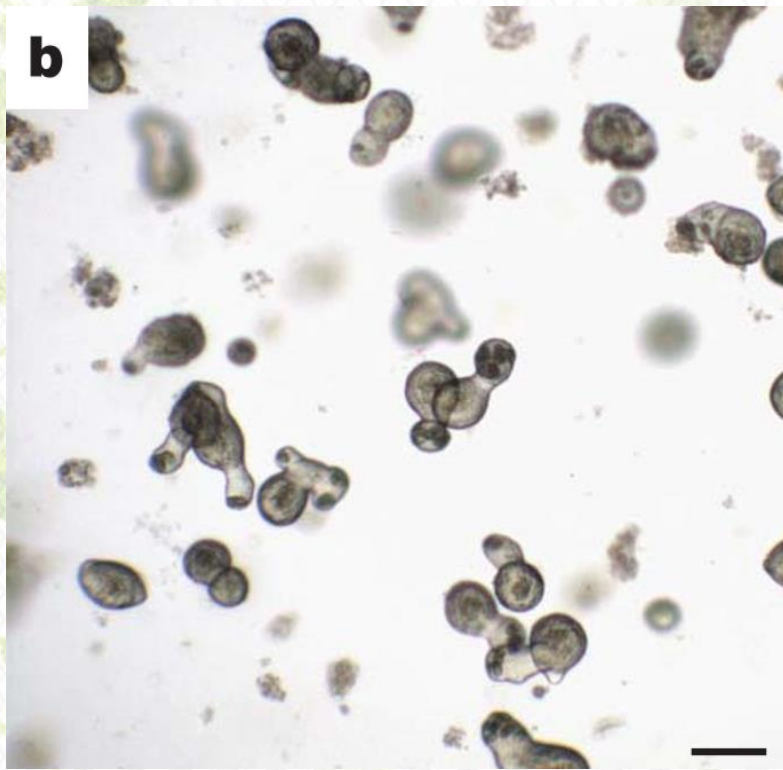


Simone Onorati
Tommaso Bagneschi
Samuele Bisconti
Alice Giannotti
Guglielmo Pacetta



Sommario

1. **Introduzione, storia e metodi di coltura**
2. **Applicazioni, limiti e prospettive future**
3. **Applicazione I:**
organoide per modellizzare un organo sano
4. **Applicazione II:**
organoide per modellizzare un organo infetto
5. **Applicazione III:**
organoide come modello di tumore



Introduzione
Storia
Metodi di coltura

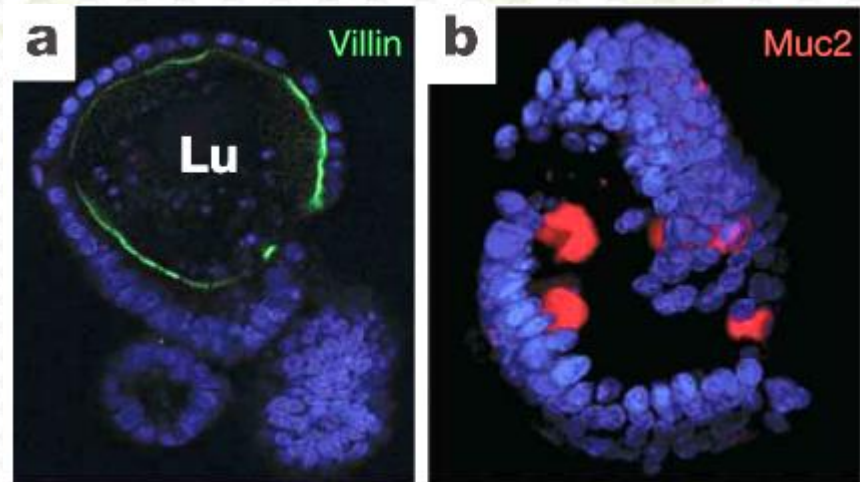
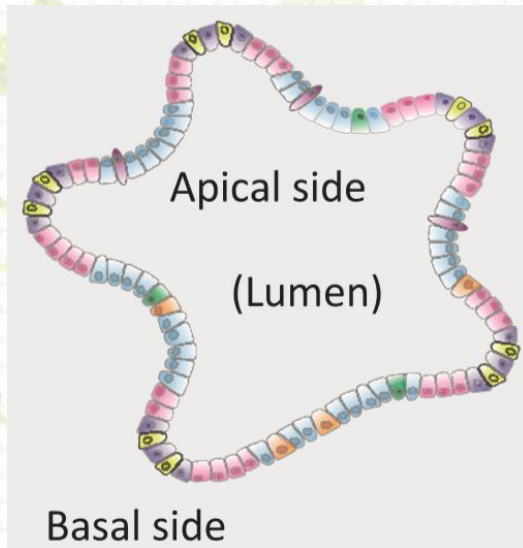


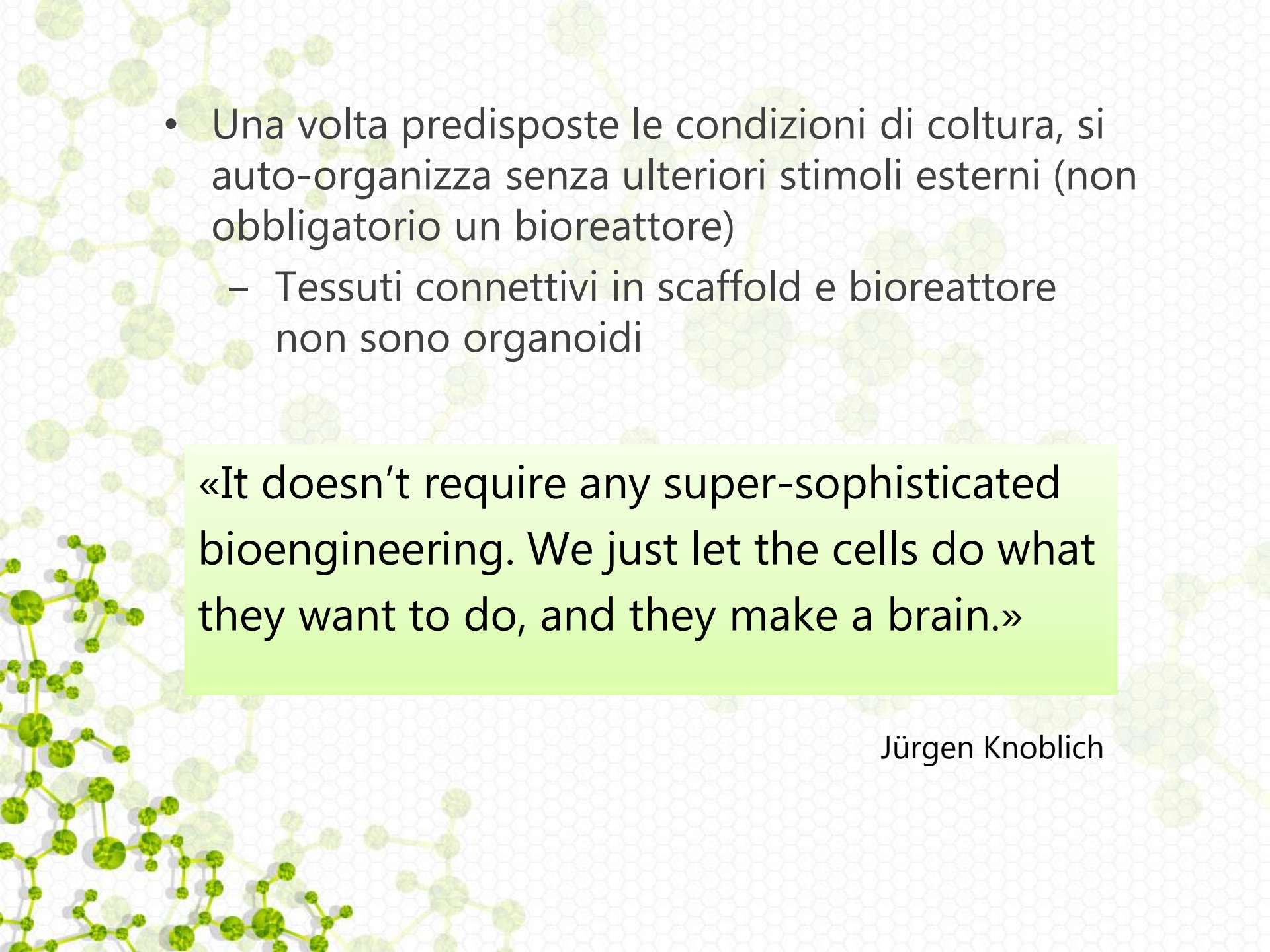
Organoide

Sistema biologico artificiale che si auto-genera dalla sua fonte, e riproduce l'intera *unità funzionale* di un organo, sia essa una singola o diverse adiacenti, costituendo una versione miniaturizzata ma fisiologicamente completa dell'organo naturale.

Organoide: «somigliante a un organo»

- È una struttura tridimensionale
- Ha sia tutti i fenotipi differenziati che una popolazione staminale autosostenente
- Origina solo da cellule staminali differenzianti, o direttamente da una biopsia
- Morfologia naturale solo a corto raggio



- 
- Una volta predisposte le condizioni di coltura, si auto-organizza senza ulteriori stimoli esterni (non obbligatorio un bioreattore)
 - Tessuti connettivi in scaffold e bioreattore non sono organoidi

«It doesn't require any super-sophisticated bioengineering. We just let the cells do what they want to do, and they make a brain.»

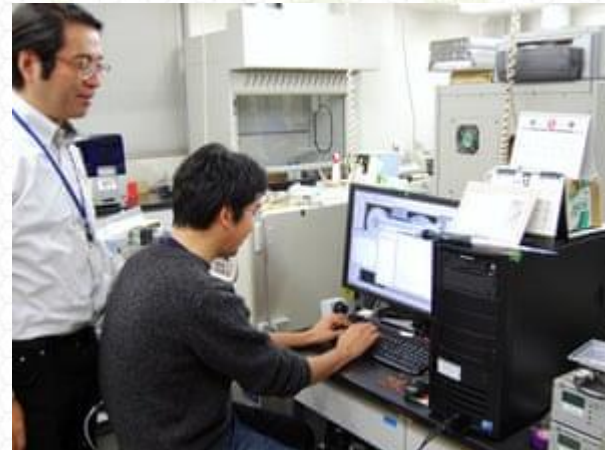
Jürgen Knoblich

La storia

1975, 1981, 1993: coltivazione di cute e retina stratificata, con impianto di successo su pazienti ustionati e ciechi: i primi «organoidi» (non come li intendiamo oggi)

2009: il primo organoide moderno. Clevers e altri (Utrecht, ND), pubblicano su Nature. Villi e cripte intestinali di topo

2012: Eiraku e Sasai (Kobe, JP) cercano di ottenere una micro-morfologia più precisa e un'organogenesi più fedele a quella naturale.



Il primo organoide moderno

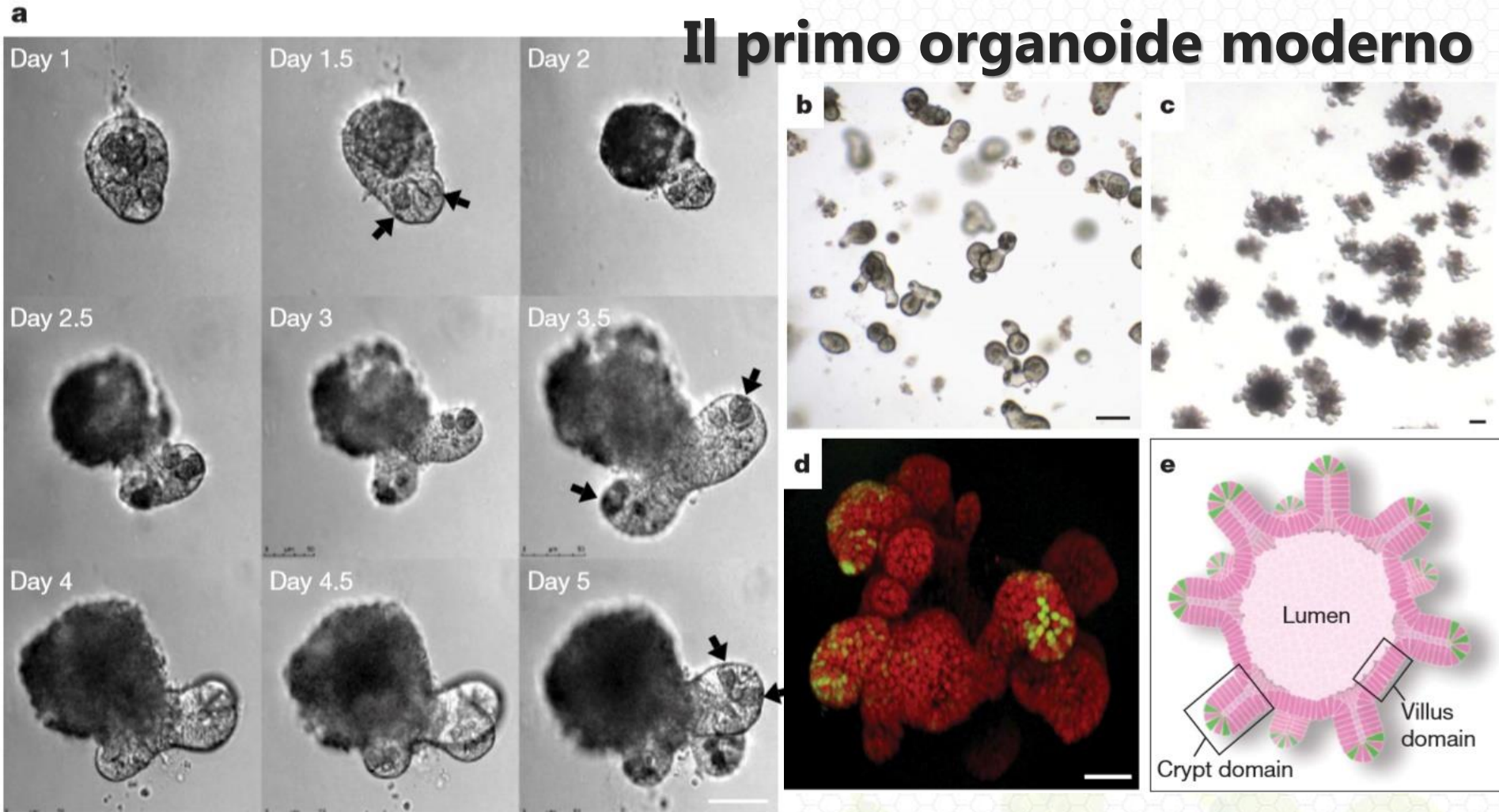
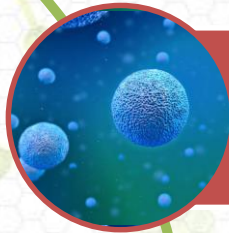


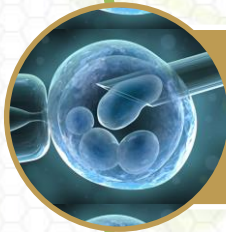
Figure 1 | Establishment of intestinal crypt culture system. **a**, Time course of an isolated single crypt growth. Differential interference contrast image reveals granule-containing Paneth cells at crypt bottoms (arrows). **b**, **c**, Single isolated crypts efficiently form large crypt organoids within 14 days; **b**, on day 5; **c**, on day 14. **d**, Three-dimensional reconstructed confocal image after 3 weeks in culture. Lgr5-GFP⁺ stem cells (green) are localized at the tip of crypt-like domains. Counterstain, ToPro-3 (red). **e**, Schematic representation of a crypt organoid, consisting of a central lumen lined by villus-like epithelium and several surrounding crypt-like domains. Scale bar, 50 μ m.

Sato T, Clevers H, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, 2009.

