

## Digitalizzazione e biotecnologie innovative per le neuroscienze

### *Digitization and innovative biotechnologies for neurosciences*

**GABRIELLA ERRICO**

Pediatra, Centro Medico Sant'Anna, Lizzanello (LE).

Per corrispondenza:  
gabriella.errico@libero.it

#### **Riassunto**

le patologie neurodegenerative rappresentano una sfida rilevante per la Medicina clinica e per la Ricerca biomedica in quanto sono caratterizzate da una diffusione pandemica con rilevante impatto sociosanitario. Tale situazione è oltremodo complicata dalla scarsa disponibilità di farmaci efficaci al contrasto di tali condizioni patologiche. Tale criticità è correlata alla complessità anatomofunzionale del sistema nervoso umano, che lo rende un oggetto d'indagine e studio particolarmente sfuggente, e dal modelling disease insoddisfacente, a causa degli effetti distorsivi della variabilità interspecifica, quando vengono impiegati modelli animali. Per tentare di superare tali ostacoli nell'ultimo decennio sono state utilizzate in ambito di Neuroscienze di Simulazione tecnologie digitali per cercare di realizzare copie digitali di circuiti cerebrali umani complessi e sono state impiegate biotecnologie innovative ed incruente fondate sulla biologia umana e derivate da cellule staminali, per costruire organoidi cerebrali umani allo scopo di ottimizzare il modelling disease delle patologie neurodegenerative, di svelarne i meccanismi patogenetici fini e di individuare farmaci efficaci. I risultati ottenuti finora sono molto incoraggianti ed il contributo clinico di tali metodiche innovative si è rivelato rilevante in quanto sta aprendo nuove prospettive terapeutiche per tali devastanti patologie.

**Parole chiave:** neuroscienze di simulazione, biotecnologie innovative basate sulla biologia umana.

#### **Abstract**

*neurodegenerative diseases represent a significant challenge for clinical medicine and biomedical research as they are characterized by a pandemic spread with significant socio-health impact. This situ-*

*ation is further complicated by the limited availability of effective drugs to combat these pathological conditions. This criticality is related to the anatomical-functional complexity of the human nervous system, which makes it a particularly elusive object of investigation and study, and to the unsatisfactory disease modeling, due to the distorting effects of interspecific variability, when animal models are used. To attempt to overcome these obstacles, in the last decade digital technologies have been used in the field of Simulation Neuroscience to try to create digital copies of complex human brain circuits. Moreover innovative and bloodless biotechnologies based on human biology and derived from stem cells have been used, to build human brain organoids with the aim of optimizing disease modeling of neurodegenerative pathologies, revealing their inner pathogenetic mechanisms and identifying effective drugs. The results obtained so far are very encouraging and the clinical contribution of these innovative methods has proven to be relevant as it is opening up new therapeutic perspectives for these devastating pathologies.*

**Keywords:** digital twin of human brain, biotechnologies human based and human relevant in Neurology.

#### **■ Introduzione**

Secondo il rapporto del 2022 dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) si stima una crescita allarmante della frequenza delle demenze, in particolare modo della malattia di Alzheimer, che si prevede passerà su scala mondiale da più di 35 milioni di casi riferiti al 2010 a 70 milioni di casi nel 2030 e 150 milioni di casi nel 2050. In Italia erano presenti nel 2018 un milione di pazienti, di cui 600000 circa affetti da morbo di Alzheimer<sup>1</sup>. Se osserviamo il versante pediatrico in riferimento ai disordini dello spet-

tro autistico negli ultimi 20 anni abbiamo assistito ad un incremento del 600% della sua diffusione ed attualmente tale grave patologia colpisce un bimbo su 80 nati vivi<sup>2</sup>. Infine, se osserviamo la frequenza in Italia del morbo di Parkinson, nel 2019 erano colpite più di 250000 persone, 1/5 delle quali con età inferiore ai 50 anni<sup>3</sup>. Tale drammatica situazione, oltre al carico di sofferenza e lutti dei pazienti e dei loro familiari, provoca un impatto economico ed un carico assistenziale tutt'altro che trascurabile per il nostro Servizio sanitario. La diffusione, quasi pandemica, delle patologie neurodegenerative sta ponendo una sfida difficile e complicata alle nostre competenze tecnico-scientifiche ed alle nostre capacità di soluzione di tale problematica.

