

a cura di Lorella Marselli

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università di Pisa

Gli organoidi: modelli 3D per lo studio del diabete

Mara Suleiman¹, Agnese Filippello², Salvatore Piro², Nicola Marrano³ e Annalisa Natalicchio³

¹Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università di Pisa; ²Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Catania; ³Dipartimento dell'Emergenza e dei Trapianti di Organi, Università degli Studi di Bari Aldo Moro

<https://doi.org/10.30682/ildia2003f>

Il diabete costituisce una delle più importanti questioni sanitarie, sia per la prevalenza della malattia che per le complicanze ad essa associate. I farmaci al momento disponibili consentono il ripristino di una condizione di euglicemia e la prevenzione delle complicanze, ma non portano a guarigione. Per raggiungere questo obiettivo è necessaria una migliore comprensione della patologia sia a livello delle strutture e tessuti coinvolti nella regolazione dell'omeostasi glicemica, quali isole pancreatiche, intestino, fegato, tessuto muscolare e tessuto adiposo, sia a livello degli organi ed apparati associati alle complicanze. Pertanto, modelli di malattia, che consentano di studiare la patogenesi del diabete e la fisiopatologia a livello degli organi e tessuti coinvolti, e consentano lo screening di nuovi farmaci, costituiscono un valido supporto. Al riguardo un contributo importante deriva dagli organoidi (1).

GLI ORGANOIDI

Gli organoidi sono strutture biologiche derivate da cellule staminali pluripotenti (Pluripotent stem cells, PSCs) o da cellule staminali/progenitrici adulte (Adult tissue-resident stem cells, ASCs), caratterizzati da una struttura tridimensionale (3D) riproducente le caratteristiche dell'organo *in vivo*, sia per quanto riguarda la composizione cellulare che gli aspetti funzionali specifici (2).

I primi organoidi sono stati ottenuti nel 2009 da ASCs isolate dalle cripte intestinali di topo e di uomo (3-4). Fondamentali per questo risultato sono stati studi che avevano identificato la matrice extracellulare e fattori di crescita, come EGF (Epidermal Growth Factor), Noggin e R-spondin, quali componenti essenziali della nicchia delle cellule staminali intestinali (3). Pressoché contemporaneamente, organoidi intestinali sono stati ottenuti da PSCs umane mediante differenziazione e successiva coltura in una matrice 3D in presenza di fattori di crescita (5-6). In entrambi i casi, gli organoidi ottenuti avevano una composizione multicellulare e presentavano strutture organizzate in cripte e villi riproducenti l'architettura delle stesse strutture *in vivo* (3, 6).

I due studi, per lo sviluppo e applicazione di nuove tecniche e protocolli, sono stati fondamentali nel settore, rendendo possibile il successivo ottenimento di organoidi da tessuti diversi, quali lingua, polmone, fegato, rene, pancreas, prostata, ghiandola mammaria, cervello e orecchio interno.

MODELLI IN VITRO DI MALATTIA

Modelli *in vitro* di malattia sono utilizzati in tutti gli ambiti della ricerca medica. I vantaggi associati al loro utilizzo sono la possibilità di controllare le variabili sperimentali, di manipolare le cellule, e di misurare con precisione le risposte biologiche e biochimiche. I modelli maggiormente utilizzati fino ad ora sono le linee cellulari e le colture di cellule primarie, entrambe però presentano dei limiti. Le prime, coltivate in 2D, non necessariamente si comportano *in vitro* come se fossero *in vivo*, in quanto le condizioni di coltura non riproducono fedelmente il microambiente presente *in vivo*. Inoltre, le cellule “immortalizzate” sono necessariamente trasformate, questo le allontana dalla condizione biologica di “normalità”, ponendo la questione di quanto esse possano essere rappresentative della condizione fisiologica. Al contrario, le colture di cellule primarie costituiscono modelli fisiologicamente più vicini al tessuto o organo da cui derivano, in quanto contengono una popolazione di cellule rappresentativa del tessuto di origine. Tuttavia, anche queste colture presentano dei limiti, pressoché di natura tecnica: le cellule primarie non possono essere mantenute in coltura per lunghi periodi, ponendo la necessità di un approvvigionamento da donatori di tessuto multipli. Inoltre, le cellule primarie sono difficili da manipolare geneticamente. Questi limiti possono essere superati con gli organoidi, trattandosi di strutture tessutali primarie in 3D, multicellulari, auto-rigeneranti, riproducenti le caratteristiche dei tessuti che replicano, anche se coltivati per molti anni (7).