I tre elementi fondamentali



Fonte cellulare



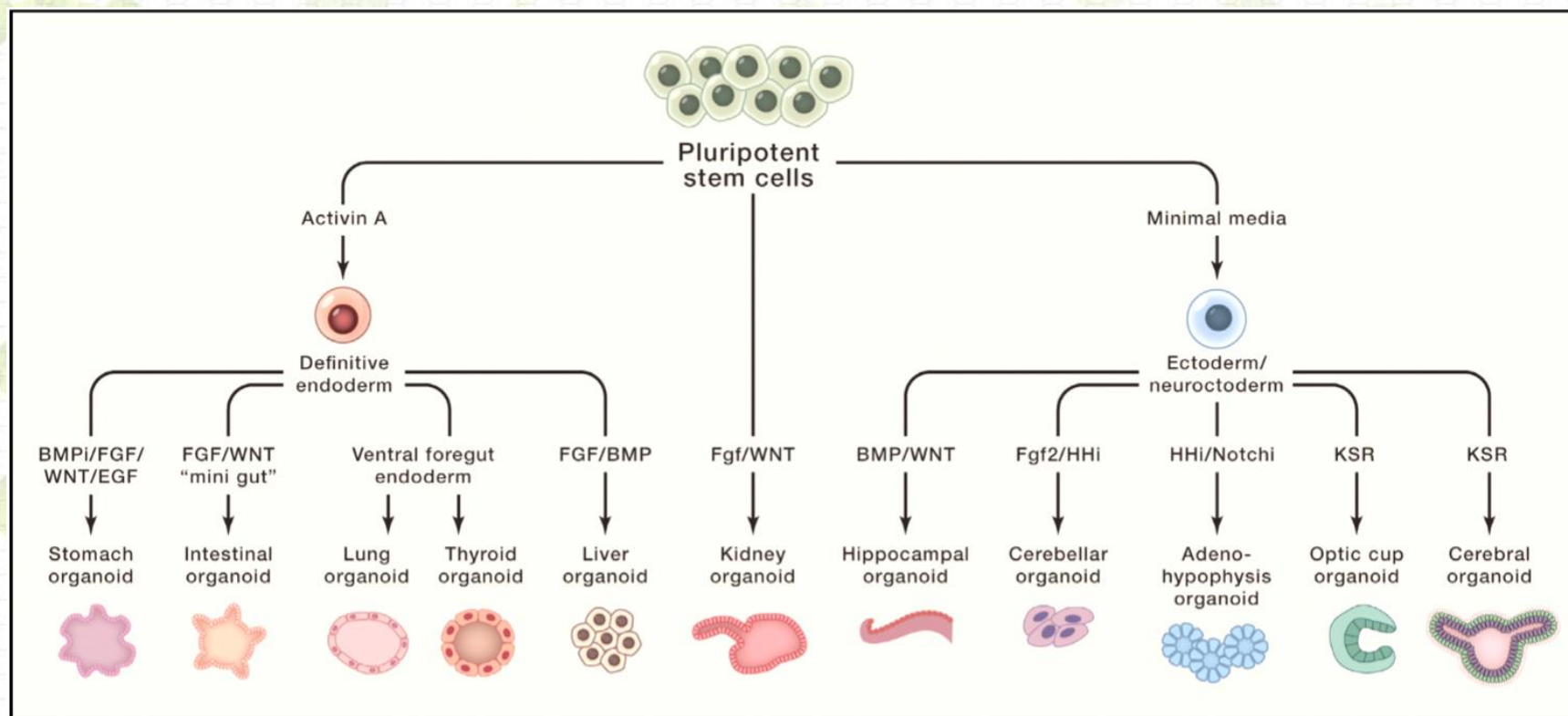
Matrice di supporto



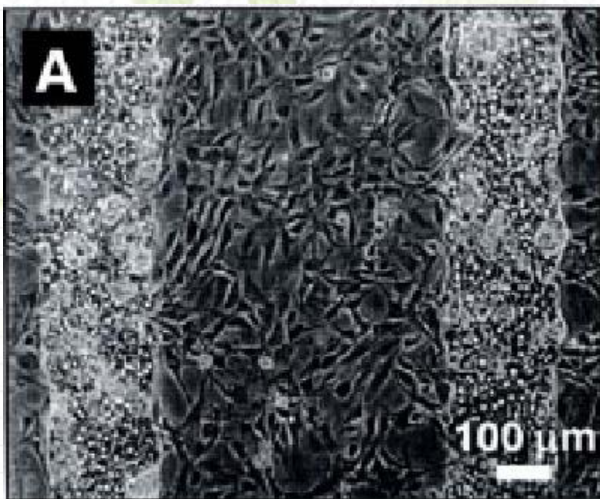
Medium di coltura

I – Fonti cellulari

- Linea cellulare staminale
 - ESC (PSC): embrionali, pluripotenti
 - ADSC: adulte, multipotenti
 - iPSC: adulte, indotte a tornare pluripotenti
- Biopsia dell'organo naturale



II – Matrice di supporto



- **Matrigel™** (soluzione liquida, essiccazione a gel durante l'incubazione)
 - Ottima bioattività (naturale), *ma*
 - Proprietà meccaniche non ripetibili
- Idrogeli di PEG
- Aggiunta di nano-topografia e/o coating di molecole adesive tramite tecniche di *soft-litography*
 - *Nano-impression lithography*
 - *Micro-contact printing*

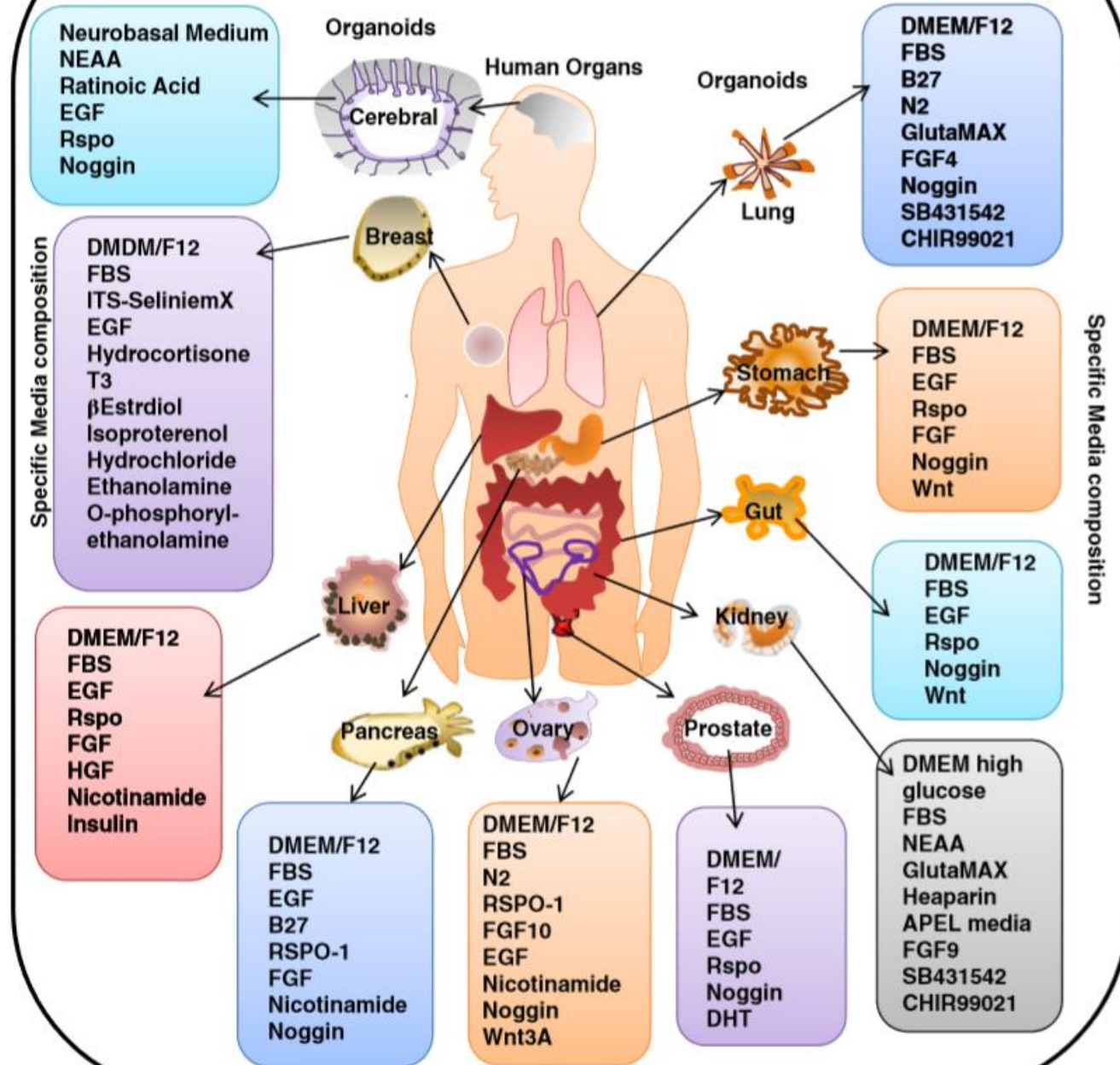
III – Medium con le «istruzioni»

Terreno di base

- Advanced Dulbecco's modified Eagle Medium
- HEPES (tampone)
- N-acetilcisteina (antiossidante)

Biomolecole-segnale comuni

- Wnt3a
- R-Spondina
- Noggina
- EGF
- Nicotinammide



Protocollo di coltura da biopsia

Intestinal biopsy

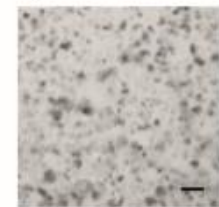


Mince tissue into small pieces

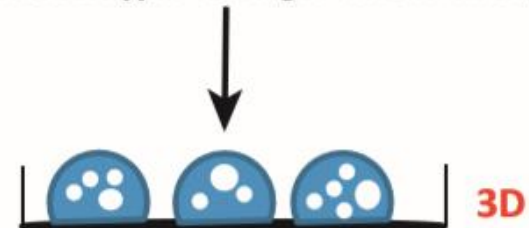
or

Isolate crypts from
intestinal biopsy

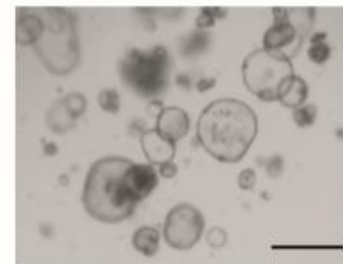
Isolate single cells
by enzymatic treatment



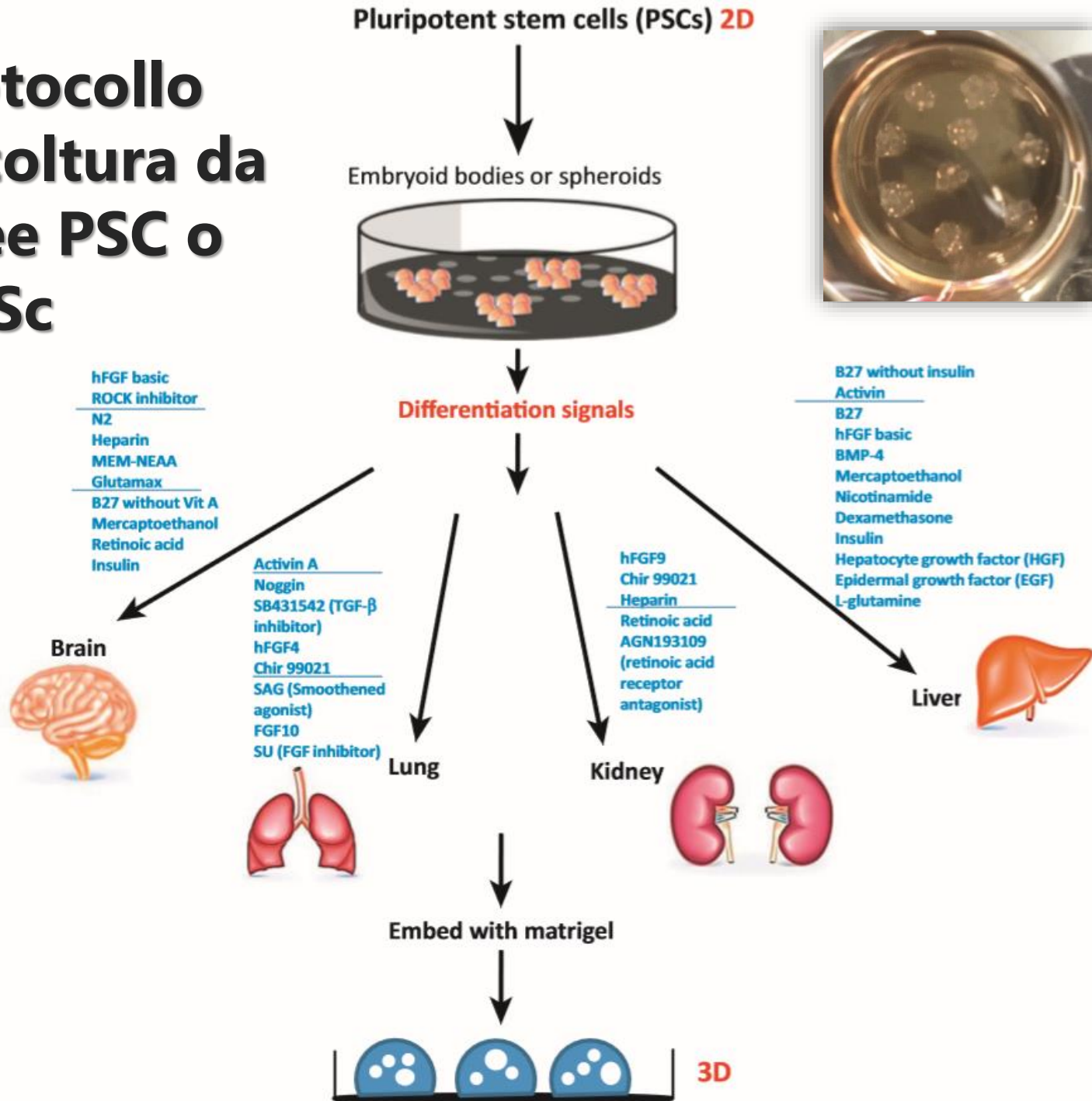
Embed isolated crypts or single cells in matrigel