Per contrastare tale grave situazione la Medicina clinica e la Ricerca biomedica hanno fatto riferimento alla nostra conoscenza del cervello che si è evoluta attraverso varie fasi: dalla più antica teorico-filosofica fino alla più moderna fase sperimentale. Questi studi hanno prodotto una grandissima quantità di dati, spesso disconnessi tra loro e limitati a singoli livelli di struttura e funzione cerebrale ma hanno comunque individuato tre percorsi d'indagine rilevanti: mappatura neuronale, mappatura della connettività e mappatura funzionale. Tuttavia, questi percorsi storici volti a svelare l'organizzazione ed il funzionamento del cervello non sono riusciti a superare in modo esaustivo la barriera di scala e complessità conaturata al cervello umano. Infatti, quando osserviamo la superficie del cervello umano dovremmo ingrandirla 1 milione di volte per poter osservare la citoarchitettura a strati della corteccia cerebrale e dovremmo ingrandire quest'ultima di altre 100.000 volte, per un totale di 100 miliardi d'ingrandimenti, per riuscire ad osservare il singolo neurone corticale. Tutto ciò ben spiega quanto il cervello umano sia ancora oggi un oggetto "misterioso" e di difficile osservazione nel suo funzionamento (Figura 1).

Per quanto attiene alla mappatura neuronale sin dalla prima osservazione delle fibre nervose da parte di van Leeuwenhoek, nel 1719, la ricostruzione del neurone umano come unità cellulare indipendente ha necessitato di quasi 240 anni. Storicamente per tipizzare le diverse popolazioni neuronali sono stati proposti metodi morfologici, elettrofisiologici, biochimici e molecolari ma

solo recentemente la trascrittomiche a singola cellula, sviluppata nei primi anni '90 del secolo scorso, è considerata in grado di fornire un censimento "completo" dei tipi neuronali. Tuttavia, esistono 86 miliardi di neuroni nel cervello umano e ciascun neurone sembra possedere un'identità sfuggente in quanto l'analisi trascrittomiche a singola cellula fotografa solamente un'istantanea delle fluttuazioni del contenuto di RNA neuronale. Inoltre, si è osservato che l'espressione genica e le proprietà fenotipiche dei neuroni possono modificarsi in modo dinamico in risposta a stimoli interni ed esterni. Pertanto, tutte le tipizzazioni neuronali sono da considerarsi probabilistiche ed ipotetiche<sup>4</sup>.

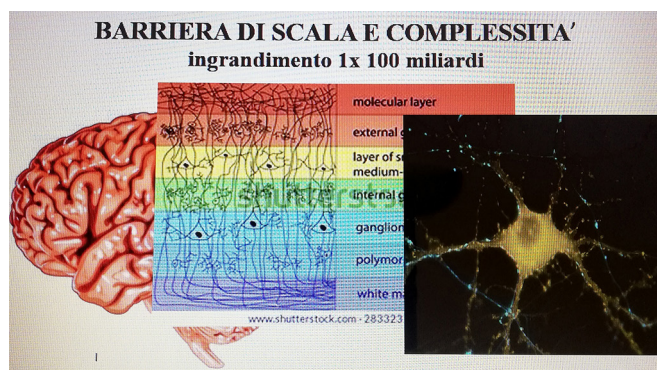
Per quanto riguarda la mappatura della connettività il termine "connettoma" è stato coniato nel 2005 ed ha avuto origine dalla convinzione di lunga data che le connessioni neurali siano correlate alle funzioni cerebrali. Oggi il concetto di "connettoma" si sta evolvendo fino ad includere l'insieme delle relazioni strutturali e funzionali tra diversi tipi di neuroni, così come tutte le loro connessioni con gli altri partner cellulari in una regione neurale definita o nell'intero cervello.

