

**18. Ottobre**

## **Mini brain in vitro:**

*Prima dei cervelli non c'erano colori o suoni nell'universo,  
né c'erano sapori o aromi e probabilmente poco senso e nessuna sensazione o emozione.*

Roger W. Sperry

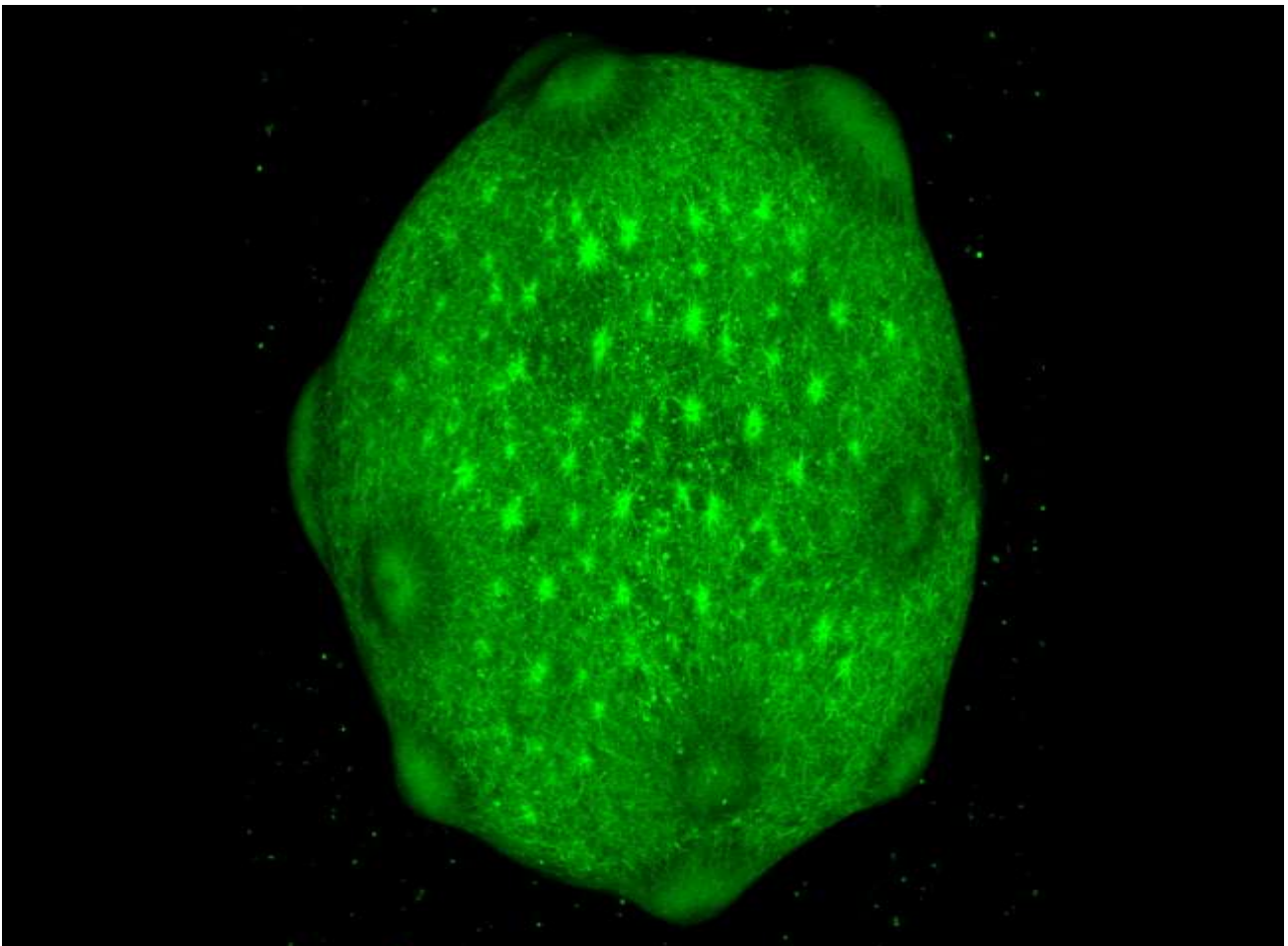
In biologia, forse non c'è niente di più esasperante e difficile da studiare dello sviluppo iniziale del cervello umano. L'acquisizione di campioni di tessuto da quel lasso di tempo è praticamente impossibile.