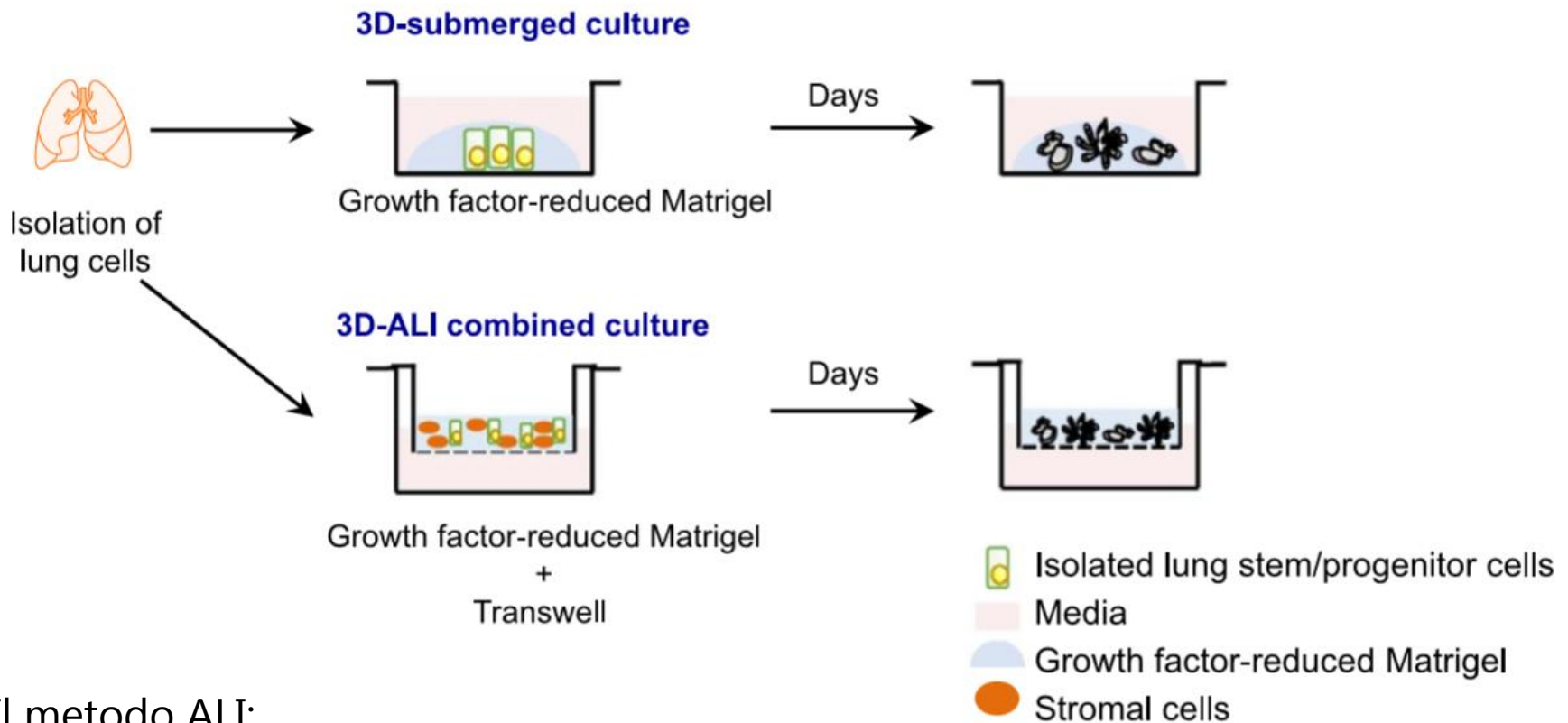
2-3 days



Protocollo di coltura da linee PSC o ADSc

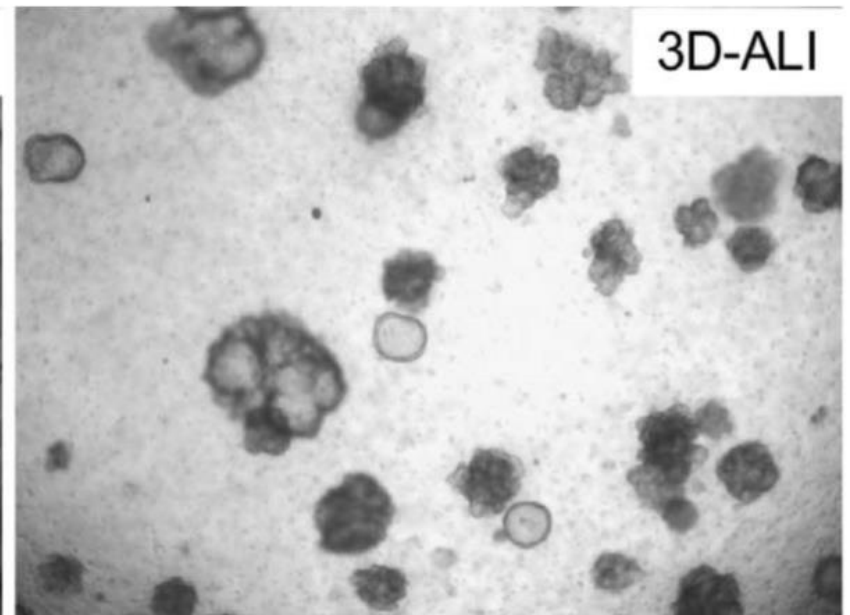
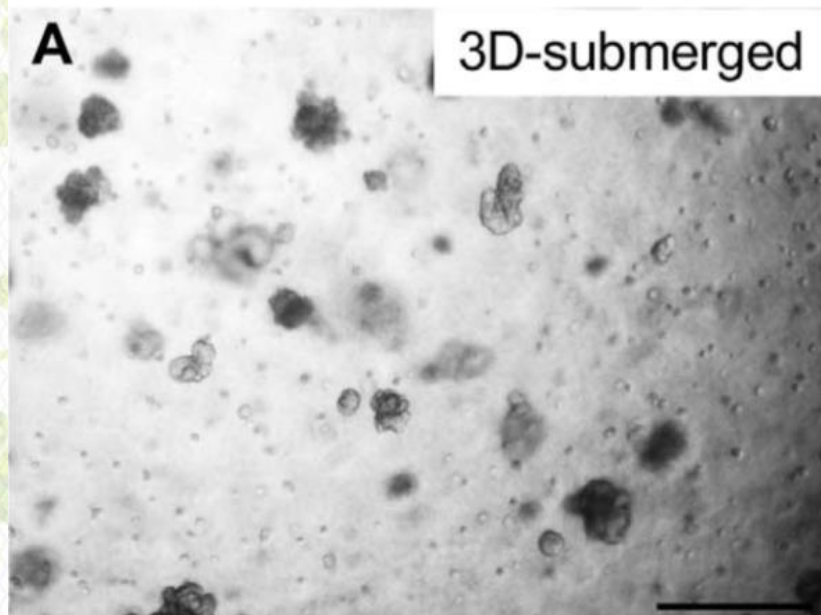


Coltura sommersa e coltura ALI

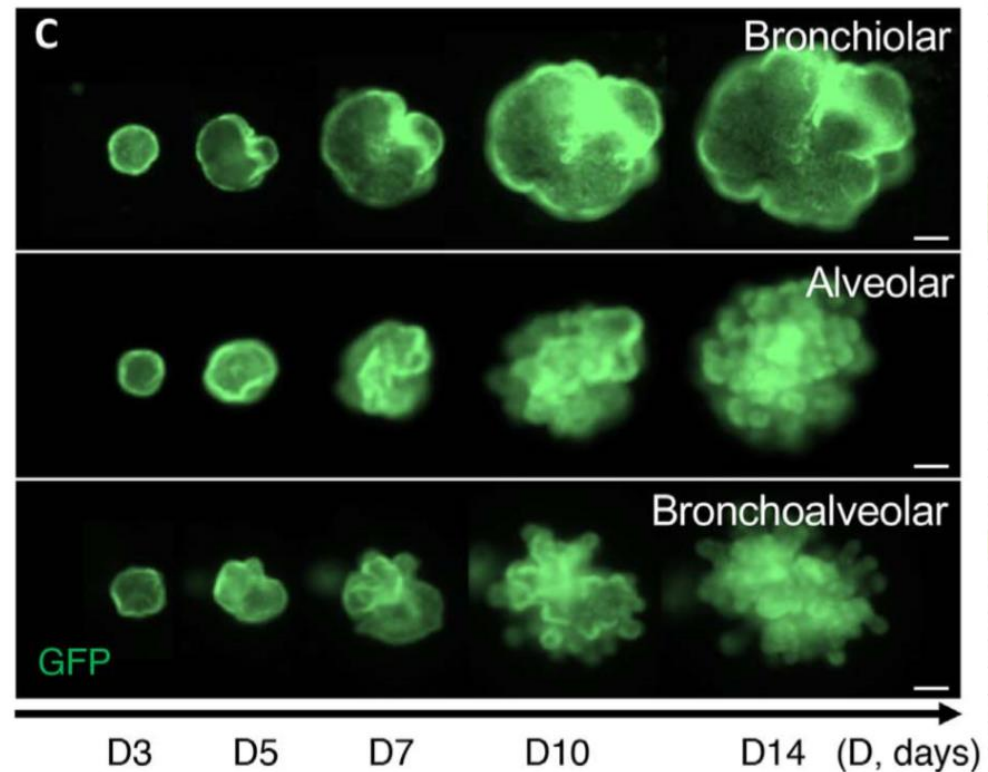


Il metodo ALI:

- Aumenta nettamente la perfusione di ossigeno, senza sacrificare quella dei nutrienti e dei biosegnali
- ALI riproduce la configurazione fisiologica per tutti gli organi a contatto con la superficie esterna



Choi J, Ilich E, Lee JH.
Organogenesis of adult lung in
a dish: Differentiation, disease
and therapy. *Developmental
Biology*, 2016





Applicazioni, limiti e prospettive future

Diversi tipi di organoidi

- Attraverso stimoli precisi le cellule staminali possono differenziarsi in cellule diverse e crescere ex vivo come organoidi.
- Possibile classificare gli organoidi :

Organoidi	Cellule di partenza	Composizione del medium
Cervello	ESC, iPSC	Neurobasal Medium, NEAA, Retinoic Acid, EGF, Rspo Noggin
Fegato	ASC, iPSC	DMEM/F12 FBS, EGF, Rspo, FGF, HG, Nicotinamide Insulin
Pancreas	ASC, iPSC	DMEM/F12 FBS, EGF, B27, RSPO-1, FGF, Nicotinamide Noggin
Stomaco	ASC, ESC, iPSC	DMEM/F12 FBS, EGF, Rspo, FGF, Noggin, Wnt
Intestino	ASC, ESC, iPSC	DMEM/F12 FBS, EGF, Rspo, Noggin, Wnt
Polmone	ASC, ESC, iPSC	DMEM/F12 FBS, B27, N2 GlutaMAX FGF4 Noggin, SB431542 CHIR99021
Fegato	ASC, iPSC	DMEM/F12 FBS, EGF, Rspo, FGF, HGF Nicotinamide Insulin

Tre esempi

Mini-encefalo

Mini-rene

Mini-polmone

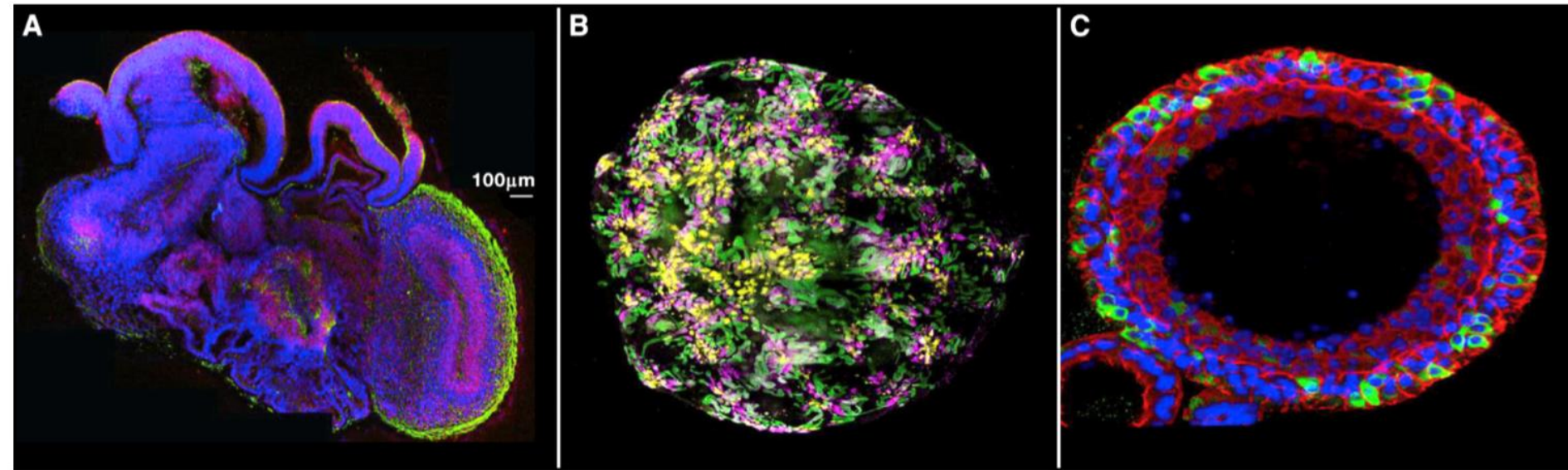


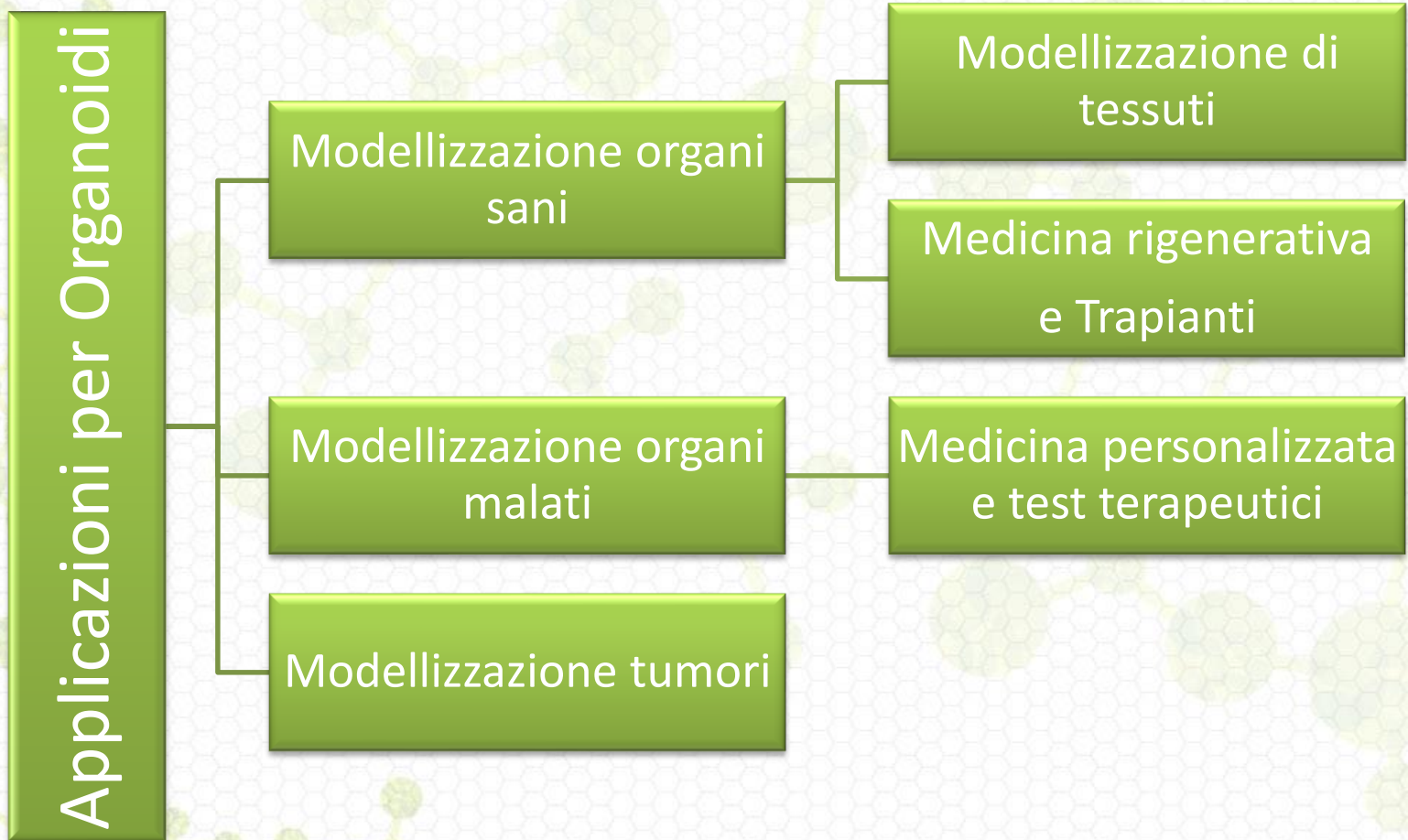
Figure 4. A “Mini-Brain” Generated from PSCs

(A) A complex morphology with heterogeneous regions containing neural progenitors (SOX2, red) and neurons (TUJ1, green) is apparent ([Lancaster et al., 2013](#)). Courtesy of Madeline Lancaster.