A seconda del livello di complessità e profondità di osservazione dobbiamo distinguere tra macro-meso-micro-nanoconnettomiche. La macroconnettomiche corrisponde al livello di osservazione clinica quando sottoponiamo un paziente a tecniche di *neuroimaging*. Tra queste la più importante è la Risonanza Magnetica Cerebrale funzionale (fRMN). Tale tecnica si basa sulla interrelazione dei segnali BOLD (*Blood Oxygen Level Dependent*) tra attivazione neuronale e flusso ematico ad essa correlato. Attualmente la risoluzione spaziale di fRMN raggiunge di una risoluzione millimetrica, ma questo non è ancora sufficiente per studiare come i singoli neuroni siano collegati per generare funzioni cerebrali, anche perché esiste il limite della risoluzione temporale, infatti a causa della dinamica temporale dell'accoppiamento neurovascolare, il picco di risposta BOLD a uno stimolo neurale si verifica con ritardo di 5-6 sec, quando, invece la velocità di conduzione neuronale è dell'ordine di millisecondi. Sebbene la fRMN sia uno strumento utile per studiare la connettività cerebrale umana *in vivo*, offre pochi dati sulla connettività tra neurocircuiti e tra i singoli neuroni, che è essenziale per comprendere i meccanismi alla base della funzione cerebrale. Da qui la necessità di meso-, micro- e nano-connettomiche.

Tuttavia, quest'ultimi livelli d'osservazione sono molto complessi perché pur raggiungendo livelli d'osservazione micrometrica e nanometrica devono abbandonare la microscopia ottica ed utilizzare, frequentemente, la microscopia elettronica, molto onerosa in termini economici e di personale dedicato. Inoltre, tali metodiche sono invasive e limitate a piccoli campioni di cervello umano *postmortem* oppure agli Animali da esperimento, ma così facendo, viene introdotto l'importantissimo bias della variabilità interspecifica.

Infine, non dobbiamo dimenticare che il concetto stesso di mappatura del connettoma "completo" è problematico per le seguenti tre ragioni fondamentali:

1) a causa della deduzione della connettività da dati



**Figura 1:** Barriera di scala e complessità, 100 miliardi di ingrandimenti scalari necessari all'osservazione del singolo neurone corticale a partire dalla superficie cerebrale.

sperimentali limitati già in partenza e per l'applicazione parallela di più metodi di imaging, la ricostruzione di qualsiasi mappa unificata della connettività neuronale si baserebbe solo su rappresentazioni probabilistiche.

2) tutte le componenti molecolari e cellulari del sistema nervoso sono costantemente sintetizzate o sostituite; pertanto, qualsiasi mappa del connettoma rappresenta solo un'istantanea del cervello dinamico.

3) infine, i neuroni possono cambiare rapidamente il loro ruolo funzionale in risposta a segnali chimici come peptidi, ormoni o neuromodulatori, tutti senza alcuna modifica visibile del diagramma di connettività ed ogni diagramma di cablaggio può codificare molti possibili risultati del circuito<sup>4</sup>.

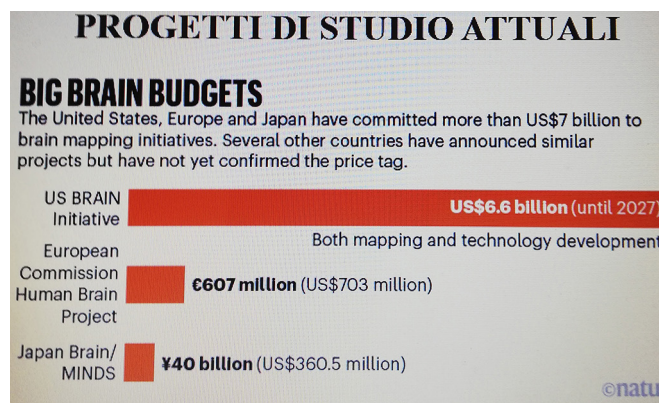
In riferimento alla mappatura funzionale la manipolazione sperimentale dell'attività neurale iniziò con la stimolazione elettrica dei nervi sciatici nella Rana, quasi 230 anni fa. Successivamente negli anni '50 sono stati sviluppati multielettrodi per registrare e manipolare l'attività neurale negli Animali da laboratorio viventi. Attualmente tali tecniche si stanno evolvendo verso la registrazione e la stimolazione croniche su larga scala a livello di un singolo neurone negli Animali che si comportano liberamente. L'Optogenetica, sviluppata all'inizio del XXI secolo, è stata utilizzata nell'ultimo decennio per testare e generare ipotesi sulla funzione cerebrale, prevalentemente, nelle neuroscienze non umane tramite stimolazione di neuroni e circuiti cerebrali resi sensibili e reattivi alla luce.