E così, per decenni, gli scienziati hanno dovuto fare affidamento su indizi indiretti raccolti da modelli animali dai topi alle scimmie

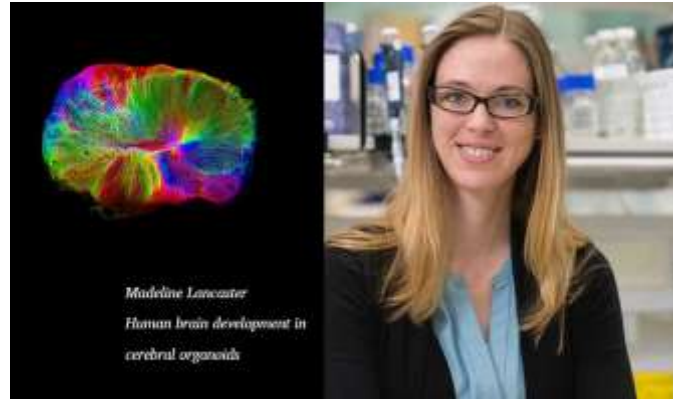
Ma il *cervello umano* è così evolutivamente distinto che quelle intuizioni non hanno prodotto molto in termini di trattamenti efficaci per molti disturbi comportamentali, che gli scienziati ritengono probabilmente ancorati a caratteristiche uniche del cervello umano.

Negli ultimi 10 anni, tuttavia, nuovi metodi per indirizzare le cellule staminali a differenziarsi in neuroni e far crescere quelle cellule in *strutture 3D* delle dimensioni di una lenticchia hanno rivoluzionato la capacità degli scienziati di studiare i processi del neurosviluppo.

Sono così stati realizzati *mini cervelli, sferoidi neuronali, organoidi cerebrali, corticoidi sferici umani* da utilizzare come modelli sperimentali

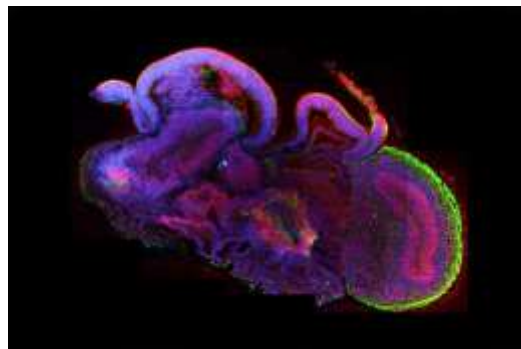


La loro breve ed esplosiva storia risale al 2013, quando la neurobiologa dello sviluppo **Madeline Lancaster**, allora *all'Accademia austriaca delle scienze*, che coltivando cellule staminali in un gel di supporto, le cellule si auto-organizzerebbero in piccole *masse sferiche di tessuto cerebrale funzionante*.



**Lancaster MO et al. *Cerebral organoids model human brain development and microcephaly*. Nature. 2013 Sep 19;501(7467):373-9.**

Non molto tempo dopo, i laboratori di tutto il mondo hanno iniziato a coltivare le proprie colonie di sfere cerebrali e ad applicare diversi stimoli chimici e spinte per stimolare il differenziamento .