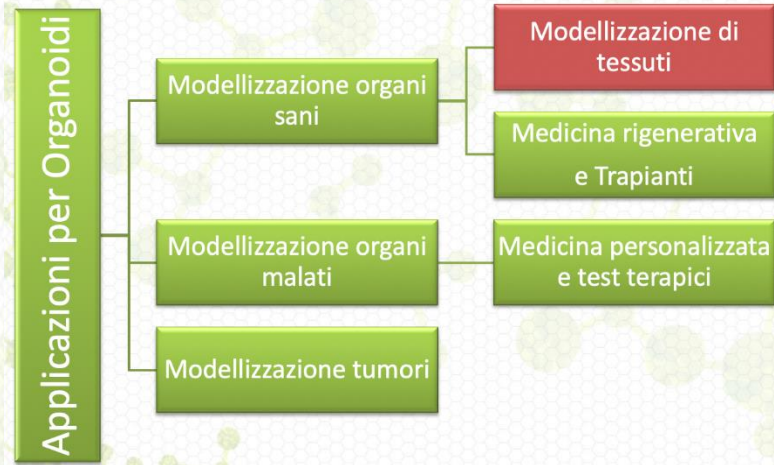
(B) Immunofluorescent image of an entire kidney organoid grown from PSCs with patterned nephrons. Podocytes of the forming glomeruli (NPHS1, yellow), early proximal tubules (lotus tetragonolobus lectin, pink), and distal tubules/collecting ducts (E-Cadherin, green). Courtesy of Melissa Little.

(C) 3D reconstruction of the midsection of a human aSC-derived lung organoid stained for intermediate filaments of basal cells (green), the actin cytoskeleton (red), and nuclei (blue) and imaged by confocal microscopy (N. Sachs and H.C., unpublished data).

Classificazione in base all'applicazione



Modellizzazione di tessuti



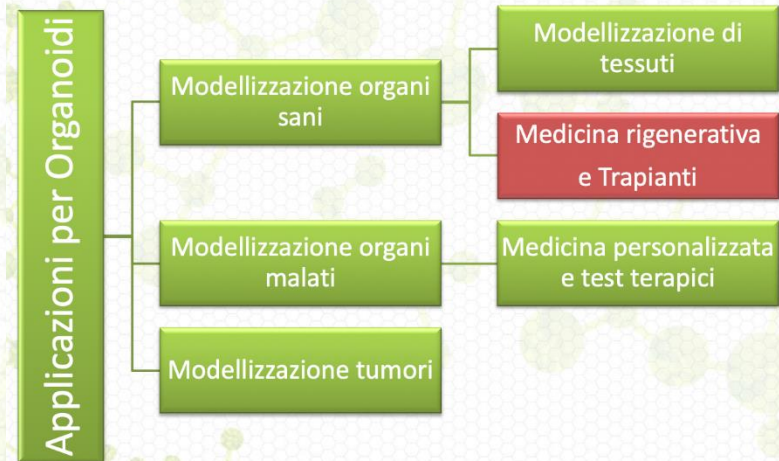
- *Biologia dello sviluppo*
- *Morfogenesi*
- *Omeostasi, auto-rinnovamento e differenziazione*
- *Eventi rigenerativi in organi adulti
(es. organoidi di fegato e stomaco derivanti da cellule progenitrici adulte)*

Medicina rigenerativa e trapianti

Causa alta richiesta di donatori e bassa probabilità di successo causa rigetto (es. trapianto di reni), gli organoidi possono essere un'alternativa per trapianti di cellule, tessuti o organi.

Esempi:

- *Trapianto organoidi di reni in topi adulti*
- *Organoidi intestinali per trattare colon danneggiato o malato*



Medicina personalizzata e test terapeutici

Modellizzazione della malattia per migliorare i test terapeutici.

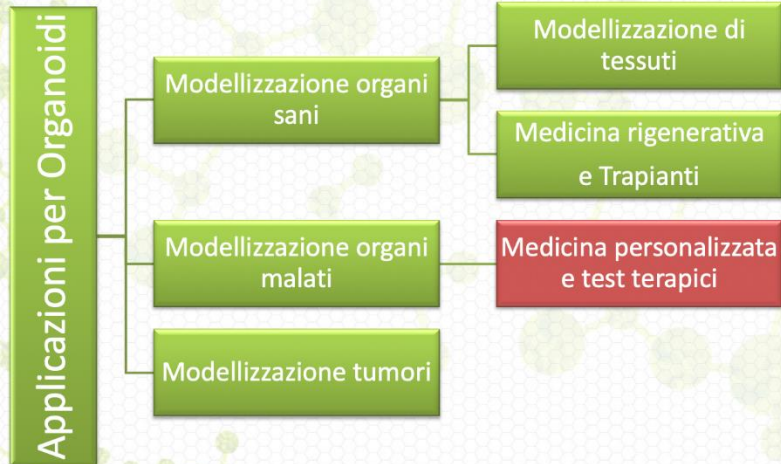
Gli organoidi sono più affidabili e fisiologici, per screening e scoperta di nuovi farmaci.

Esempi:

- *Uso organoidi intestinali per modellizzare infezione retrovirale e terapia antivirale*
- *Uso organoidi colangiocitici derivati dal paziente per correggere il mal ripiegamento la proteina CFTR*

Limite:

Ancora in via di sviluppo ma offrono un grande potenziale nell'ambito di sviluppo di nuove terapie



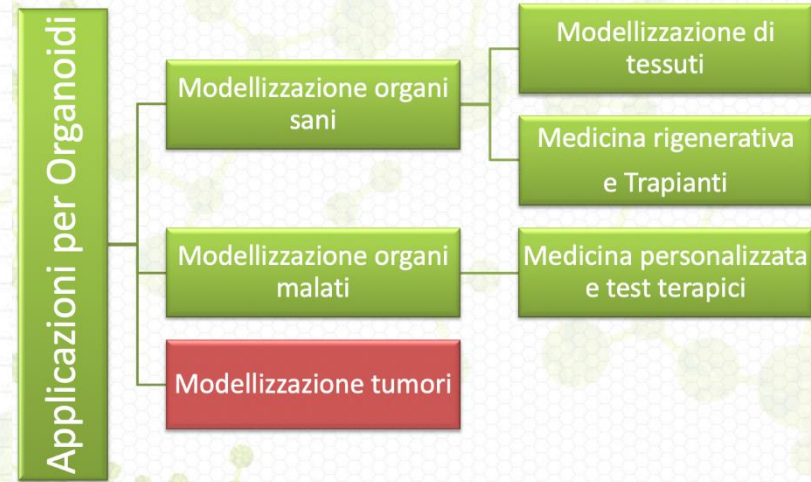
Strumento per studiare il cancro

Organoidi derivanti dal paziente malato forniscono profili di espressione genica e caratteristiche istologiche del tumore di origine, quindi ottimi per lo sviluppo di precise strategie di trattamento.

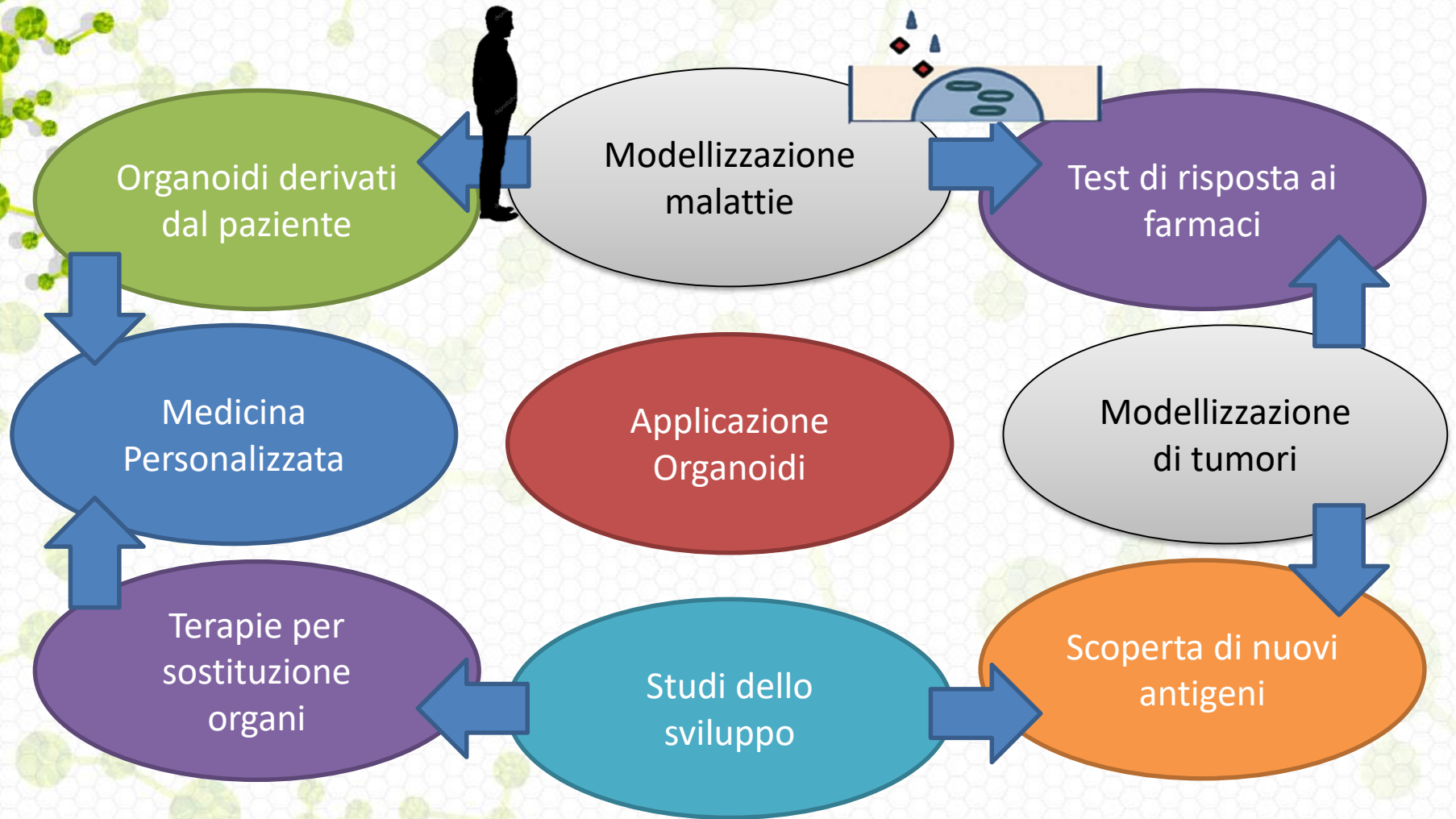
- Studio sviluppo tumore ex vivo
- Screening di più farmaci
- Test nuove terapie
- Prevenire effetti tossici

Esempi:

- *Organoidi di tre tipi di tumore al fegato usati per studiare malattia e risposta ai test terapeutici*



Collegamenti tra le applicazioni





Limitazioni (1):

- **Maturazione:**
in particolar modo per organoidi retinici e cerebrali, nei primi momenti si osserva un'organizzazione intatta, ma il tessuto non riesce a svilupparsi in organo funzionante maturo. Tuttavia gli organoidi intestinali esprimono le cellule Lgr5+, tipiche di un tessuto in fase di maturazione

Possibile soluzione:

- impianto per il completamento della maturazione



Limitazioni (2):

- **Non vascolarizzazione**
l'assenza di vascolarizzazione causa una limitazione nell'apporto di nutrienti

Possibili soluzioni:

- Utilizzo di bioreattori rotanti che forniscono un miglior scambio di nutrienti
- Co-coltivazione di cellule epiteliali che possono generare una 'rete vascolare'



Limitazioni (3):

- **Assenza componenti stromali e immunitarie:**
la mancanza di tali componenti ostacola l'uso di organoidi per modellizzare la risposta infiammatoria e studi sulla penetrazione di farmaci
- **Eterogeneità:**
l'eterogeneità di vitalità, dimensione e forma complica l'analisi dei dati e la progettazione degli studi



Prospettive future:

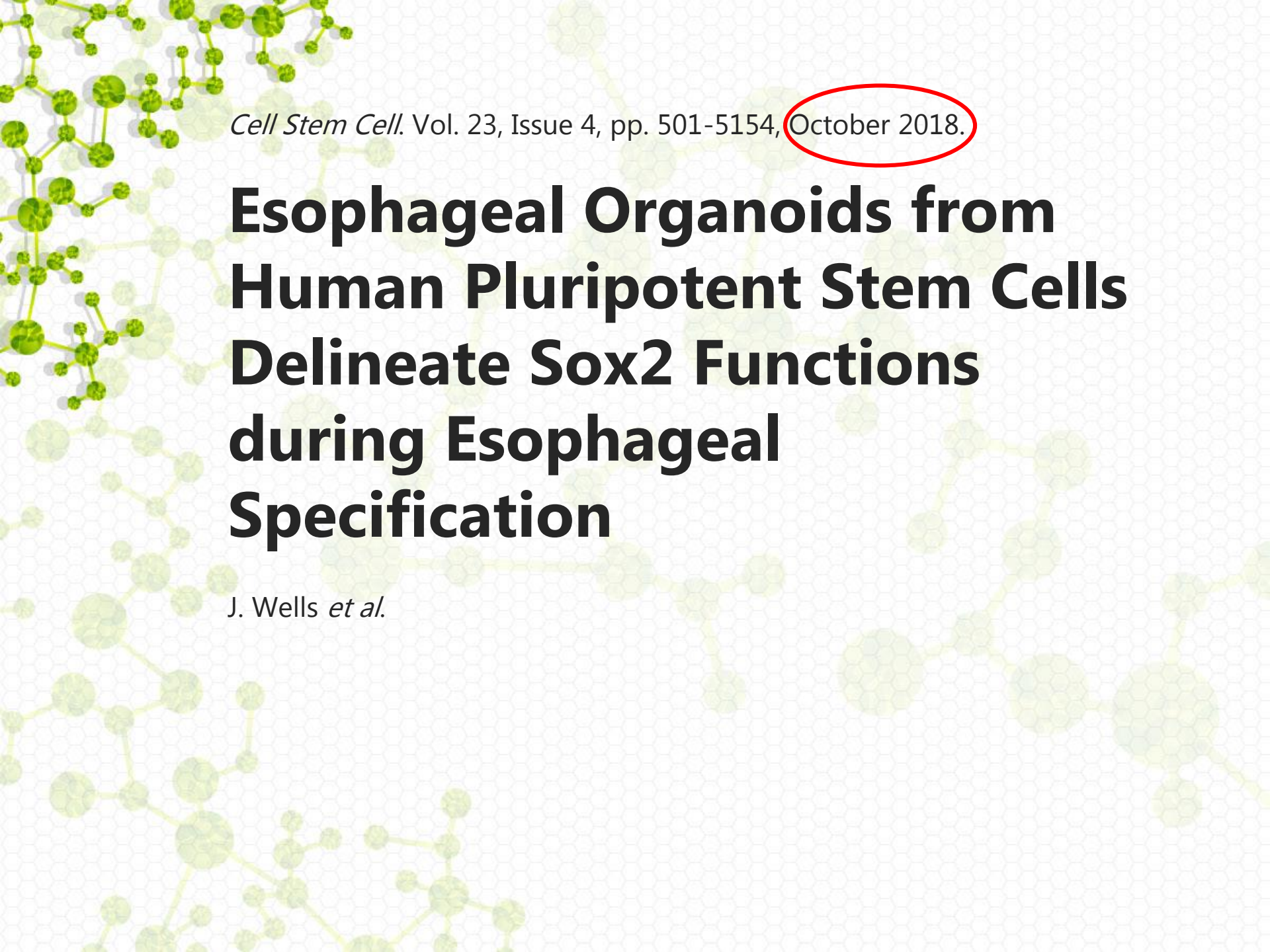
- Sviluppo di co-culture con cellule epiteliali, cellule immunitarie e altri tipi di cellule
- Migliorare il mezzo di coltura ed evitare matrici di derivazione animale
- Utilizzare gli organoidi come metodo alternativo all'impiego di animali ad uso sperimentale



Applicazione I :

Organoide come modello di tessuto/organo in condizioni fisiologiche

- Esofago
- Pelle con follicoli piliferi



Cell Stem Cell. Vol. 23, Issue 4, pp. 501-5154, October 2018.