Nel tentativo di comprendere i meccanismi funzionali cerebrali si è passati dall'analisi del potenziale d'azione generato attraverso un singolo assone gigante del Calamaro (anni '80 del secolo scorso) all'analisi ed alla ricostruzione di diversi comportamenti di rete del microcircuito neocorticale dei Topi con 31.000 neuroni collegati attraverso 36 milioni di sinapsi. Un ampio corpus di set di dati sperimentali disconnessi e conoscenze accumulate dall'origine delle neuroscienze sono stati integrati in una copia digitale unificata del microcircuito neocorticale nel Topo, consentendo approfondimenti più dettagliati sui meccanismi neurali alla base della funzione cerebrale, tali risultati sono stati ottenuti nel progetto scientifico denominato BLUE BRAIN PROJECT<sup>4</sup>.

## ■ Le neuroscienze di simulazione

Allo scopo di cercare di superare la barriera di scala e complessità da circa un decennio vengono proposte le Neuroscienze di simulazione che mirano a colmare le lacune ed i limiti della nostra conoscenza della struttura e della funzione cerebrale attraverso la costruzione di una copia digitale del cervello integrando dati sperimentali ed approcci teorici e generando ipotesi funzionali valutabili. In tal solco s'inseriscono i seguenti grandi progetti di studio internazionali finanziati con 7 miliardi di dollari. (Figura 2)

Il progetto europeo Human Brain Project (HBP), che prevede anche la partecipazione italiana, ha consentito un avanzamento delle conoscenze neuroscientifiche: infat-



**Figura 2:** I grandi progetti di ricerca internazionale attualmente in corso e riguardanti le Neuroscienze di simulazione.

ti, entro settembre 2021 circa 1500 Riviste scientifiche internazionali con elevato *Impact Factor* hanno citato i risultati fin qui ottenuti in ambito HBP. Anche l'Italia ha partecipato ad uno studio, pubblicato su *Nature Computational Science* nell'aprile 2023, utilizzando l'infrastruttura digitale Ebrains di HBP che è una piattaforma per studi collaborativi internazionali. Il team composto dall'Istituto di biofisica del Cnr, Università di Modena e Reggio Emilia, in collaborazione con l'Institut de neurosciences des systèmes di Marsiglia, ha realizzato il primo modello virtuale in 3D della struttura e della connettività neuronale dell'area CA1 dell'ippocampo umano<sup>5</sup>.

Tuttavia, malgrado gli indubbi risultati ed i successi ottenuti dalle Neuroscienze di simulazione, sarebbe troppo semplicistico ritenere che un approccio monodisciplinare sia sufficiente a superare la barriera di scala e complessità.

## ■ Necessità di un approccio basato sulla biologia umana per le neuroscienze

È necessario considerare che, se su un piatto della bilancia poniamo la diffusione pandemica e il rilevantissimo impatto sociosanitario delle patologie neurodegenerative, sull'altro non possiamo porre nessuna terapia realmente efficace a contrastarle.