Nel 2015, **Sergiu Pasca di Stanford** ha prodotto *sferoidi tridimensionali* capaci di generare elettricità aprendo la sperimentazione alla neurofisiologia

**Paşca AM et al. *Functional cortical neurons and astrocytes from human pluripotent stem cells in 3D culture*. Nat Methods. 2015 Jul;12(7):671-8.**

EPISODE 174

## Functional Human Brain Models of Disease

featuring Dr. Sergiu Pasca



Alcuni anni dopo, un gruppo dell'UC **Davis Medical Center** pubblico i primi risultati di di *sfere cerebralivascolarizzate*, aprendo strade per lo studio di *ictus* e altre malattie della *vascolarizzazione cerebrale*. E più simili a veri organi avevano, più utili diventavano questi blob per districarsi nel complesso funzionamento interno del cervello.



*Pham MT et **Generation of human vascularized brain organoids**. Neuroreport. 2018 May 2;29(7):588-593.*

Ma c'è solo così tanto che gli scienziati possono imparare in una provetta o in una matrice di gel. In quegli ambienti, le cellule al centro degli sferoidi vengono tagliate fuori dall'ossigeno e dai nutrienti non appena crescono di più di pochi millimetri di diametro. Ciò limita la loro capacità di sviluppare reti neuronali funzionali - le connessioni e il crosstalk cellulare necessari per ricevere ed elaborare le informazioni - e quindi la loro utilità come modello per comportamenti complessi e malattie neurologiche.

Anche **Pasca**, il cui laboratorio ha riportato alcune delle colture organoidi cerebrali più longeve a più di 800 giorni, ha notato che i neuroni in vitro non crescono tanto quanto le loro controparti nella vita reale. Ecco perché lui e i suoi colleghi hanno iniziato a cercare un ambiente più amichevole dove la temperatura è giusta e c'è sempre un flusso fresco di sale, zucchero e ossigeno, come, diciamo, all'interno del cranio di un animale da laboratorio a sangue caldo.

Per questo ultimo studio, il *gruppo di Pasca* ha scelto cuccioli di ratto di due o tre giorni, equivalenti in termini di sviluppo a un bambino umano, il momento in cui i cervelli crescono rapidamente e i neuroni si allungano per formare nuove connessioni. In questi animali, hanno trasferito organoidi umani simili alla corteccia cerebrale. Circa l'80 per cento degli impianti ha preso.

Nel giro di poche settimane, le cellule dei ratti hanno iniziato a spostarsi negli organoidi, costruendo vasi sanguigni che ne hanno supportato la crescita insieme a quella degli animali. Da questi organoidi sono germogliati milioni di nuovi neuroni, che inviano assoni e cablaggi nei circuiti del cervello dei topi, incluso in profondità nel talamo, una regione responsabile della trasmissione di segnali sensoriali come il tatto e la temperatura. Sei mesi dopo, circa un terzo dell'emisfero cerebrale che ha ricevuto il trapianto era costituito da cellule umane.

Il *gruppo di Pasca* non è il primo ad aver tentato una fusione mentale interspecie. Nel 2018, gli scienziati del **Salk Institute** hanno segnalato il primo impianto riuscito di organoidi cerebrali umani

nel cervello di topi di laboratorio adulti, dove sono sopravvissuti fino a tre mesi e hanno persino attinto ai circuiti neuronali degli animali.



**Miniature human brains grow for months when implanted in mice skulls**

Un gruppo dell' **Università di Kyoto** ha replicato con successo l' esperimento nelle scimmie **Kitahara T et al** ***Axonal Extensions along Corticospinal Tracts from Transplanted Human Cerebral Organoids***. ***Stem Cell Reports***. 2020 Aug 11;15(2):467-481.

Ma facendo i loro esperimenti su ratti molto giovani le cui cortecce non sono ancora saturate di sinapsi, **Pasca** ha scoperto che i *neuroni umani* si integravano facilmente nei circuiti in rapida espansione degli animali, il che forniva loro la stimolazione di cui avevano bisogno per superare il precedente sviluppo

L'analisi delle proprietà elettriche del neurone umano indicava che fossero più maturi di quelli prodotti in vitro, sono anche molto più grandi e crescono circa sei volte più di un neurone equivalente che cresce in vitro".