Esophageal Organoids from Human Pluripotent Stem Cells Delineate Sox2 Functions during Esophageal Specification

J. Wells *et al.*

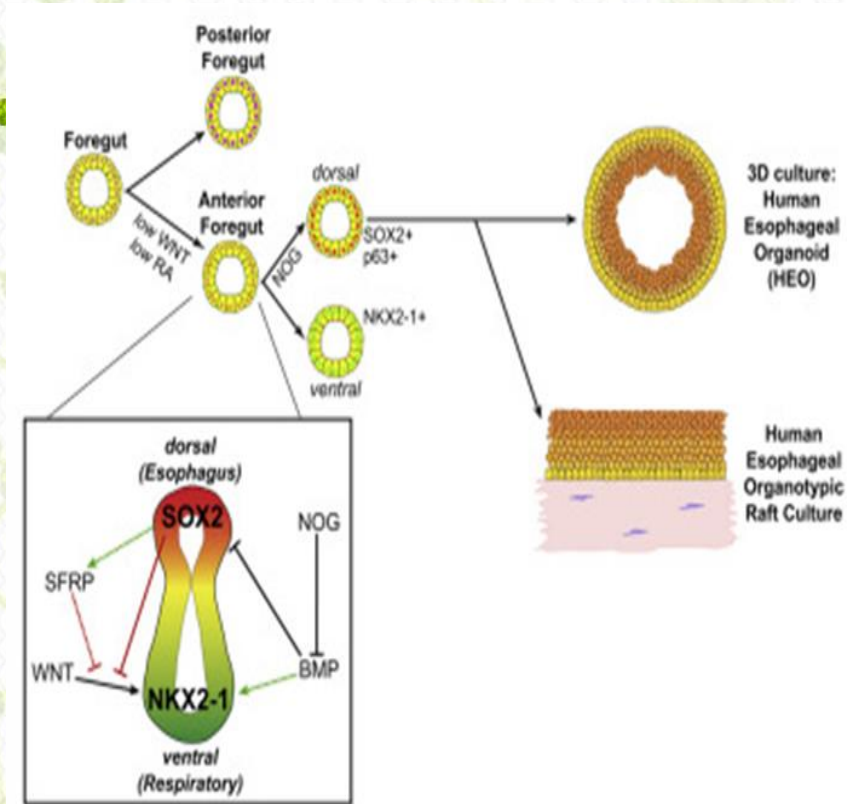


Introduzione

Disordini tracheali ed esofagei sono molto diffusi nell'uomo e difficili da modellare accuratamente nei topi.

Esigenza di modelli affidabili grazie ai quali poter studiare tale apparato.

Materiali e Metodi



- Organoide ottenuto per diretta differenziazione di cellule staminali umane pluripotenti (PSCs).
- Utilizzo di fattori di crescita (BMP), di metaboliti (RA) e segnali di trasduzione intracellulare (Wnt).
- Differenziazione dell'endoderma in porzione cefalica dell'intestino: posteriore e anteriore (AFG).
- Sviluppo dello sferoide dorsale dell'AFG in organoide umano esofageo 3D (HEO).



Risultati (1)

I tessuti esofagei mostrano:

- cellule progenitrici (multipotenti) basali proliferativi;
- epitelio squamoso stratificato differenziato;
- corrispondenza nella composizione con tessuti umani prelevati attraverso biopsie a seguito di analisi biochimiche.

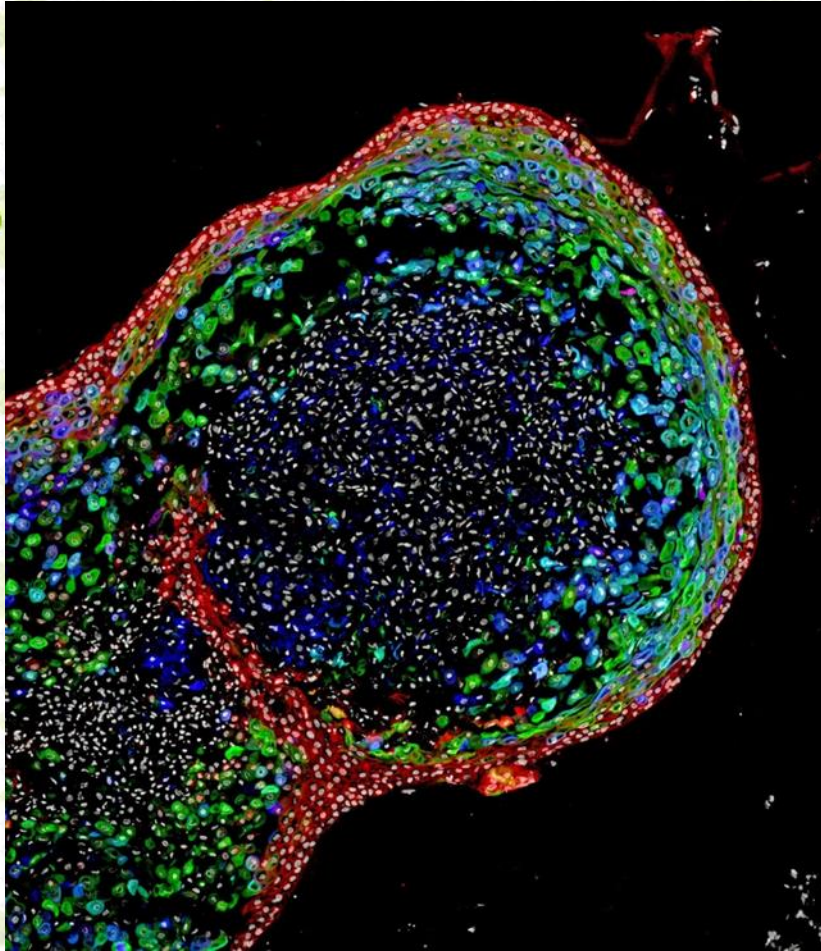


Risultati (2)

HEO utile per indagine clinica su difetti congeniti, come l'atresia esofagea.

- È stato individuato il ruolo nello sviluppo esofageo del gene Sox2 e della relativa proteina associata.
- Il gene Sox2 blocca, attraverso la repressione delle vie di segnalazione della molecola Wnt, la programmazione e l'azione dei percorsi genetici che dirigono le cellule a diventare respiratorie anziché esofagee in AFG.
- Coerentemente, l'inibizione di Sox2 nei topi provoca l'agenesia esofagea, una patologia che impedisce all'esofago di connettersi allo stomaco.

Risultati (3)



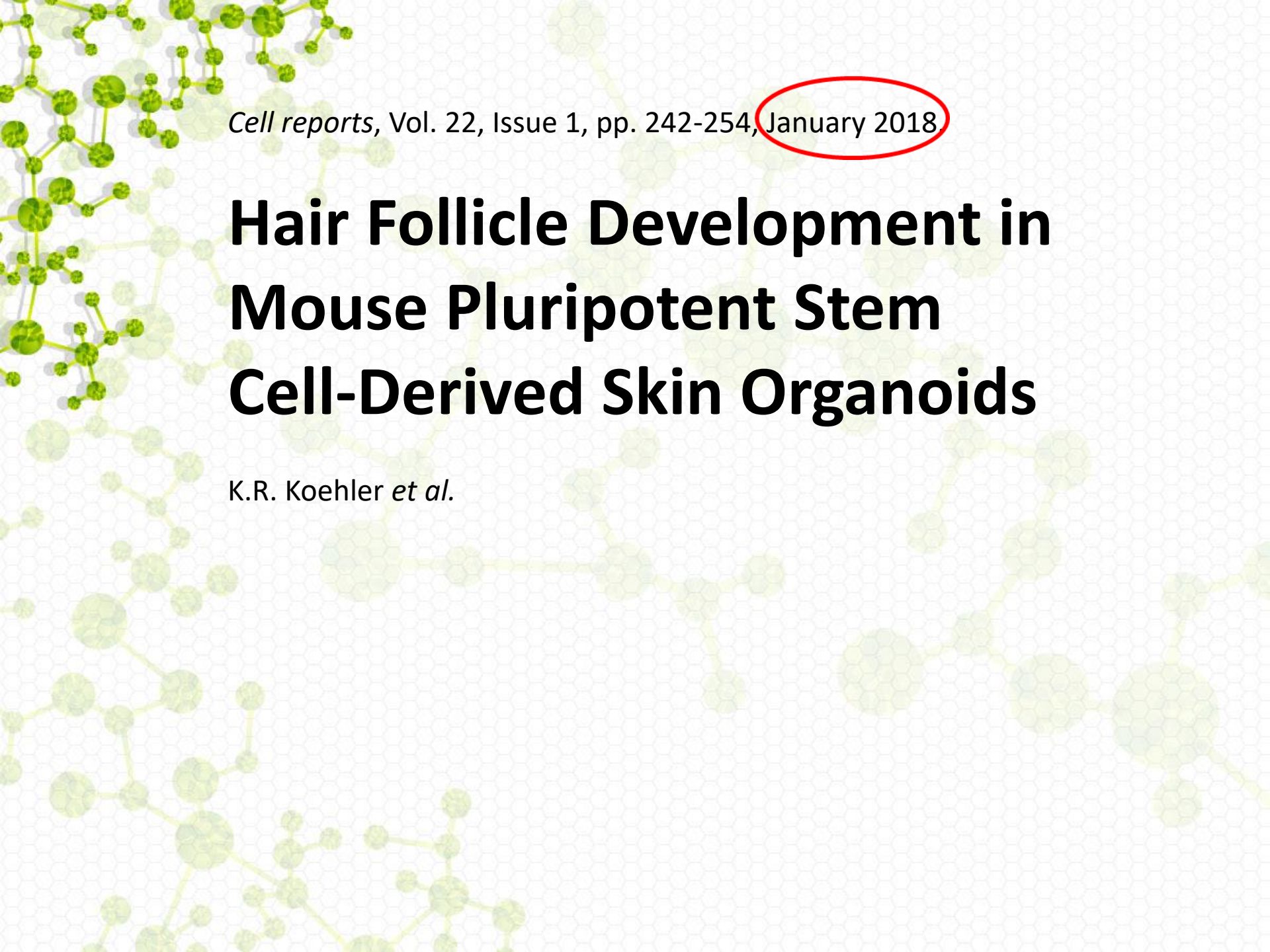
- Immagine al microscopio confocale.
- Organoide 3D esofageo umano di due mesi.
- Lunghezza di 700 micrometri.
- Proteine strutturali evidenziate: involucrina (verde) e cornulina (blu).



Discussioni e conclusioni

Gli HEO rappresentano un potente strumento:

- per la modellizzazione di patologie congenite;
- per l'ingegneria tissutale e la medicina rigenerativa;
- per la medicina personalizzata di disturbi gastrointestinali come il reflusso, l'esofagite eosinofila e la metaplasia di Barrett.



Cell reports, Vol. 22, Issue 1, pp. 242-254, January 2018

Hair Follicle Development in Mouse Pluripotent Stem Cell-Derived Skin Organoids

K.R. Koehler *et al.*



Introduzione (1)

Il sistema tegumentario è l'insieme della pelle e delle sue appendici, come follicoli piliferi (HF), ghiandole sudoripare e unghie.

La pelle, in particolare, è composta da due strati, l'epidermide e il derma. Mentre l'epidermide della pelle nasce dall'ectoderma, il derma ha origini dal mesoderma.

Per lo sviluppo terminale tutti i tipi di pelle richiedono l'interazione di cellule epiteliali e mesenchimali.

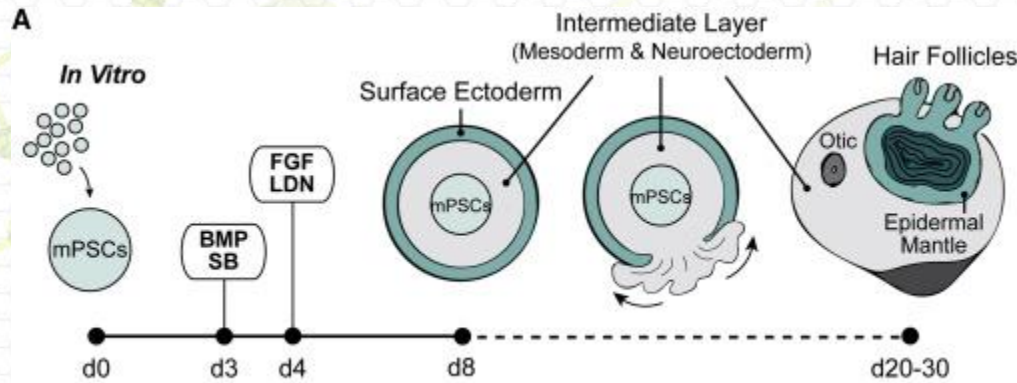


Introduzione (2)

Antecedentemente a questo studio:

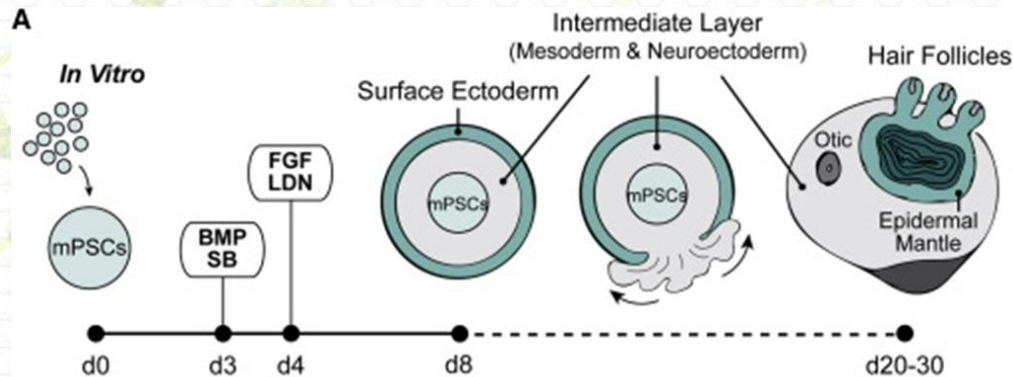
- Nei modelli animali e di pelle umana, i HF sono stati ottenuti soltanto mediante colture di cellule mesenchimali isolate dalla pelle embrionale e cellule epiteliali, combinate con trapiantati *in vivo*.
- Le strategie di derivazione della pelle *in vitro* si sono concentrate sulla generazione di cheratinociti e fibroblasti da PSC in colture separate prima, e poi combinando i due tipi di cellule per formare un doppio strato.
- Tuttavia, non è stata individuata una procedura per la generazione di pelle follicolare da PSC *in vitro*.

Materiali e Metodi (1)



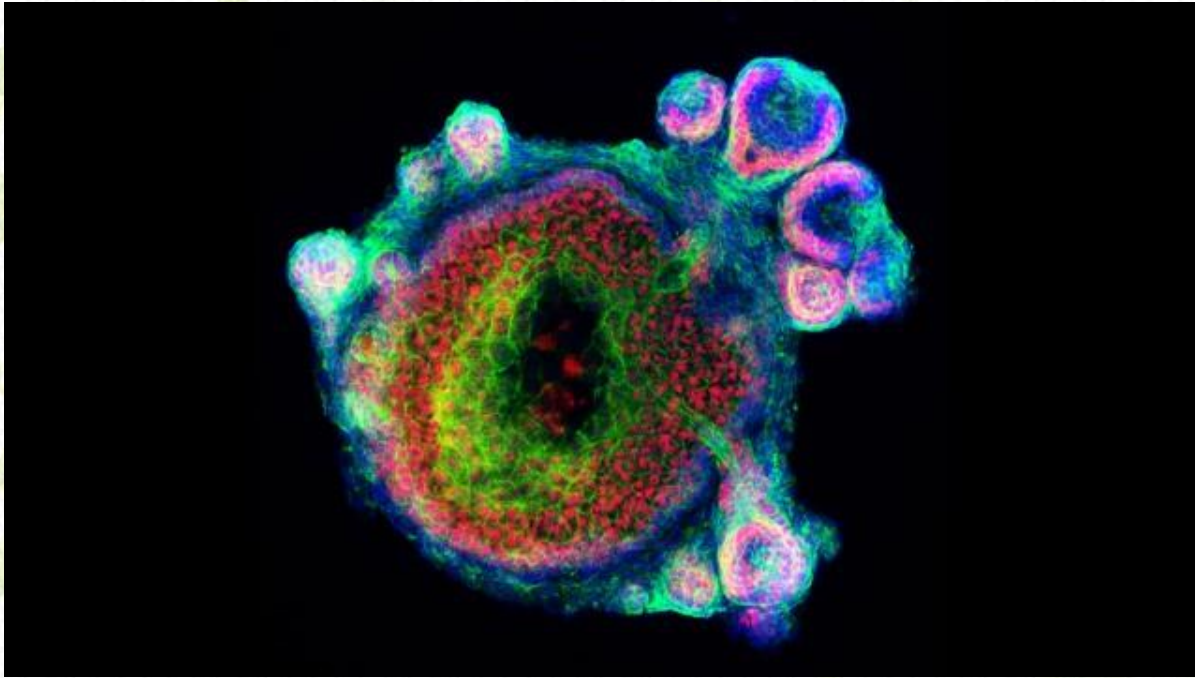
- Il giorno 0 della differenziazione, iPSCs da fibroblasti embrionali di topo sono state coltivate come un aggregato in assenza di siero.
- Il giorno 3, l'aggregato è stato trattato con un inibitore del fattore di crescita trasformante beta (SB) e con il fattore di crescita osseo morfogenetico (BMP) per indurre l'ectoderma superficiale.
- Il giorno 4 l'aggregato è stato trattato con fattori di crescita dei fibroblasti (FGF) e inibitore di BMP (LDN) per indurre l'epitelio placodale.