La principale potenzialità degli organoidi in ambito medico deriva dalla possibilità di ottenerli a partire da ASCs o PSCs derivate dal paziente, portando così alla creazione di un modello di malattia del tessuto primario che apre la strada alla medicina personalizzata (8-9). Ad ora hanno avuto applicazione in studi fisiologici riguardanti la funzione dei geni, lo sviluppo cellulare, la fisiologia di cellule e tessuti e l'interazione ospite-microbioma. La loro utilità è però chiaramente associata alla possibilità di poterli utilizzare quali modelli per lo studio di malattie genetiche, infettive e neoplastiche, per lo screening di farmaci e nell'ambito della medicina rigenerativa (10-11). Al riguardo, utile è la possibilità di tracciarne le caratteristiche genetiche e molecolari, e la possibilità di studiarli mediante tecniche di laboratorio sia standard che di alta tecnologia. Per esempio, possono essere facilmente manipolati utilizzando la tecnica di “editing” genico CRISPR-Cas9 (12), possono essere studiati utilizzando la spettrometria di massa (13), la citofluorimetria (14), le tecnologie “omiche” applicabili alle cellule singole (15), e le tecniche di immagine (16). Tuttavia, come altri modelli, anche gli organoidi presentano dei limiti, in parte riconducibili a fattori tecnici e in parte biologici. Un limite tecnico è l'inconsistenza del tasso di crescita e del tempo di differenziazione tra i vari laboratori; ad essa possono contribuire le matrici (Matrigel Matrix e Basement Membrane Extract) indispensabili per la crescita 3D, trattandosi di strutture di derivazione animale, che facilmente presentano variabilità tra lotti diversi, come pure la diversa concentrazione dei fattori di crescita contenuti nei mezzi di coltura condizionati prodotti nei singoli laboratori. I limiti biologici sono riconducibili alla mancanza, nel contesto dell'organoide, di molti componenti normalmente presenti ed essenziali negli organi *in vivo*, come la presenza di strutture nervose e vascolari, cellule del sistema immunitario innato o adattativo; inoltre, gli organoidi difficilmente raggiungono la maturità degli organi *in vivo*. Al riguardo, strutture simili al tessuto maturo sono state ottenute mediante trapianto ortotopico di organoidi PSCs-derivati in siti tessutali diversi (17). Per esempio, segmenti di intestino sono stati ottenuti con il trapianto di organoidi intestinali sotto la capsula renale (18), mentre organoidi pancreatici umani costituiti da strutture acinari e simil-duttali sono stati ottenuti con il trapianto di PSCs nel pancreas di topo (19). Infine, la composizione multicellulare 3D di un organoide, che ne rappresenta un elemento di forza, può talora costituire un elemento di debolezza rendendo difficile l'accesso al lume delle strutture cave per lo studio delle interazioni tra fattori ambientali ed epitelio. Ovviamente, nessun modello è perfetto e così pure gli organoidi; tuttavia, il settore si sta muovendo verso una sempre migliore standardizzazione che dovrebbe aiutare i ricercatori a trovare risposte a questioni biologiche importanti.

GLI ORGANOIDI: UNA OPPORTUNITÀ PER LA RICERCA DIABETOLOGICA

Nuove opportunità nella ricerca diabetologica derivano dalla possibilità di creare modelli tissutali di malattia primaria, modelli di tessuti insulino-sensibili e di tessuti periferici bersaglio delle complicanze del diabete, a partire da cellule primarie, evitando così l'utilizzo di cellule trasformate o la necessità di un grande numero di donatori. Gli organoidi possono essere generati anche da cellule ottenute da individui portatori di varianti genetiche o, in alternativa, l'espressione di tali varianti può essere indotta con la tecnica CRISPR/Cas9, rendendo possibile una valutazione del loro contributo nella patogenesi del diabete. I risultati di questi studi possono fornire importanti informazioni per la stratificazione dei pazienti e per interventi specifici. Gli organoidi hanno inoltre la potenzialità di accelerare la ricerca diabetologica nell'ambito della terapia cellulare sostitutiva, essendo la tecnologia tesa verso la produzione di nuove fonti di β -cellule (20-21). Si ritiene pertanto che questi modelli possano fornire nuove opportunità per la comprensione della fisiopatologia e per la cura del diabete.