Quel progresso ha permesso loro di vedere in modo molto più dettagliato cosa va storto nel cervello in via di sviluppo dei bambini che sviluppano grave epilessia e autismo a causa di una devastante malattia genetica chiamata **sindrome di Timothy**.

*La sindrome di Timothy è una malattia multisistemica, caratterizzata da segni a carico del cuore, delle mani, del viso e dello sviluppo neurologico, che comprendono l'allungamento del tratto QT dell'elettrocardiogramma, dita dei piedi e delle mani palmati, sella nasale infossata, orecchie a bassa attaccatura, mascella ipoplasica, labbro superiore sottile e tratti autistici o disturbi dello spettro dell'autismo. Sono stati descritti meno di 20 casi. La sindrome di Timothy è dovuta a mutazioni del gene CACNA1C ed è ereditata come carattere autosomico dominante.*



Il laboratorio di Pasca in precedenza produceva cervelli mini-sindrome di Timothy dalle cellule dei pazienti e, in una piastra di laboratorio, ha visto che i loro neuroni saltavano a casaccio, incerti su dove migrare.

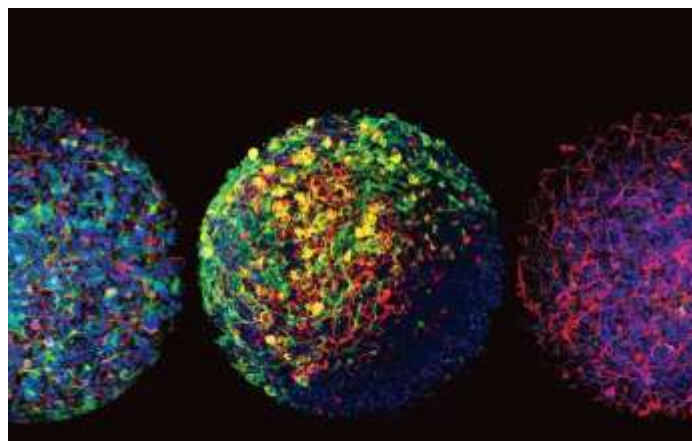
Dopo essere cresciute per cinque o sei mesi all'interno del cervello dei topi, queste differenze erano ancora più evidenti. I **neuroni di Timothy** erano più piccoli e rachitici: non inviavano così tanti dendriti, che favoriscono le connessioni con i neuroni vicini. Di conseguenza, il lato del cervello dei topi con il trapianto di Timothy aveva un'attività elettrica molto meno e molto meno organizzata.

"Quando guardi in vivo, c'è una differenza molto chiara tra le cellule del paziente e le cellule di controllo che puoi letteralmente vedere ad occhio", ha detto Pasca.

Il suo gruppo sta ora lavorando per applicare questo metodo allo studio degli organoidi creati da pazienti con altre malattie neurologiche e spera un giorno di usarlo come piattaforma di test antidroga. Nella lista delle cose da fare anche: attaccare protocervelli ancora più sofisticati all'interno dei crani dei giovani roditori, dove il loro sviluppo può andare ancora oltre.

In un articolo pubblicato nel 2020, il gruppo di Pasca ha dimostrato che l'accostamento di organoidi che rappresentano tre diversi tessuti - muscolo scheletrico, corteccia cerebrale e midollo spinale - ha creato qualcosa che imitava il controllo del movimento volontario. Schiacciare l'estremità del cervello di questo mega-blob, che Pasca ha soprannominato un "assembloide", ha causato una contrazione dell'estremità muscolare.

Lui e i suoi colleghi hanno generato organoidi che rappresentano una dozzina di regioni cerebrali distinte, comprese le regioni profonde del sistema nervoso centrale dove nascono i neuroni inibitori.