Materiali e Metodi (2)



- Al giorno 8, l'aggregato comprende un nucleo di PSC indifferenziato, uno strato intermedio contenente cellule di mesoderma e neuroectoderma e uno strato più esterno di ectoderma di superficie.
- Dal giorno 8, l'aggregato si trova in un medium di maturazione e subisce una trasformazione "inside-out" quando lo strato intermedio fuoriesce per coprire l'ectoderma di superficie, con la formazione occasionale di strutture sporgenti simili a bulbi che ricordano gli HF.

Risultati (1)



Gli organoidi della pelle derivati da cellule staminali pluripotenti indotte di topo ripercorrono i passaggi chiave dello sviluppo tegumentario e hanno la capacità di generare HF *ex novo*, un processo che simula la normale follicolo-genesi dei peli embrionali.

Risultati (2)

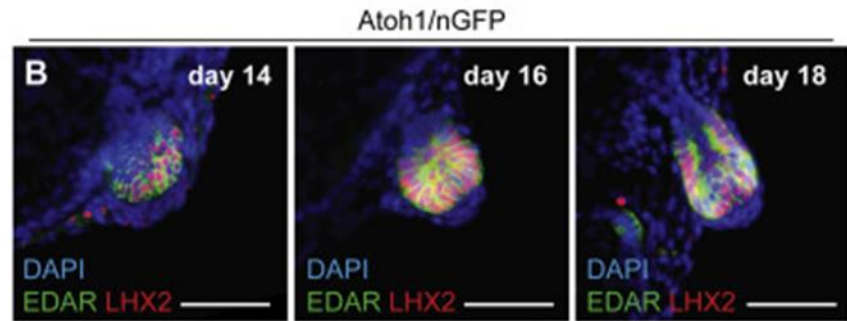
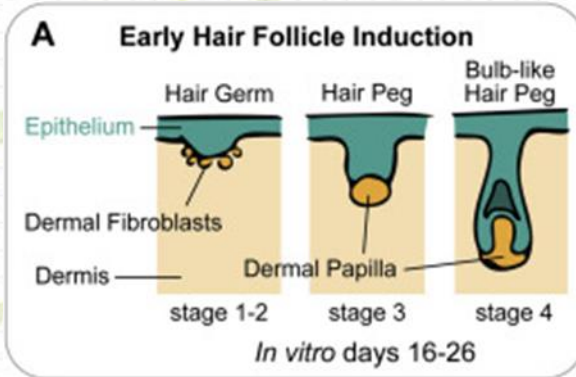
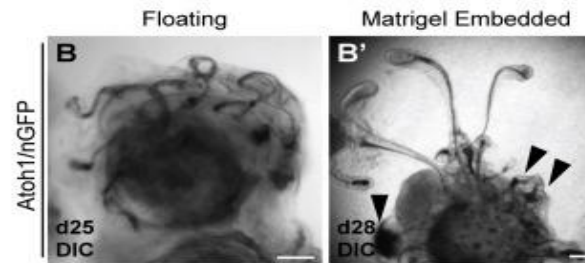
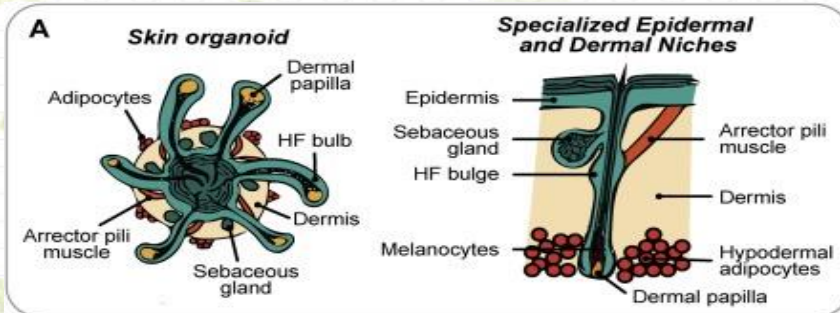


Illustrazione dei primi quattro degli otto stadi dello sviluppo di HF nativo: germe dei capelli, piolo e formazione del bulbo.



Gli organoidi cutanei di stadio tardivo (giorno 20) consistono in epidermide, derma e HF (A).

Immagini DIC di HF con morfologia impigliata in coltura fluttuante (B) e HF con morfologia protrusa in Matrigel (B').



Discussioni e conclusioni (1)

A differenza degli studi precedenti, che in genere hanno sviluppato separatamente diversi strati della pelle e poi li hanno combinati in seguito, le cellule staminali sono state coltivate in un mezzo 3D appositamente sviluppato, determinando lo sviluppo simultaneo sia degli strati superiori che inferiori della pelle in un unico organoide.

Questo approccio è accettabile per un **organoide** in quanto, per una struttura che **non è semplicemente la somma delle singole parti**, la presenza delle interconnessioni tra i vari strati cellulari è necessario.



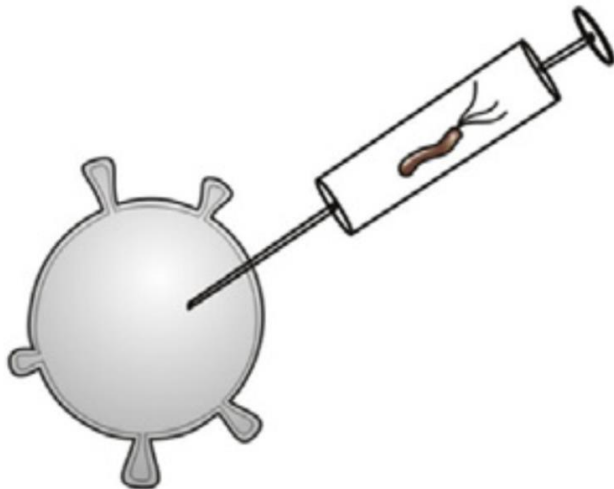
Discussioni e conclusioni (2)

La derivazione di più strati germinali all'interno di un singolo aggregato di cellule staminali può essere una strategia generale per produrre la pelle portatrice di peli da poter trapiantare sul paziente. Tuttavia, ad oggi, questo approccio rimane scarsamente definito.

Questo modello in vitro sarà utile per studiare i meccanismi di induzione del follicolo pilifero, valutare la crescita dei peli o l'effetto di farmaci inibitori e modellare le malattie della pelle.

Applicazione II :

Modelli di malattie infettive



Schema e immagine di brightfield di microiniezione di H. pylori in un organoide

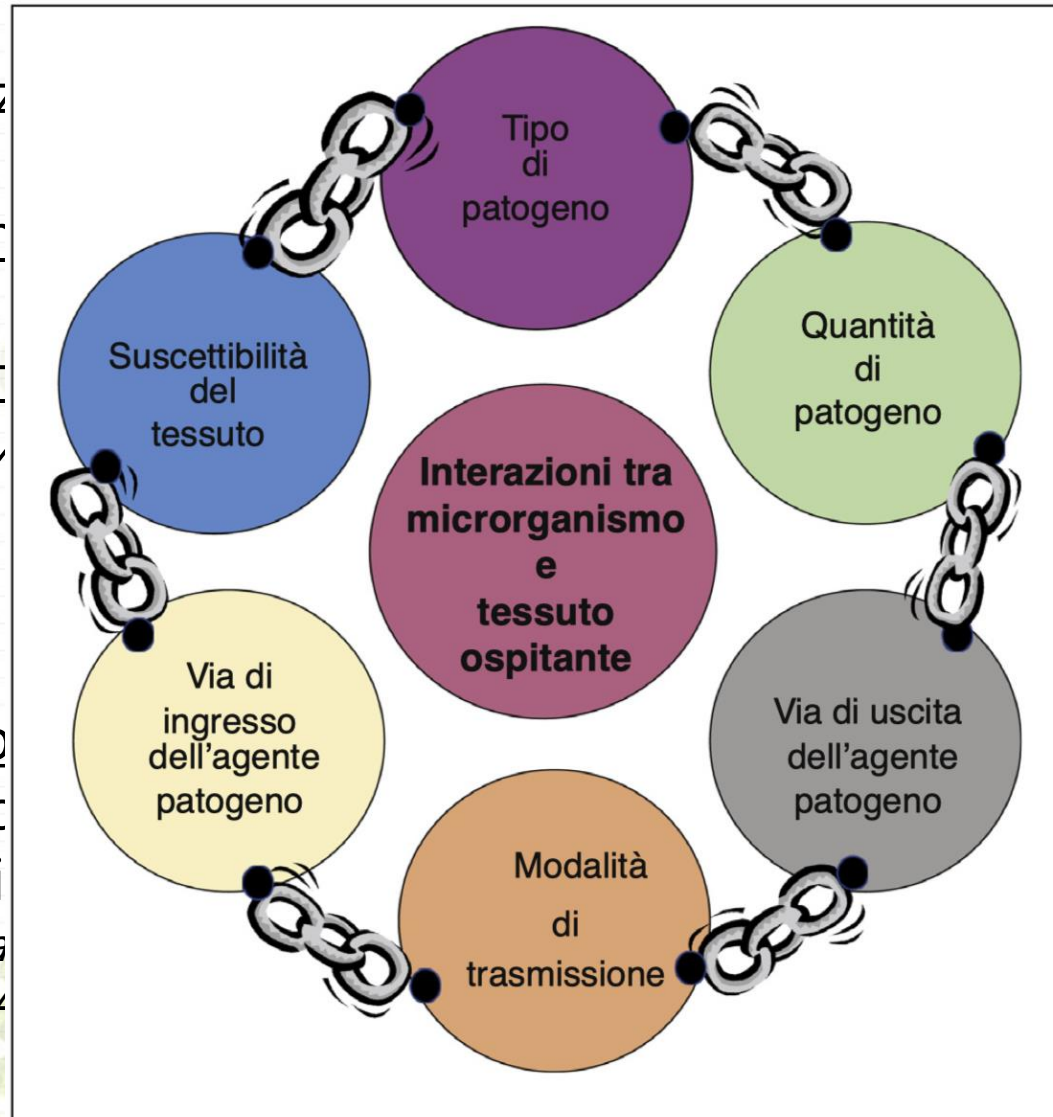
Modello "catena dell'infezione"

- Interazioni

- in

- in
(Λ)

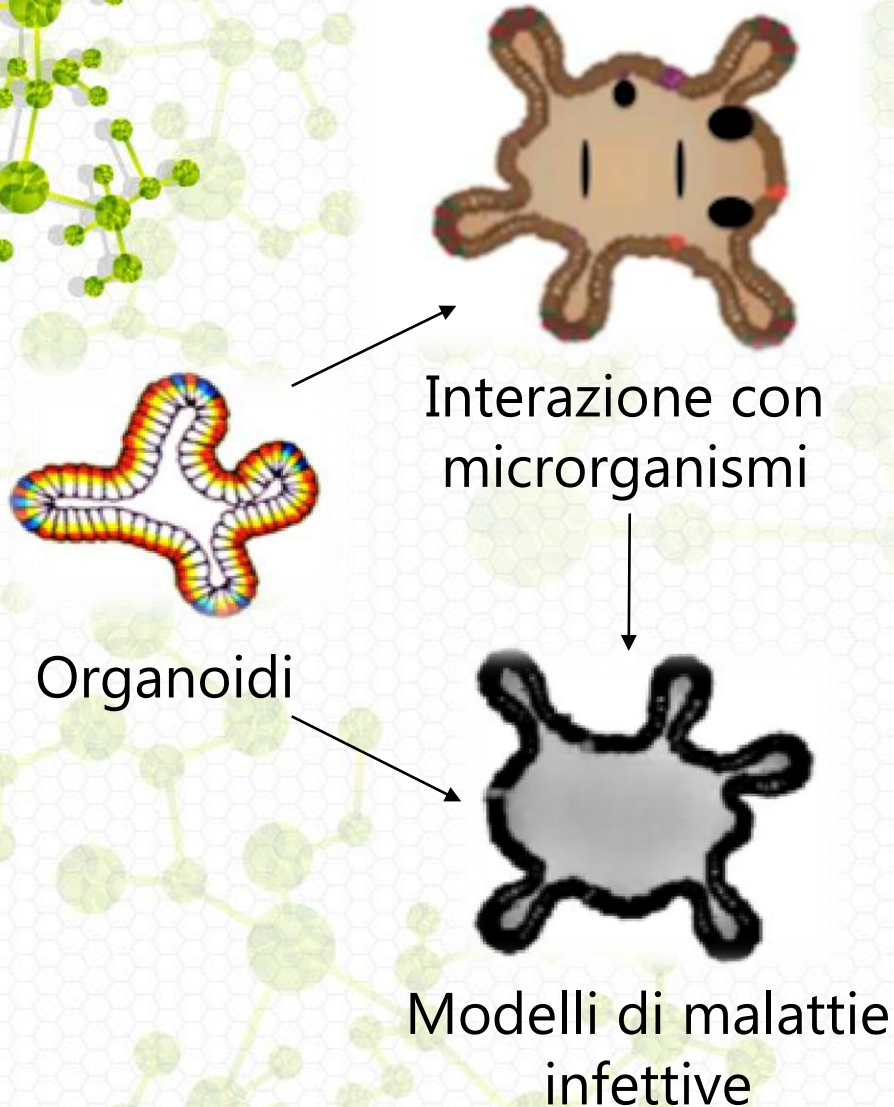
- Indispensabili
molecole
infettive
(malattie
HIV/AIDS)



one
ttie

s Zika,

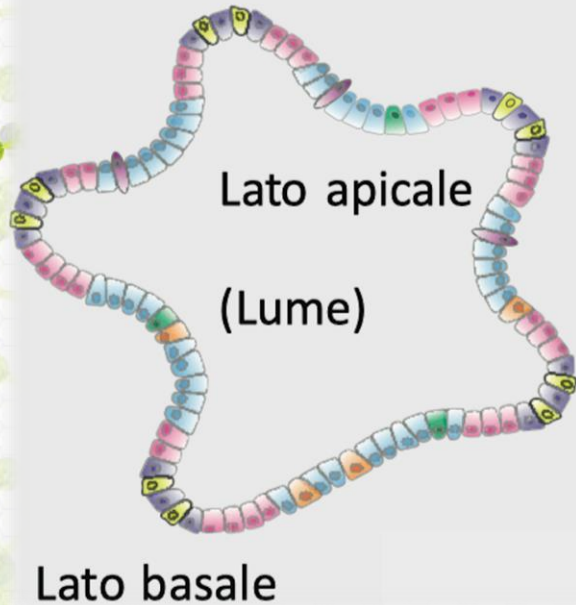
Organoidi e interazione con microrganismi