Secondo il rapporto del Joint Research Center europeo questa criticità è dovuta al fatto che i modelli animali impiegati nel *modeling disease* di queste malattie sono inefficienti e non affidabili nel simulare le specifiche condizioni patologiche umane. Da ciò deriva anche l'impossibilità di reperire terapie efficaci, dato che anche la scoperta di nuove terapie farmacologiche si avvale della sperimentazione animale che introduce effetti distorsivi determinati dalla variabilità interspecifica<sup>6</sup>. Tuttavia, la prospettiva di un nuovo tipo di Ricerca biomedica, basata sulla biologia umana, sta avanzando grazie al lavoro congiunto di S. Yamanaka, premio Nobel per la Medicina nel 2012, e di H. Clevers che ha reso recentemente disponibili biotecnologie incruente basate su colture tridimensionali di organi miniaturizzati umani (*organoidi*) spesso collegati tra loro da sistemi microfluidici (*organs-on-chip*, OOC) in grado di emulare con precisione la struttura e la funzione dei tessuti umani<sup>7</sup>. Tali metodologie innovative hanno riscosso un grandissimo interesse da parte della



comunità scientifica internazionale; basti pensare che, se si esegue una ricerca bibliografica su *PubMed* riguardante organoidi umani negli ultimi 5 anni si totalizzano più di 10000 pubblicazioni scientifiche e che il *World Economic Forum* nel 2016 ha annoverato gli OOC tra le prime 10 più importanti tecnologie a livello globale.

Tali biotecnologie innovative trovano già ora applicazione in molti settori biomedici come l'ottimizzazione del *modeling disease*, l'individuazione dei meccanismi patogenetici fini delle patologie neurodegenerative, la scoperta di nuovi farmaci, l'analisi tossicologica ed ecotossicologica, la terapia genica, solo per citarne alcuni.

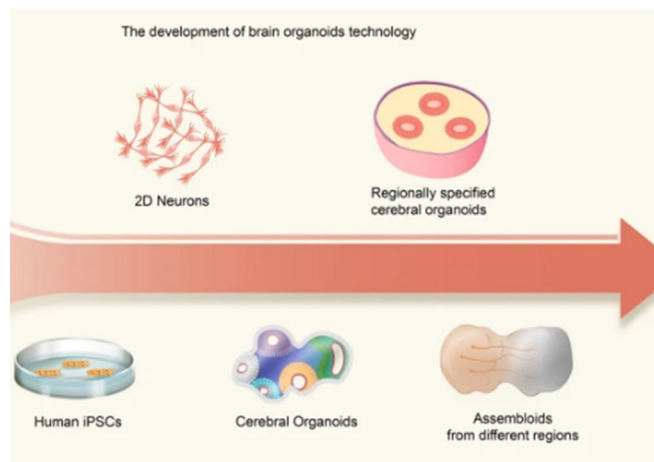
Ad esempio, esistono organoidi cerebrali umani derivanti da specifiche aree cerebrali che consentono di studiare in modo accurato alcune patologie neurologiche: organoidi retinici → retinite pigmentosa e degenerazione maculare; organoidi talamocorticali → schizofrenia; organoidi mesencefalici → m. Parkinson; organoidi cerebellari → medulloblastoma<sup>8</sup>. È anche possibile utilizzare queste tecnologie innovative in ambito ecotossicologico, infatti, data l'estensiva esposizione a contaminanti ambientali la cui azione biologica è in gran parte sconosciuta è essenziale valutare il rischio con metodiche che consentano di testare in ambito epidemiologico e sperimentale i mix di sostanze cui siamo di fatto esposti. Il progetto EDCMix Risk coordinato da Ricercatori italiani ha utilizzato organoidi cerebrali umani che hanno offerto, per la prima volta, l'opportunità di sondare direttamente gli effetti molecolari del mix di sostanze chimiche sul tessuto cerebrale umano, in fasi corrispondenti a quelle osservate durante la gravidanza. E si è scoperto che, anche a concentrazioni basse ed a torto ritenute innocue da studi preclinici condotti su modelli murini, il mix interferisce direttamente sia con alcuni geni coinvolti nello sviluppo del cervello che con altri legati all'autismo<sup>9</sup>. Oppure tali tecnologie possono essere impiegate per individuare i meccanismi patogenetici fini che sottendono al danno neurologico provocato dalle sostanze d'abuso. Ad esempio, utilizzando organoidi neocorticali umani Lee et al hanno scoperto in che modo la cocaina risulta neurotossica per il cervello umano in via di sviluppo<sup>10</sup>. È anche stato possibile ricostruire su chip il sistema nocicettivo umano allo scopo di studiare nuovi farmaci analgesici in alternativa agli oppioidi<sup>11</sup>.