Ora il gruppo di Pasca ha iniziato a progettare assembloidi con diversi rapporti di neuroni eccitatori e inibitori. Crescendoli nel cervello di giovani topi, sperano di essere in grado di rispondere a domande sulle radici dello sviluppo dell'epilessia, della schizofrenia e di altre condizioni psichiatriche che si ritiene siano causate da uno squilibrio tra neuroni eccitatori e inibitori.

**In-Hyun Park**, un biologo di cellule staminali presso la **Yale School of Medicine**, da anni realizza fusioni di organi cerebrali per studiare come i neuroni inibitori migrano durante lo sviluppo cerebrale. In un piatto, i suoi organoidi producono un mix realistico di cellule eccitatorie, inibitorie e di supporto, ma non sviluppano il tipo di connessioni funzionali fondamentali per capire se le cellule si comportano come dovrebbero.



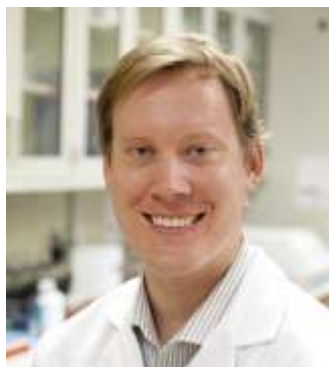
*Xiang Y et al. **Fusion of Regionally Specified hPSC-Derived Organoids Models Human Brain Development and Interneuron Migration**. Cell Stem Cell. 2017 Sep 7;21(3):383-398.e7.*

Sembra un cervello, ma parla come un cervello?

Per rispondere, ha detto che il suo team aveva pensato di trapiantare i loro organoidi in topi di laboratorio, ma erano stati riluttanti, preoccupati che prendere il controllo di una parte così grande del cervello dell'ospite avrebbe causato problemi all'animale. Ma il lavoro del gruppo di Stanford ha alleviato quei timori. "Hanno dimostrato in una prova di principio davvero potente che i neuroni umani possono connettersi funzionalmente al cervello ospite", ha detto Park. "È una scoperta davvero importante per il campo".

Neurochirurghi come **Ben Waldau**, dell'Università della California, Davis, hanno convenuto che il progresso è prezioso che attirerà sicuramente più ricercatori a lavorare con gli organoidi e hanno definito lo studio "impressionante". Ma come qualcuno interessato un giorno a usare gli organoidi non solo come strumento di ricerca, ma per curare effettivamente le persone che hanno perso la funzione cerebrale a causa di un ictus, ha notato che c'è ancora molto spazio per migliorare.

*Mini Brains Just Got CreepierThey're Growing Their Own Vein*



Gli organoidi di **Pasca** non hanno formato nessuno dei sei strati che ha una normale corteccia umana. E la loro integrazione nel cervello del topo non era perfetta; piuttosto che costruire attorno ad altre strutture cerebrali, come i ventricoli laterali che trasportano il fluido, il tessuto umano le ha spinte via.