- Studio fattori del modello della "catena dell'infezione"
- Studio della patogenesi da infezioni batteriche e virali
- Modelli di malattie infettive
- Studio associazioni tra la colonizzazione microbica e la cancerogenesi
- Prevenzione e trattamento delle malattie infettive

Introdurre microrganismi in organoidi

Organoide 3D

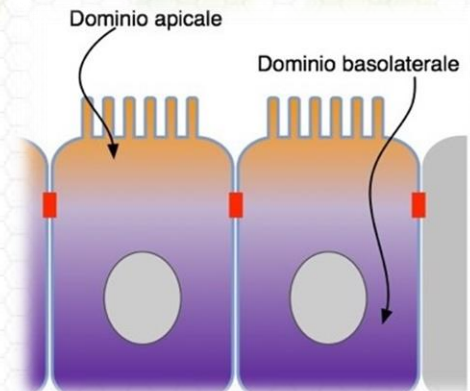


Organoidi:

- sono sistemi 3D chiusi
- lato apicale dell'epitelio verso il lume
- membrana basale verso l'esterno
- microrganismi in vivo hanno come il bersaglio la membrana apicale

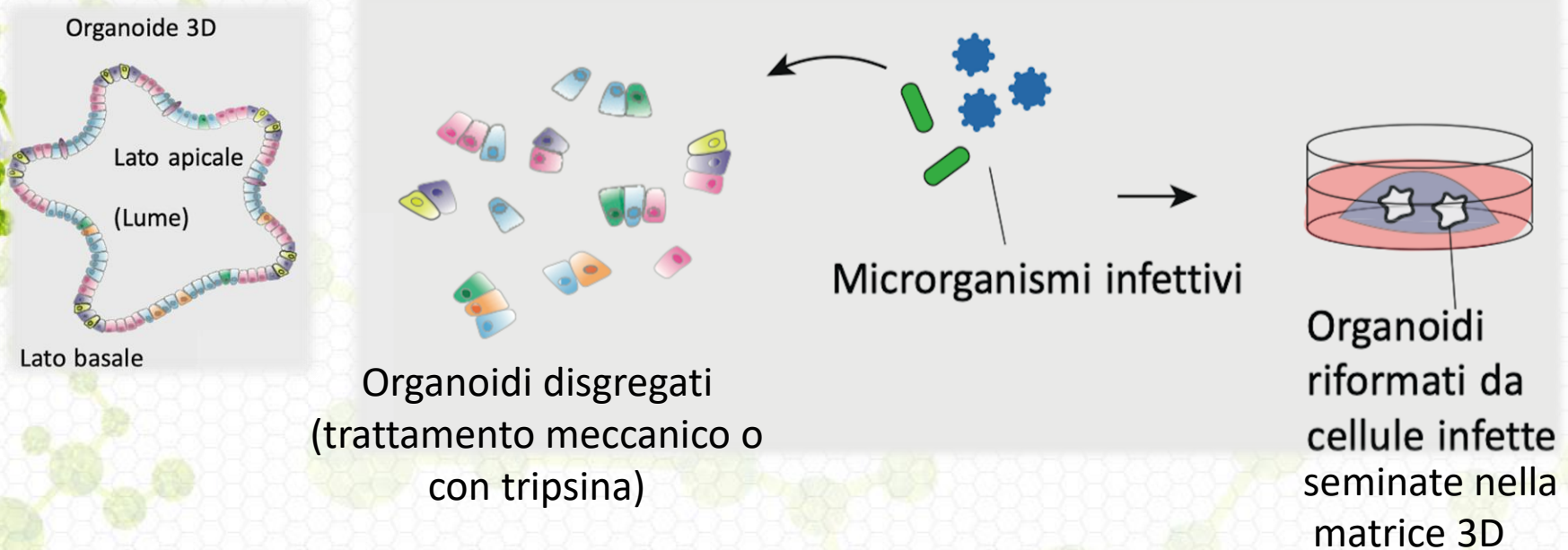
Epiteli.

- membrana basale: separa le cellule dal tessuto connettivo
- zona apicale: va a contatto con l'esterno e svolge le funzioni



Introdurre microrganismi in organoidi

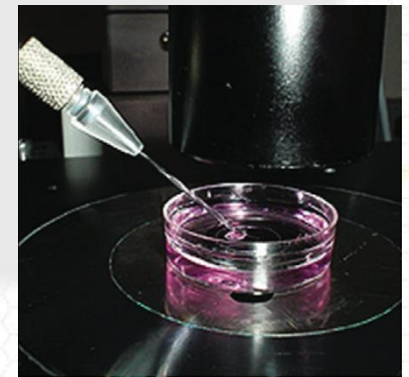
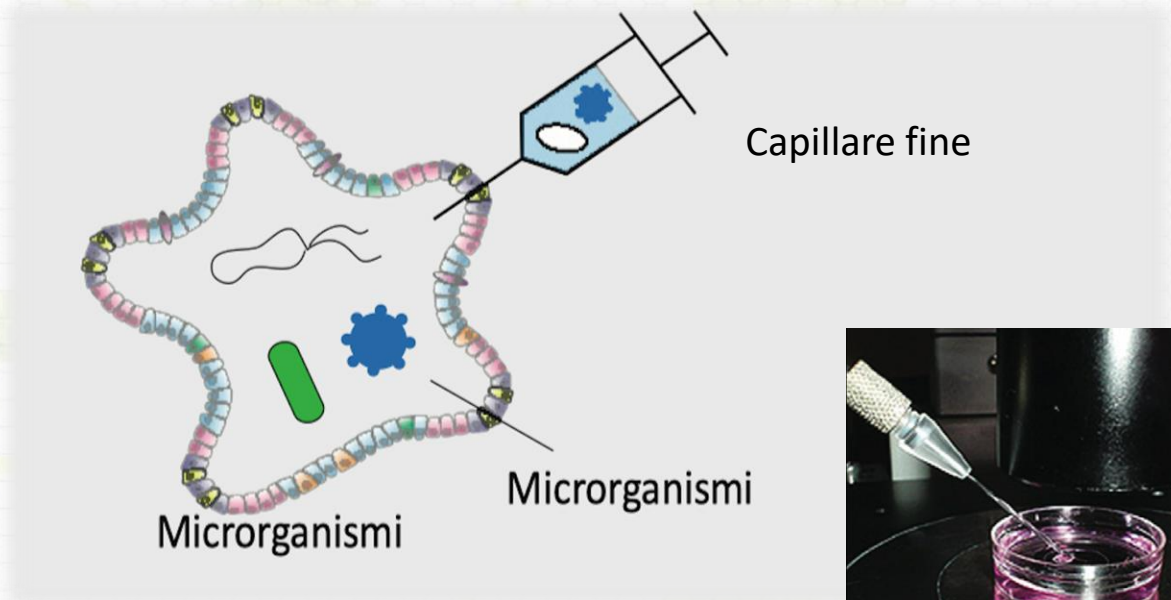
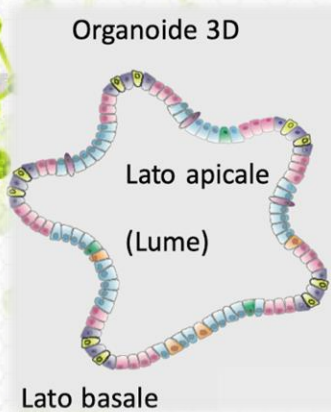
METODO 1: Infezione delle cellule dissociate prima che la struttura 3D sia riformata



- Facili da eseguire e non richiedono attrezzature speciali
- Efficienza infezioni può variare tra microrganismi
- Impossibile catturare l'interazione iniziale

Introdurre microrganismi in organoidi

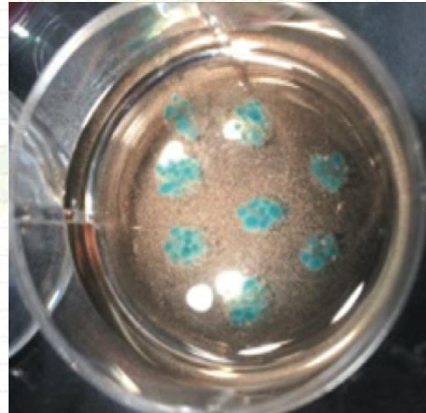
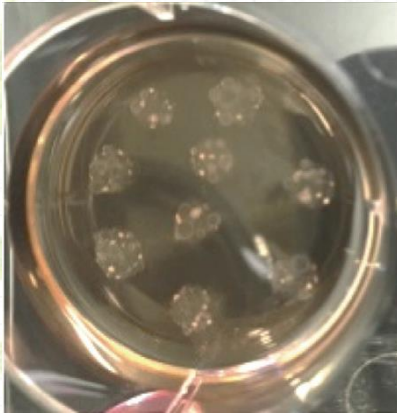
METODO 2: Micro-iniezione di microrganismi nel lume di organoidi intatti



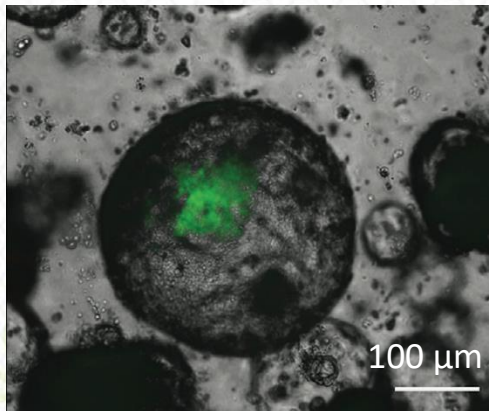
- E' possibile rilevare l'interazione iniziale dei microbi e le prime risposte delle che li ospitano cellule

Introdurre microrganismi in organoidi

METODO 2: Micro-iniezione di microrganismi nel lume di organoidi intatti



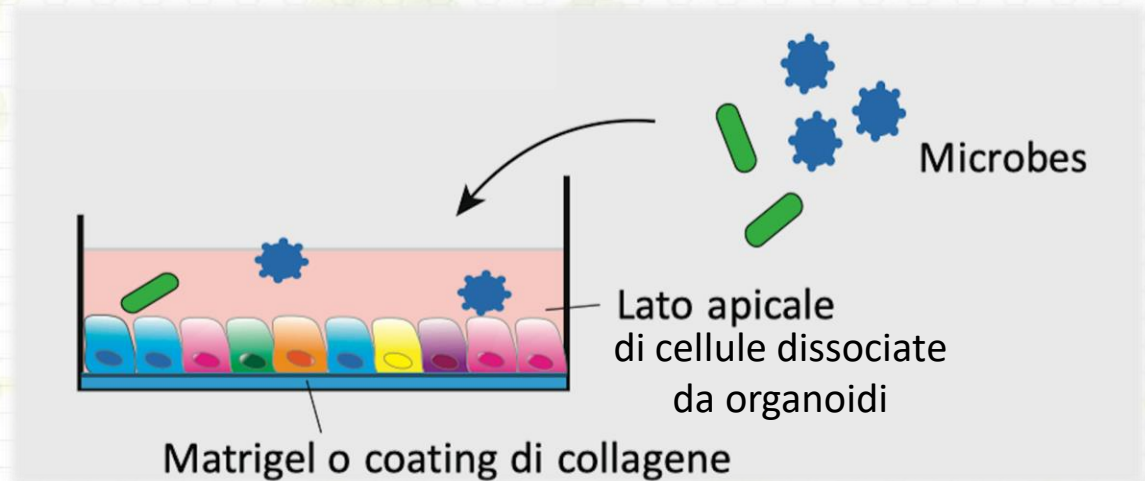
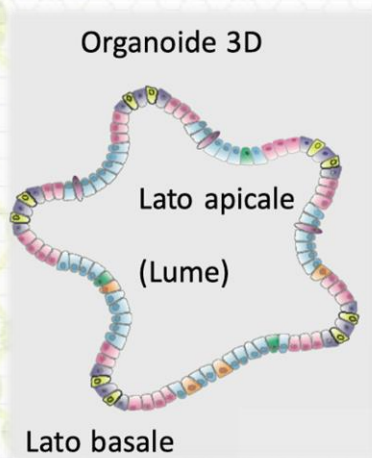
L'iniezione può essere visualizzata usando coloranti non tossici



I microbi che esprimono proteine fluorescenti come GFP risiedono nel lume dell'organoide dopo l'iniezione

Introdurre microrganismi in organoidi

METODO 3: Aggiunta di microrganismi a colture 2D derivate da organoidi



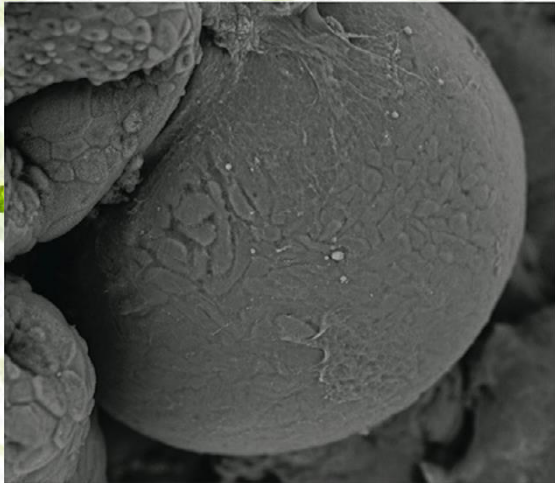
- Non assomiglia alla struttura 3D in vivo delle cellule / tessuti

Vantaggi degli organoidi nello studio dell'interazione con microrganismi

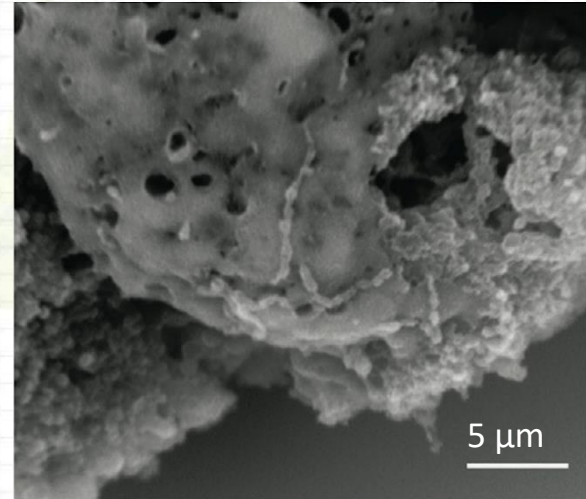
- Studio microrganismi che infettano solo cellule umane (*es. Norovirus, Rotavirus*)
- Studio di patologie con elevate variazioni interindividuali (*es. Helicobacter pylori*):
 - fattori di rischio genetici
 - età
 - sesso
 - ...
- Studio interazioni con specifiche cellule bersaglio (*es. Salmonella/Shigella sfruttano cellule M per penetrare nella sottomucosa intestinale altrimenti per loro irraggiungibile*)
- Architettura simile a un tessuto è fondamentale per comprendere meccanismi patofisiologici



Immagini SEM di *Shigella flexneri*



Organoide intestinale **sano**



Organoide intestinale **infetto**

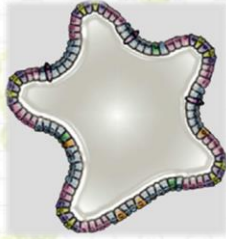
- Organoidi intestinali umani possono simulare alcuni effetti dell'infezione
- Sono batteri che causano morte cellulare dell'organoide dopo 1 giorno in coltura, fenomeno osservato in casi di infezione batterica

Svantaggi degli organoidi nello studio dell'interazione con microrganismi

- Non riproducono dinamica dell'infiammazione in vivo: il sangue è cruciale fungendo da mezzo portatore per le cellule immunitarie →
necessarie *vascolarizzazione, perfusione sanguigna*
e presenza di tutti i tipi di *cellule immunitarie*
- Necessaria alternativa per la matrice extracellulare corrente (Matrigel): contiene gentamicina, che deve essere rimossa prima degli studi sull'infezione