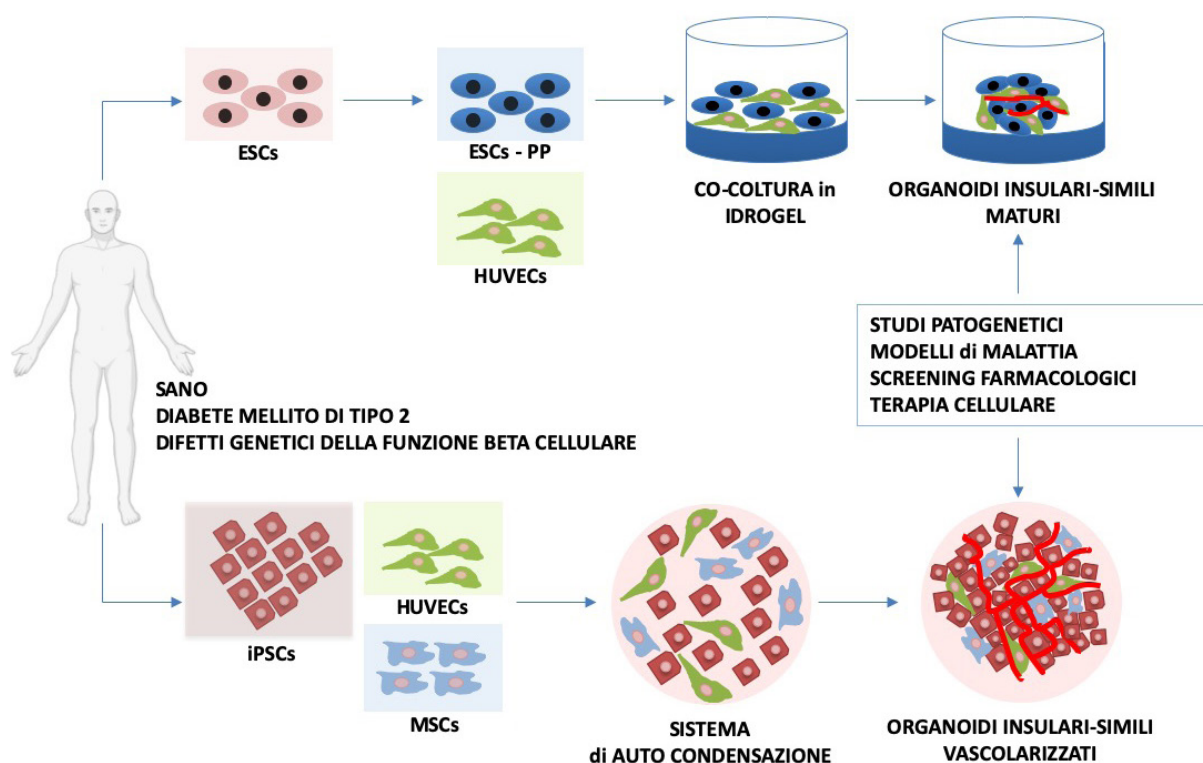
TESSUTI COINVOLTI NELLA REGOLAZIONE DELL'OMEOSTASI GLICEMICA

Pancreas

Le isole pancreatiche hanno un ruolo centrale nell'insorgenza e progressione della malattia diabetica; pertanto, la comprensione dei meccanismi patogenetici coinvolti nel danno β -cellulare, la conoscenza della fisiopatologia delle cellule insulari nella condizione diabetica e lo studio dei difetti β -cellulari associati a varianti genetiche potrebbero aprire la strada verso la scoperta di nuovi farmaci. Da questo punto di vista, gli organoidi insulari umani, oltre a costituire un valido supporto per lo studio della patologia a livello insulare, possono rappresentare anche un valido strumento per lo screening di nuovi farmaci.

I primi organoidi pancreatici sono stati ottenuti da cellule progenitrici pancreatiche embrionali di topo e di uomo dal gruppo di Anne Grapin-Bolton (22) e Raphael Scharfmann (23), rispettivamente. Gli organoidi, coltivati in Matrigel, avevano inizialmente la struttura di sfere cave costituite da cellule progenitrici, la cui attività replicativa e lo stato indifferenziato erano mantenuti da fattori di crescita (22-23); l'opportuna modificazione del mezzo di coltura ne favoriva il differenziamento, con la generazione di strutture aventi le caratteristiche delle linee cellulari acinari, duttali o endocrine negli organoidi murini (22), o esprimenti marcatori molecolari delle cellule progenitrici pancreatiche negli organoidi umani (23). Pressoché contemporaneamente, organoidi sono stati ottenuti da cellule staminali adulte CD133⁺ derivate dal pancreas di topo (24) e di uomo (25). Dopo l'espansione *in vitro*, modificando la tecnica di coltura, le cellule murine sono state differenziate in tutte le linee cellulari pancreatiche (24); al contrario, per la differenziazione delle cellule CD133⁺ umane nelle linee endocrine, si è resa necessaria l'espressione transgenica dei fattori di trascrizione NGN3, MAFA, PDX1 e PAX6, regolatori dello sviluppo insulare (25). Le strutture simil- β -cellulari sono state in grado di sintetizzare e rilasciare C-peptide in risposta a basse e ad alte concentrazioni di glucosio (2,5 mM e 16,7 mM) negli organoidi murini (24), mentre hanno risposto solo a basse concentrazioni di glucosio (2,0 mM) negli organoidi umani (25), deponendo per una immaturità funzionale delle strutture di derivazione umana.

Gli sforzi successivi si sono quindi concentrati sul miglioramento delle tecniche di coltura e il perfezionamento di protocolli con l'obiettivo di ottenere strutture simil- β -cellulari umane funzionalmente mature, condizione indispensabile per lo studio dei difetti β -cellulari alla base della malattia diabetica. Al riguardo, colture in sospensione di PSCs e cellule staminali embrionali (Embryonic Stem Cells, ESCs) umane, associate all'utilizzo di protocolli scalabili, hanno portato alla differenziazione con generazione di strutture simil- β -cellulari responsive alla stimolazione con basse ed elevate concentrazioni di glucosio *in vitro*, ma con la capacità di rimanere funzionali *in vivo*, nel topo trapiantato, solo per breve tempo (26-27). Un ulteriore passo in avanti è stato fatto con la produzione di organoidi aventi una struttura 3D simil-insulare ottenuti da ESCs (28-29) e PSCs (29) umane: utilizzando protocolli di differenziazione graduale, gli organoidi rilasciavano insulina in risposta al glucosio *in vitro*, tale capacità era conservata *in vivo* e, quando trapiantati in topi diabetici, ne normalizzavano la glicemia. Studi più recenti hanno consentito di ottenere organoidi insulari più