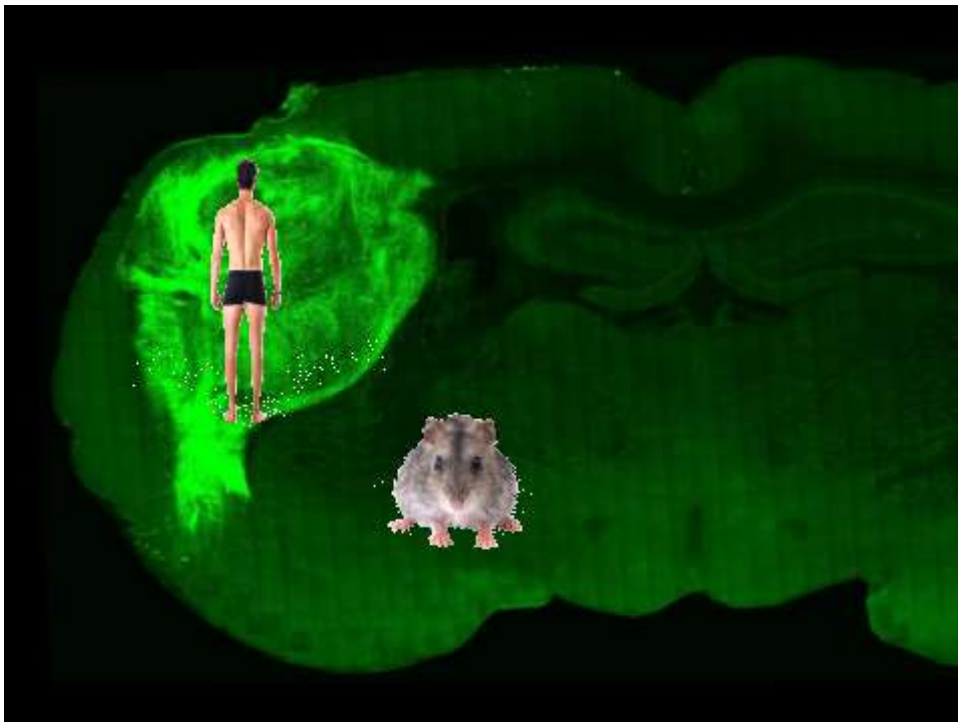
Se ciò ha ferito i topi in qualche modo, non lo hanno mostrato. Si sono comportati tutti perfettamente normalmente con una batteria di test fisici e cognitivi. Ma è il genere di cose che potrebbe preoccupare i regolatori che contemplanò i primi studi clinici sugli organoidi. Sarebbe fantastico se potessimo creare organoidi stratificati che potrebbero essere utilizzati per il trapianto nei pazienti con ictus a cui mancano parti del cervello", ha detto Waldau. "E questo è ancora qualcosa su cui lavorare.

I ricercatori sono entrati nella testa di un topo come mai prima d'ora. Piantando un gruppo Organoidi cresciuti in laboratorio nella corteccia dei roditori neonati (scansione cerebrale mostrata a sinistra), hanno dimostrato che il trapianto interspecie potrebbe attingere ai sensi dei ratti.

Dopo 2 settimane di allenamento, i topi hanno imparato a sorseggiare acqua quando i loro nuovi accessori cerebrali sono stati stimolati con la luce, indicando che le cellule umane si sono adattate con successo ai circuiti comportamentali

riporta il team questa settimana su *Nature*. (Human neurons merge with rat brain to control sense by Zack Savitsky)

I risultati gettano le basi per lo studio della biologia delle diverse condizioni neurologiche all'interno dei crani di altri animali, consentendo agli scienziati di far crescere "organoidi" più complessi di quanto sia possibile in una crescita in vitro



## Un anno fa... Baedeker/Replay del 18 ottobre

*Le caratteristiche immunologiche che regolano la transizione del COVID-19 all'endemia*

Marcel Proust Charles Peirce, il fondatore del pragmatismo, riteneva che ogni uomo è pienamente convinto dell'esistenza della Verità, altrimenti non farebbe alcuna domanda. Attualmente noi tutti ci interroghiamo su come la gravità dell'infezione con la sindrome respiratoria acuta grave coronavirus 2 (SARS-CoV-2) si trasformerà negli anni a venire e vorremmo conoscere la "Verità". Anche se La verità non si può sapere, ma soltanto credere. (Georg Groddeck) tuttavia una analisi dei dati immunologici ed epidemiologici sui coronavirus umani endemici (HCoV) ci mostra come l'immunità che blocca l'infezione diminuisce rapidamente, e che l'immunità che riduce la malattia sia di lunga durata. La speranza è che, una volta raggiunta la fase endemica, SARS-CoV-2 potrebbe diventare non più virulento di un comune raffreddore.