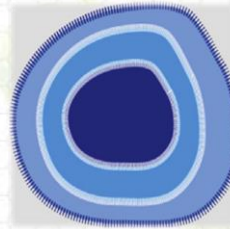
Alcuni esempi in letteratura



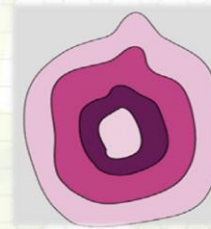
**Intestino
colon**



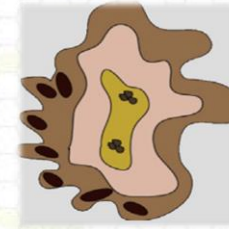
Stomaco



Cervello



Cistifellea



Fegato



Polmone

**Micro
organismo
○
infezione
modellizzata**

C. difficile

H. pylori

Rotovirus

Norovirus

H. pylori

Zika virus

*Salmonella
typhi**

*P. vivax
(Malaria)*

*Hepatitis
virus*

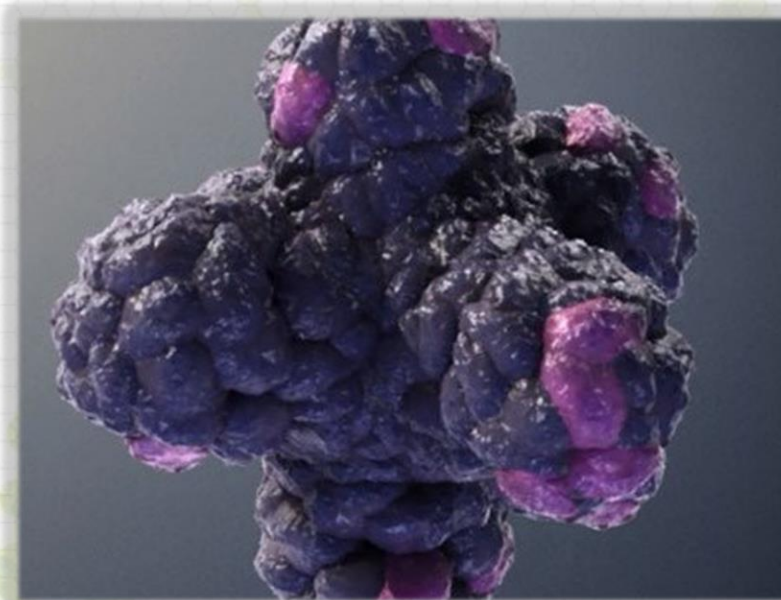
Rhinovirus
*

*Corona-
virus**

* Studi ancora non pubblicati o possibili studi futuri

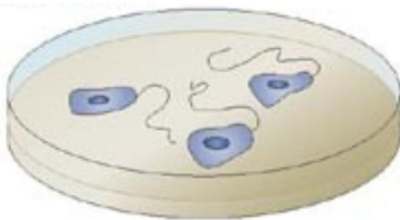
Applicazione III :

Tumoroidi

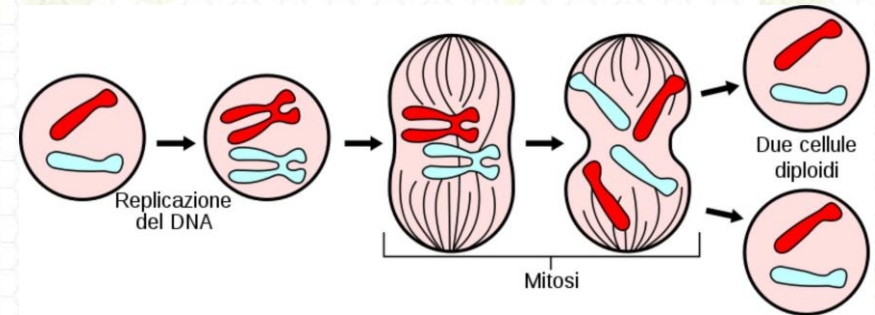


Il Cancro

*«Una massa anormale di tessuto che cresce in eccesso ed in modo sordinato rispetto ai tessuti normali e che persiste in questo stato dopo la cessazione degli stimoli che hanno indotto il **processo**»* (definizione di Rupert Allan Willis, oncologo, accettata a livello internazionale).



Tutti i tumori hanno origine da una cellula.



Il Cancro: ricerca

Notevoli progressi in ambito del trattamento.

Riduzione dei casi di cancro:

- Misure di prevenzione
- Diagnosi precoce

L'uso di **modelli di cancro** offre molte più opportunità di successo nello studio di terapie più mirate .

I modelli di cancro comunemente usati presentano però alcune limitazioni:

Modelli di cancro

Riproduzione non fedele e fallimento del farmaco nella sperimentazione clinica

Modelli animali richiedono molto tempo e riproducono male la cancerogenesi

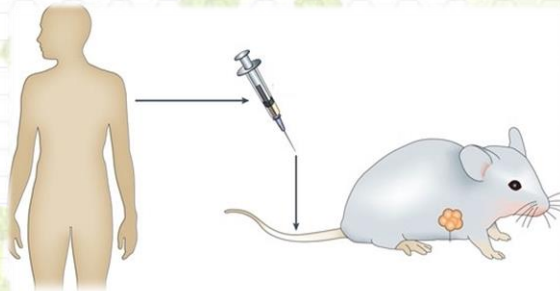
Modelli di Cancro

- **Linee cellulari tumorali del paziente:**



- Inefficiente per coltura 2D;
- Instabilità genetica (dopo pochi passaggi si perde l'eterogeneità del tumore).

- **Xenotrapianti di tumore derivati da pazienti donatori (PDTXs):**



- Costosi;
- Uso di animali;
- Temporalmente costosi;
- Subiscono evoluzioni notevoli nell'ambiente ospite.

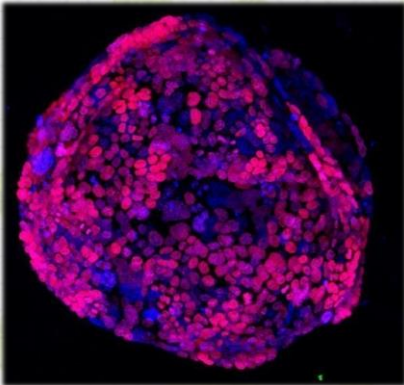
Xenotrapianto: trapianto che viene effettuato utilizzando organi e tessuti provenienti da animali appartenenti a specie diverse da quella del ricevente.

Organoidi

Dopo la scoperta della modellizzazione di organi mediante organoidi si è aperta la strada per lo studio di **tumoroidi**: organoidi in vitro per la modellizzazione del tumore.

Vantaggi:

- Mantenimento a lungo termine;
- Adatti alla crioconservazione;
- Geneticamente modificabili;
- Genotipicamente e fenotipicamente stabili.



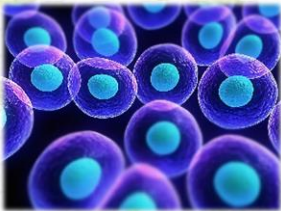
Crioconservazione: processo di laboratorio attraverso cui cellule o tessuti vengono conservati a bassissime temperature (di norma a -196°C , punto di ebollizione dell'azoto liquido).

Organoidi come modelli di cancro (1)

Modelli di cancro possono essere creati mediante due differenti metodi:

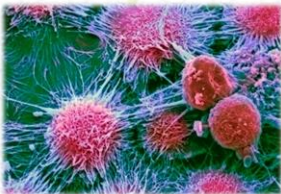
- **Cellule staminali adulte del paziente (iPSCs):**

- L'efficienza nella generazione dell'organoide dipende dal tipo di cancro e dalla presenza/assenza di mutazioni oncogenetiche;
- Perdita dell'eterogeneità rispetto al tumore nativo;
- Crescita più lenta rispetto al tumore originale per alti fallimenti mitotici.



- **Cellule tumorali del paziente (biopsia):**

- Molto più pratico poiché si evita il passaggio intermedio per via delle iPSCs.



Organoidi come modelli di cancro (2)





Ricerca Translazionale (1)

- **Biobanche di organoidi viventi:**

- Serve un alto numero di organoidi per effettuare test di predittività su farmaci paziente specifici;
- Più alto è il numero e maggiore è il potere statistico;
- Sono rilevanti per lo sviluppo di farmaci efficaci.

- **Sviluppo di farmaci e trattamenti personalizzati:**

- Possibilità di fare test per scoprire alterazioni genetiche ed epigenetiche nel tumore in risposta al farmaco;
- Screening di farmaci mediante uso di organoidi sani e tumorali dello stesso tessuto (valutazione di selettività cellulare);
- Studi di tossicità epatica su organoidi del fegato (test preclinici).

- **Immunoterapia:**

- Sfruttare il sistema immunitario per sradicare le cellule maligne;
- Cellule tumorali sviluppano antigeni derivati dalle mutazioni (**neo-antigeni**);
- Se la potenza di risposta provocata dai neo-antigeni è bassa si sviluppano cellule immunitarie citotossiche in vitro per l'uso in vivo.

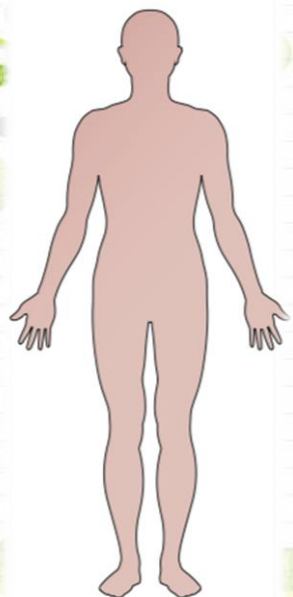


Ricerca Translazionale (2)

Organoids For Predicting Cancer Treatment

Dr. Senthil Muthuswamy, Ph.D.

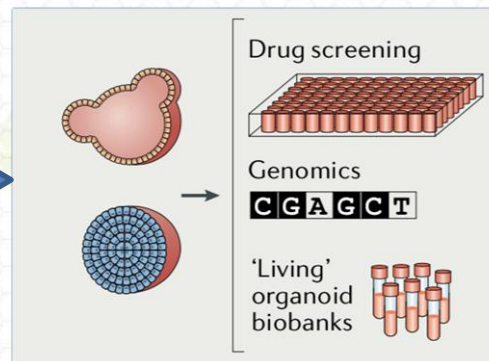
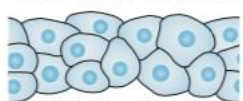




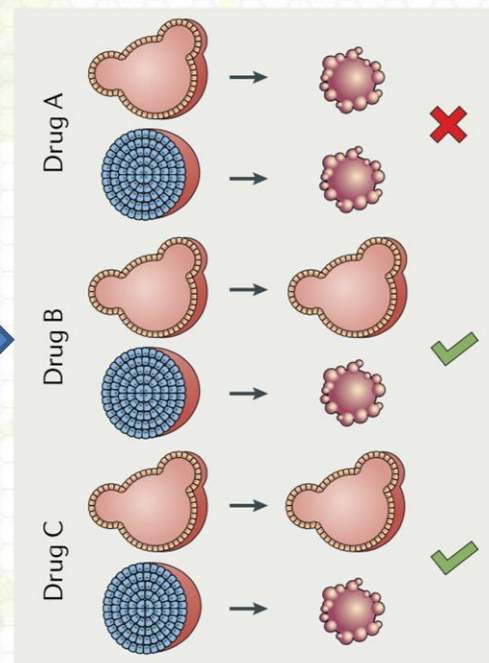
Normal tissue



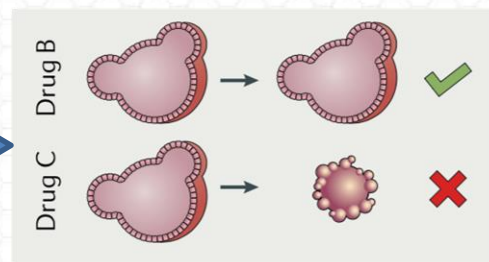
Tumour tissue



Medicina personalizzata



Terapie specifiche



Test tossicità epatica



Ricerca di base

- **Organoidi per indagare sul legame tra agenti infettivi e sviluppo del cancro:**
 - Un caso su cinque di cancro è legato ad agenti infettivi;
 - Non è ben noto come un agente patogeno contribuisca alla nascita del tumore;
 - Uso di co-culture organoide con patogeni (a lungo termine) per indagare sui fattori di rischio per lo sviluppo del cancro.
- **Organoidi per indagare sui processi mutazionali alla base della tumorigenesi:**
 - Cancro causato da accumulo di mutazioni genetiche che guidano la malattia;
 - L'elevata stabilità genica a lungo periodo di colture organoidi consentono di studiare bene i processi mutazionali;
 - Ricerca dei "***Mutational signatures***" caratteristici per ogni tipologia di tumore;
 - Studio di come si instaura l'eterogeneità tumorale poiché il genoma tumorale è altamente instabile (eterogeneità viene mantenuta nell'organoide a lungo termine).
- **Organoidi per la modellizzazione genetica del cancro:**
 - Come modellizzazione e studio dell'inizio e dello sviluppo del cancro in organi specifici;
 - Per lo studio dei processi metastatici mediante l'uso di xenotrapianti (altrimenti studio inefficace);
 - Per lo studio di processi correlati al cancro e vie di segnalazione.



Limitazioni e Sviluppi Futuri

Limitazioni:

- Consumo di tempo e risorse rispetto alle comuni linee cellulari tumorali;
- Mancanza di stroma, vasi sanguigni e cellule immunitarie;
- Organoidi tumorali crescono più lentamente del tumore originario.

Sviluppi futuri:

- Sistemi di colture con ulteriori elementi cellulari e microbionici (es. sistema nervoso);
- Ottimizzazione delle matrici per aumentare l'efficienza della crescita di organoidi;
- Aumento della velocità di espansione del tumoroide per avere un trattamento personalizzato in tempi clinicamente accettabili;
- Ottimizzazione delle piattaforme di screening per avere test farmacologici più robusti e sensibili.



Fonti bibliografiche



Bibliografia

Introduzione, applicazioni, limiti e prospettive

- Choi, Jinwook, Elhadi Iich, and Joo Hyeon Lee. 2016. "Organogenesis of Adult Lung in a Dish: Differentiation, Disease and Therapy." *Developmental Biology*
- Clevers, Hans. 2016. "Modeling Development and Disease with Organoids." *Cell*
- Dutta, Devanjali, Inha Heo, and Hans Clevers. 2017. "Disease Modeling in Stem Cell-Derived 3D Organoid Systems." *Trends in Molecular Medicine*
- Kaushik, Garima, Moorthy P Ponnusamy, and Surinder K Batra. 2018. "Concise Review: Current Status of Three-Dimensional Organoids as Preclinical Models." *Stem cells*
- Sato, Toshiro et al. 2009. "Single Lgr5 Stem Cells Build Crypt-Villus Structures in Vitro without a Mesenchymal Niche." *Nature*
- ["Coltivare Organoidi." 2018. *Nòva - Il Sole 24 ore* \(4/2/18\).](#)



Bibliografia

Organoidi per modelli di organo sano

- J. Wells *et al.* 2018. Esophageal Organoids from Human Pluripotent Stem Cells Delineate Sox2 Functions during Esophageal Specification. *Stem cells*
- K.R. Koehler *et al.* 2018. Hair Follicle Development in Mouse Pluripotent Stem Cell-Derived Skin Organoids. *Cell reports*.

Organoidi per modelli di organo infetto

- Dutta, Devanjali and Hans Clevers. *Organoid culture systems to study host-pathogen interactions*.
- Dutta, Devanjali, Inha Heo, and Hans Clevers. 2017. "Disease Modeling in Stem Cell-Derived 3D Organoid Systems." *Trends in Molecular Medicine*
- Xuan Ho, Beatrice, Min Qian Pek, Nicole and Boon-Seng, Soh. *Disease Modeling Using 3D Organoids Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells*.



Bibliografia

Tumoroidi

- Dutta, Devanjali, Inha Heo, and Hans Clevers. 2017. "Disease Modeling in Stem Cell-Derived 3D Organoid Systems." *Trends in Molecular Medicine*
- Drost, Jarno, and Hans Clevers. 2018. "Organoids in cancer research." *Nature Reviews Cancer*