Figura 1 ♦ Rappresentazione schematica dei processi per la creazione di organoidi insulari-simili

Organoidi possono essere ottenuti da ESCs umane differenziate in cellule progenitriche pancreatiche (ESCs-PP) poste su una piattaforma di idrogel, per formare, in presenza di cellule endoteliali umane del cordone ombelicale (HUVECs), organoidi insulari-simili endotelizzati. Organoidi insulari-simili vascolarizzati possono essere ottenuti da iPSCs coltivate in un sistema di auto condensazione, in presenza di HUVECs e MSCs, che porta alla formazione di organoidi insulari-simili contenenti cellule endoteliali organizzate in strutture vascolari. Rappresentazione schematica ottenuta e modificata da Candiello J et al. (30) e Takahashi Y et al. (31)

complessi e maturi, contenenti cellule endoteliali e strutture vascolari, co-coltivando ESCs e cellule endoteliali umane ottenute dal cordone ombelicale (human umbilical cord-derived endothelial cells, HUVECs) in idrogel sintetici (30), o co-coltivando PSCs indotte (iPSCs), HUVECs e cellule staminali mesenchimali (Mesenchymal Stem Cell, MSCs) in un sistema di auto condensazione (31) (Fig. 1). Tali organoidi presentavano un miglioramento delle caratteristiche funzionali sia *in vitro* che *in vivo*, un migliore attecchimento dopo il trapianto e un migliore potenziale terapeutico quando trapiantati in topi diabetici (31).

Gli organoidi insulari costituiscono un modello migliore rispetto alle tradizionali linee β -cellulari. Tuttavia, nonostante il miglioramento strutturale e funzionale, presentano ancora un limite, che è la loro immaturità funzionale; infatti, non riescono a rilasciare insulina in maniera adeguata in risposta a stimoli di natura fisiologica sostenuti da nutrienti. Per tale motivo, le colture primarie di isole pancreatiche rappresentano ancora il “gold standard” per lo studio funzionale.

Per le loro caratteristiche, è intuitiva la potenzialità degli organoidi insulari per lo studio del diabete mellito di tipo 2 (DMT2) e per lo studio del diabete associato a varianti genetiche. Queste strutture potrebbero inoltre essere utilizzate per lo studio dei processi che portano a distruzione delle β -cellule su base immunitaria, come nel diabete mellito di tipo 1, o per studiare le modalità con cui i loci di suscettibilità genetica interagiscono con il sistema immunitario per guidare l’insorgenza e la progressione della malattia. I modelli per lo studio di queste interazioni potrebbero andare dalla semplice aggiunta di citochine al mezzo di coltura o all’utilizzo di mezzi condizionati mediante coltura di cellule immunitarie (32), alla co-cultura con cellule immunitarie attivate (33), o all’utilizzo di tecniche più complesse sviluppate per mimare i microambienti immunitari tumorali (34).

Gli organoidi pancreatici risultano particolarmente utili anche per la comprensione della morfogenesi del pancreas e lo sviluppo insulare. Per esempio, uno screening genetico funzionale tra organoidi derivati da progenitori SOX9⁺, ha identificato nel gene *Prdm16*, codificante un fattore di trascrizione, un nuovo regolatore di sviluppo insulare (35), con la potenzialità di poter utilizzare la sua funzione nell'ambito della medicina rigenerativa. Organoidi derivati da PSCs umane sono stati utilizzati per delineare gli aspetti pancreatici della fibrosi cistica e per lo screening di un set di attivatori del regolatore della conduttanza trans-membrana della fibrosi cistica (CFTR) (19).

Intestino

Dal 1986, anno in cui è stato descritto l'effetto incretinico nel paziente con diabete mellito (36), l'intestino ha cominciato a ricevere molto interesse come organo in grado di produrre ormoni. Alla data attuale sono stati descritti almeno 20 differenti ormoni prodotti dall'intestino; tra questi il GIP (Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide) (37) ed il GLP-1 (Glucagon-Like Peptide 1) (38). Data la loro importanza nel campo del diabete, dell'obesità e delle malattie cardiovascolari, molta attenzione è stata rivolta alla produzione di ormoni intestinali ed alla possibilità di modulare e controllare la loro secrezione sia in condizioni fisiologiche che in corso di malattie. La possibilità di creare strutture in grado di ripercorrere le tappe di sviluppo delle cellule endocrine intestinali riveste molto interesse, non solo nel campo della medicina rigenerativa. Diversi studi hanno dimostrato che gli organoidi intestinali offrono nuove opportunità di ricerca per comprendere la fisiologia e la fisiopatologia delle cellule endocrine intestinali (1).