Nel corso dei secoli gli esseri umani sono stati regolarmente minacciati da molteplici agenti patogeni emergenti che hanno, a più riprese, sterminato una frazione sostanziale di tutte le persone nate. Negli ultimi decenni abbiamo subito molteplici "attacchi" portati da infezioni virali acute, tra cui la sindrome respiratoria acuta grave (SARS), la sindrome respiratoria mediorientale (MERS), Hendra, Nipah ed Ebola. Fortunatamente, tutti localmente respinti e/o contenuti. Tuttavia quando il contenimento non ha un successo immediato, come è accaduto per il nuovo betacoronavirus, responsabile della sindrome respiratoria acuta grave coronavirus 2 (SARS-CoV-2) dobbiamo iniziare a capire e pianificare la transizione verso l'endemia insieme alla possibilità di una circolazione continua, con possibili cambiamenti nella gravità della malattia a causa dell'evoluzione del virus e dell'accumulo di nuove immunità e resistenza dell'ospite. SARS-CoV-2 è un virus nuovo (emergente) che ha un alto numero riproduttivo di base (  $R_0$  ) ed è trasmissibile durante la fase asintomatica dell'infezione, caratteristiche queste, che lo rendono difficile da controllare.

Tuttavia, ci sono altri sei coronavirus con catene di trasmissione umane note, che potrebbero fornirci indizi utili per disegnare scenari futuri dell'attuale pandemia. Si tratta di quattro coronavirus umani (HCoV) che circolano endemicamente in tutto il mondo; questi causano solo sintomi lievi e non rappresentano un notevole onere per la salute pubblica. Altri due ceppi di HCoV, SARS-CoV-1 e MERS-CoV, sono emersi negli ultimi decenni e hanno rapporti di mortalità dei casi (CFR) e rapporti di mortalità per infezione (IFR) più elevati rispetto a COVID-19, ma sono stati fortunatamente contenuti e quindi non si sono mai diffusi ampiamente. E' ipotizzabile che tutti gli HCoV stimolino una immunità che presenta caratteristiche simili e l'attuale problema acuto di salute pubblica sia di fatto una conseguenza dell'emergenza epidemica in una popolazione immunologicamente naïve in cui i gruppi di età più avanzata senza precedente esposizione sono più vulnerabili a malattie gravi.

Basandosi sui dati della letteratura ed in particolare sulla modellizzazione della risposta ai vaccini vaccini, Halloran H in Design and Analysis of Vaccine Studies (Statistics for Biology and Health, Springer, 2010) ipotizzano che l'immunità può fornire protezione in tre modi. Nella sua forma più robusta, l'immunità sterilizzante può impedire la replicazione di un agente patogeno, rendendo così l'ospite refrattario alla reinfezione e pertanto definiscono questa proprietà "efficacia immunitaria".

Se invece l'immunità non impedisce la reinfezione, può comunque attenuare la patologia dovuta alla reinfezione e/o ridurre la trasmissibilità o l'infettività. In effetti, studi sperimentali di riesposizione sugli HCoV endemici forniscono la prova che le efficacie immunitarie non diminuiscono alla stessa velocità. Il team, del MRC Common Cold Unit, Ospedale di Harvard,( Salisbury, Wiltshire, Regno Unito) ha dimostrato nel 1990 che la reinfezione è possibile entro un anno; tuttavia, dopo la reinfezione, i sintomi sono lievi e il virus viene eliminato più rapidamente (Callow KA 1990) Una valutazione complessiva dei dati disponibili ci dice che utilizzare i sintomi come "strumento di sorveglianza" per frenare la diffusione di SARS-CoV-2 diventerà nel tempo sempre più difficile, poiché le reinfezioni più lievi contribuiscono sempre più alle catene di trasmissione e ai tassi di attacco a livello di popolazione. Inoltre, l'infezione o la vaccinazione possono proteggere dalle malattie, ma non forniscono il tipo di immunità che blocca la trasmissione che consente la schermatura o la generazione di un'immunità di gregge a lungo termine (Randolph HE 2020) Alcune riflessioni conclusive... **(per continuare vai all'originale)**