In uno studio pubblicato il 2 maggio 2022 su *Nature Communications*, i Ricercatori della San Diego School of Medicine dell'Università della California hanno utilizzato organoidi cerebrali umani per svelare come una mutazione genetica associata a una forma profonda di autismo interrompa lo sviluppo neurale degli organoidi derivati dai pazienti. L'uso degli strumenti di terapia genica (tecnica CRISPR) per recuperare la funzione del gene E e del fattore di trascrizione TCF 4 ha ripristinato efficacemente la struttura e la funzione neurale negli organoidi trattati, aprendo finalmente una prospettiva terapeutica in questa devastante malattia del neurosviluppo pediatrico<sup>12</sup>.

Infine, è da citare l'ultima frontiera relativa a queste nuove tecnologie: gli Assembloidi.

Essi rappresentano una co-coltura di organoidi cerebrali umani di diversa origine: corticale, spinale, muscolare.

Quando vengono coltivati insieme riescono ad esprimere in modo autonomo sinapsi fisiologiche che realizzano un circuito neuronale funzionale umano che può essere utilizzato per studiare le malattie del 1° motoneurone, come la Sclerosi laterale amiotrofica SLA e/o patologie neuromuscolari<sup>13</sup>. (Figura 3)



**Figura 3:** Le tappe evolutive della ricerca human-based e human relevant nelle Neuroscienze, fondata su colture cellulari e tissutali sempre più avanzate.

## Conclusioni

Il Professor C. Koch, presidente dell'Allen Institute for Brain Science di Washington ha recentemente affermato che il cervello umano è ancora oggi un'entità misteriosa e complessa ma certamente, alla luce dei risultati finora riportati, le tecnologie innovative che abbiamo passato in rassegna, stanno contribuendo a svelare sempre più le modalità e le caratteristiche del suo funzionamento e della sua organizzazione.

## Bibliografia

1. <https://www.salute.gov.it/portale/demenze/dettaglioNotizieDemenze.jsp?...>
2. <https://www.autismspeaks.org>
3. [www.my-personaltrainer.it/salute/morbo-di-parkinson.html](http://www.my-personaltrainer.it/salute/morbo-di-parkinson.html)
4. Fan X, Markram H.A Brief History of Simulation Neuroscience. *Front. Neuroinform.* 07 may 2019, 13:32.
5. <https://biomedicalcue.it/primi-scaffold-3d-ippocampo-umano/49280>
6. [data.europa.eu/89h/a8fd26ef-b113-47ab-92ba-fd2be449c7eb](http://data.europa.eu/89h/a8fd26ef-b113-47ab-92ba-fd2be449c7eb)
7. Errico G. "New approach methodologies" come strumenti innovativi nella medicina di precisione e nella ricerca biomedica. *Il Cesalpino*, aprile 2021, 52:40-43
8. Guy B, Zhang JS, Duncan L et al. Human neural organoids: Models for developmental neurobiology and disease. *Dev. Biol.* 2021 Oct; 478: 102-121
9. Caporale N, Leemans M, Birgeron L et al. From cohorts to molecules: adverse impacts of endocrine disrupting mixtures. *Science* 18/02/22 Vol 375 issue 6582
10. Lee CT, Chen J, Kindberg A et al. CYP3A5 Mediates effects of cocaine on human neocortical organoids: studies using an in vitro 3D self-organized hPSC model with a single cortex like unit. *Neuropsychopharmacology* 2017 Feb; 42 (3) 774-784
11. <https://www.nanion.de/wp-content/uploads/2023/04/2023-Human-In...>
12. Papes F, Camargo AP, de Souza JS et al. Transcription factor 4 loss of function is associated with deficits in progenitor proliferation and cortical neuron content. *Nature Communication* 2022, 13, article n°2387
13. Andersen J, Revah O, Miura Y et al. Generation of functional human 3D cortico-motor Assembloids. *Cell* 2020 Dec 23; 183 (7): 1913-1929 e26.