Gli organoidi intestinali sono stati isolati per la prima volta da Sato et al. dalle cripte intestinali presenti nell'intestino tenue murino (3). Questi, facilmente isolabili in laboratorio, sono in grado di auto-organizzarsi in strutture tridimensionali ricapitolando sia l'architettura cripta-villo (Fig. 2A) che la fisiologia dell'epitelio intestinale e sono costituiti da tutti i tipi di cellule intestinali incluse le cellule staminali e le cellule enteroendocrine.

Le cellule enteroendocrine, insieme alle altre cellule intestinali originano tutte da nicchie di cellule staminali presenti all'interno delle cripte intestinali. Le cellule staminali intestinali sono in grado di proliferare regolarmente, dando origine ad una popolazione di progenitori cellulari chiamate cellule TA (Transit Amplifying) che proliferano e si differenziano migrando dall'area profonda delle cripte all'apice del villo intestinale; le cellule TA, a loro volta, vanno incontro a differenziamento, dando origine agli enterociti, alle cellule enteroendocrine ed alle cellule caliciformi (39); il processo di differenziamento delle cellule endocrine intestinali è finemente regolato e queste sono classificate in almeno dieci tipi cellulari, in base alla morfologia, alla localizzazione ed alla sintesi ormonale (Fig. 2B) (40). Negli organoidi intestinali è stata dimostrata la complessità di questo processo: le cellule che vengono prodotte alla base della cripta modificano il loro profilo di espressione ormonale durante il differenziamento verso il villo intestinale; questa plasticità ormonale potrebbe essere alterata in corso di diabete (41-42).

Gli organoidi intestinali permettono di studiare anche la funzione delle cellule enteroendocrine in condizioni fisiologiche o di stress metabolico analizzando l'assorbimento di nutrienti, le proteine di trasporto intestinali, la secrezione di più ormoni gastrointestinali contemporaneamente e le vie che regolano la loro secrezione (43).

Uno dei principali interessi terapeutici in campo diabetologico è quello di testare nuove molecole volte a migliorare la produzione endogena di GLP-1. Gli organoidi intestinali rappresentano un buon modello di studio per dimostrare ad esempio come molecole in grado di regolare differenti vie di signaling cellulare inducono un incremento del numero di L-cellule intestinali e migliorano la secrezione di GLP-1 (44-45). La produzione endogena di GLP-1 potrebbe essere migliorata anche da sostanze prodotte dell'organismo, un esempio è rappresentato dai prodotti della microflora intestinale del metabolismo batterico come gli acidi grassi a catena corta e gli acidi biliari che inducono l'espressione dei fattori di trascrizione che regolano il differenziamento delle L-cellule e la secrezione di GLP-1 negli organoidi intestinali (46-47). Il processo di sviluppo di farmaci antidiabetici aventi come target le L-cellule intestinali o altre cellule enteroendocrine è limitato anche dal numero esiguo di modelli cellulari umani; utilizzando organoidi intestinali ingegnerizzati attraverso la tecnologia CRISPR-Cas9 è stato possibile isolare L-cellule fisiologicamente funzionali come modello per testare nuovi farmaci *in vitro* (48).

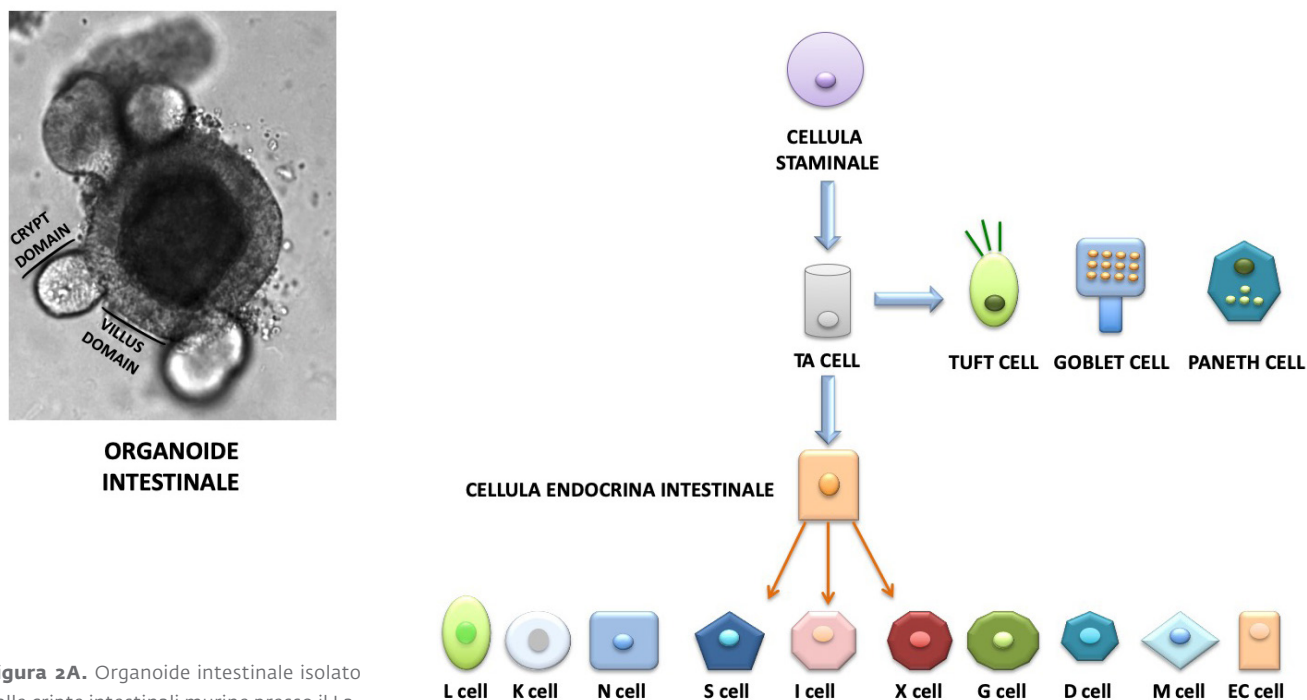
Figura 2 ♦ **Processo di differenziamento delle cellule endocrine intestinali**

Figura 2A. Organoide intestinale isolato dalle cripte intestinali murine presso il Laboratorio di Medicina Molecolare, Ospedale Garibaldi-Nesima, Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Catania

Figura 2B. Rappresentazione schematica del processo di sviluppo e di differenziamento delle cellule intestinali da singole cellule staminali. Le cellule enteroendocrine a loro volta si differenziano in almeno dieci tipi cellulari differenti

Il microbiota intestinale è alterato nei soggetti obesi, ma le implicazioni patologiche di questa alterazione non sono conosciute; poiché gli organoidi mantengono la loro polarità cellulare *in vitro*, potrebbero essere impiegati per studiare l'effetto del microbiota e dei suoi metaboliti sulla membrana apicale posta sul versante luminale dei soggetti obesi (49-50).

In futuro, gli organoidi potranno essere applicati anche nel trapianto di isole pancreatiche: è stato dimostrato, infatti, che gli organoidi intestinali possono essere convertiti in cellule beta ed utilizzati come fonte alternativa di β -cellule pancreatiche nel trattamento del diabete (51-52).

Fegato

Il fegato svolge un ruolo fondamentale nella regolazione dell'omeostasi glicemica. L'insulino-resistenza epatica comporta lo sviluppo di iperglicemia ed è implicata nella patogenesi della malattia non-alcolica da fegato grasso (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) che può successivamente evolvere in steatoepatite (non-alcoholic steatohepatitis, NASH). Gli attuali modelli animali di NAFLD e NASH non riproducono in maniera fedele la progressione della malattia umana. Gli organoidi epatici umani potrebbero pertanto costituire un valido strumento per lo studio dello sviluppo dell'insulino-resistenza, per lo studio del metabolismo del glucosio e delle risposte agli ormoni nel fegato, e per l'identificazione dei meccanismi sottostanti lo sviluppo di NAFLD e la sua progressione a NASH.

I primi organoidi epatici umani sono stati ottenuti da iPSCs, coltivate assieme a MSCs e cellule endoteliali, in Matrigel. Queste strutture consistevano principalmente di epatoblasti proliferanti (53-54). Più recentemente organoidi sono stati ottenuti da cellule progenitrici derivate da dotti biliari umani adulti (55) o da epatociti primari (56-57). La creazione di modelli di NAFLD e NASH è in fase di studio. L'esposizione di organoidi epatici di varie specie, compresa quella umana, ad acidi grassi porta ad accumulo intracellulare di lipidi, dimostrando che gli organoidi possono costituire un utile modello per lo studio di NAFLD (58). Più recentemente un modello umano di steatoepatite è stato descritto da

Takanori Takebe. Utilizzando iPSCs umane derivate da soggetti sani e malati, sono stati ottenuti organoidi epatici multicellulari, che, quando esposti ad acidi grassi non esterificati (NEFA), sono andati incontro ad accumulo di lipidi e, in successione, ad infiammazione e fibrosi – caratteristiche salienti della steatoepatite umana. L'aspetto interessante è che il fenotipo è regredito in seguito al trattamento con un agonista del recettore farnesoide X (farnesoid X receptor, FXR) (59). È auspicabile che una tale piattaforma possa essere usata per la comprensione dei meccanismi sottostanti la progressione di NAFLD a NASH e per la identificazione di nuovi trattamenti per queste patologie, per le quali al momento non ci sono opzioni farmacologiche approvate.

Muscolo scheletrico

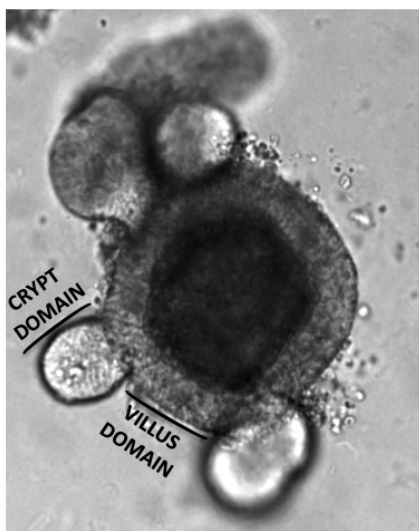
Il muscolo scheletrico rappresenta la principale sede di captazione e utilizzo di glucosio, processi mediati dall'insulina. Si stima che, in uno stato di riposo e a digiuno, il muscolo scheletrico disponga del 25% del glucosio plasmatico, e del 70-80% in fase postprandiale. Di conseguenza, l'insulino-resistenza a livello del muscolo scheletrico si ripercuote negativamente sul metabolismo del glucosio a livello sistemico e rappresenta un problema tipico di numerose patologie metaboliche, tra cui obesità e DMT2.

Lo sviluppo di un modello 3D umano, *in vitro*, di muscolo scheletrico permetterebbe di studiare i meccanismi alla base della patogenesi dell'insulino-resistenza muscolare nelle malattie metaboliche (1) e fornirebbe un nuovo modello pre-clinico per testare *in vitro* l'efficacia terapeutica e la tossicità di nuove molecole.

L'utilizzo di colture primarie tridimensionali di muscolo scheletrico è antecedente alla scoperta degli organoidi nel senso stretto del termine (1). Già diversi decenni fa, Vandenburgh et al., partendo da mioblasti murini isolati da biopsie di muscolo scheletrico, risospesi in Matrigel e/o collagene, coltivati in stampi di silicone con siti di attacco alle estremità, e sottoposti a stimoli meccanici, furono in grado di generare, *in vitro*, un muscolo scheletrico bioartificiale (bioartificial muscles, BAMs) (60-61). Si trattava di una struttura tridimensionale, contenente fibre muscolari postmitotiche, parallele, connesse a strutture simil-tendinee, organizzate in fasci muscolari in grado di contrarsi quando stimolati (60-61). Negli anni successivi, sono stati ottenuti BAMs anche a partire da mioblasti umani (human bioartificial muscles, HBAMs) (62-63). Questi organoidi possono essere modificati geneticamente, indotti a produrre e secernere proteine esogene e quindi utilizzati a scopo terapeutico come dispositivi impiantabili, secernenti proteine ricombinanti (61-62). Con gli studi di Gholobova D et al. (64-65), mediante co-culture di mioblasti e HUVECs, su idrogel di fibrina, è stato possibile vascolarizzare i BAMs e garantirne un miglior trofismo e dimensioni maggiori. Inoltre, per simulare l'innervazione del muscolo scheletrico, è possibile allestire co-culture di mioblasti e neuroni o espianiti di nervi, oppure sottoporre i BAMs a stimolazione elettrica (66-67).

Gli organoidi di muscolo scheletrico, a differenza delle colture 2D, forniscono un modello molto più vicino alla fisiologia: le cellule sono differenziate, orientate, innervate, irrorate, sotto tensione e in grado di contrarsi. Tuttavia, i mioblasti umani hanno un potenziale di espansione limitato e uno stato differenziativo instabile. Per superare questi problemi, sono stati messi a punto numerosi protocolli per la generazione di organoidi muscolari a partire da diversi tipi cellulari (per es. cellule satellite, mioblasti, mesoangioblasti, periciti, MSCs, PSCs, iPSCs, ESCs), differenziati *in vitro* in cellule muscolari scheletriche (66-68). Gli step necessari alla produzione di un organoide di muscolo scheletrico *in vitro* sono schematizzati nella figura 3.

In futuro, la sfida sarà quella di generare organoidi di muscolo scheletrico umano a partire da cellule (preferenzialmente mioblasti primari o derivati da PSCs umane) isolate da pazienti obesi o diabetici, per comprendere i meccanismi alla base dello sviluppo dell'insulino-resistenza e le sue conseguenze e testare nuove molecole per contrastarla (Fig. 4). Ad esempio, recentemente, Iovino et al. hanno generato miotubi da volontari sani e individui affetti da sindrome di Donohue, una malattia genetica associata a mutazioni nel recettore dell'insulina (69). I miotubi derivati da soggetti con sindrome di Donohue presentavano difetti nella trasmissione del segnale dell'insulina, nell'assorbimento del glucosio e nell'accumulo di glicogeno.

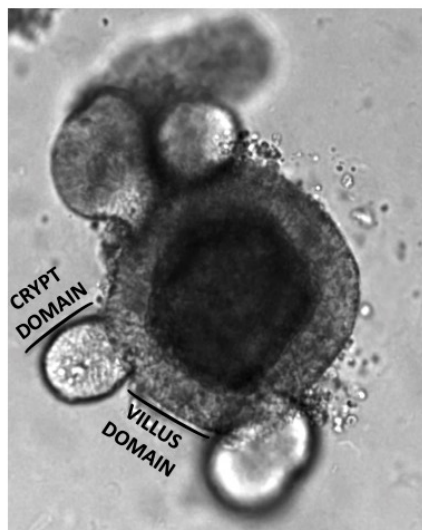
Figura 3 ♦ Step per la creazione di organoidi di muscolo scheletrico, in vitro**A**

ORGANOIDE INTESTINALE

La creazione di organoidi di muscolo scheletrico può avere origine da diverse linee cellulari: cellule satellite (SCs), mioblasti, mesoangioblasti, periciti, cellule staminali mesenchimali (MSCs), cellule staminali pluripotenti (PSCs) derivanti da progenitori miogenici, cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs), cellule staminali embrionali (ESCs). Il giusto orientamento delle fibre muscolari, necessario per la contrazione e la corretta trasduzione del segnale, viene ottenuto sottoponendo le cellule, durante la fusione in fibre, a forze unidirezionali mediante l'uso di punti di attacco alle estremità delle piastre di coltura oppure l'utilizzo di scaffold conduttivi. Le nascenti fibre muscolari devono essere mantenute in costante tensione per evitare l'atrofia: l'utilizzo di scaffold polimerici elastici o di tendini ingegnerizzati permette di bypassare questo problema. La co-coltura con cellule nervose e/o endoteliali garantisce la corretta innervazione e vascolarizzazione dell'organoide. Gli scaffold fungono da matrice extracellulare, sono cruciali per la corretta vascolarizzazione e per la sopravvivenza dell'organoide. Gli scaffold possono essere di origine biologica (es. matrice extracellulare di modelli animali), idrogel (es. collagene, gelatina, fibrina), polimeri sintetici o biologici (es. collagene, fibrina, alginato). Rappresentazione schematica ottenuta e modificata da Gholobova D et al. (66), Maffioletti SM et al. (67) e Chal J et al. (68)

Tessuto adiposo

Il tessuto adiposo bianco è responsabile sia dell'immagazzinamento, sotto forma di trigliceridi, dei lipidi derivanti dalla dieta o sintetizzati attraverso la *de novo* lipogenesi, che, durante il digiuno, della produzione di acidi grassi attraverso la lipolisi, del loro rilascio in circolo e del loro utilizzo come substrato energetico attraverso la β -ossidazione. Nei pazienti affetti da DMT2, l'insulino-resistenza del tessuto adiposo provoca una ridotta soppressione della lipolisi da parte dell'insulina e un aumento della concentrazione plasmatica di acidi grassi, che si accumulano in sedi ectopiche provocando danni lipotossici in diversi organi. Inoltre, il tessuto adiposo agisce anche da organo endocrino in grado di sintetizzare un numero di composti biologicamente attivi (adipochine, citochine, interleuchine) che regolano l'omeo-

Figura 4 ♦ Possibili applicazioni degli organoidi di muscolo scheletrico e tessuto adiposo in ambito metabolico

ORGANOIDE INTESTINALE

Gli organoidi di muscolo scheletrico e tessuto adiposo rappresentano dei modelli *in vitro* utili per lo studio dei meccanismi alla base dell'insorgenza dell'insulino-resistenza e per testare l'efficacia e/o la tossicità di nuove molecole atte a contrastarla. La prospettiva futura è quella di generare tali organoidi a partire da cellule isolate da pazienti obesi o diabetici al fine di studiare le differenze metaboliche e molecolari esistenti rispetto ai controlli sani. Gli organoidi di muscolo scheletrico possono essere utilizzati anche in un'ottica di medicina rigenerativa per sostituire *in vivo* il muscolo danneggiato; se indotti a produrre e secernere proteine esogene, possono essere utilizzati anche a scopo terapeutico come dispositivi impiantabili secernenti proteine ricombinanti. Inoltre, gli organoidi di tessuto adiposo possono essere utilizzati per studiare i processi di lipolisi, lipogenesi e adipogenesi

stasi metabolica, la sensibilità dei tessuti all'insulina e l'infiammazione. Nell'obesità e nel DMT2, questi processi sono inevitabilmente alterati.

Lo sviluppo di un modello 3D umano, *in vitro*, risulterebbe estremamente vantaggioso per studiare le disfunzioni del tessuto adiposo nelle malattie metaboliche e le alterazioni nell'assetto di secrezione delle adipochine e dei mediatori infiammatori, in un contesto di cross-talk multicellulare dinamico (1) (Fig. 4).

Vari tentativi per generare colture 3D di cellule adipose sono stati descritti. I primi protocolli prevedevano una co-coltura di cellule stromali adipose umane, ottenute da tessuto adiposo viscerale o lipoaspirato, con pre-adipociti, cellule endoteliali (ECs) e cellule muscolari lisce, in presenza di scaffold 3D o idrogel (70-71). Quando gli adipociti e le ECs erano isolati da soggetti obesi, esse mantenevano un fenotipo infiammatorio per almeno 7 giorni *in vitro* e un'alterata secrezione di adipochine, che erano responsabili di una ridotta insulino-sensibilità e di un'alterazione della via lipolitica (70). I protocolli di ultima generazione prevedono l'utilizzo di progenitori adiposi e/o cellule endoteliali, isolati entrambi dalla frazione stromale-vascolare del tessuto adiposo bianco umano (72-73), coltivati su scaffold 3D come il matrigel o semplicemente in "goccioline sospese", a creare organoidi sferoidali, auto-organizzati, vascolarizzati, con adipociti uniloculati, in grado di secernere adipochine e di eseguire lipolisi e lipogenesi (72-73).

Anche in questo caso, le PSCs differenziate in adipociti maturi, ma anche in cellule endoteliali, potrebbero fornire una valida alternativa per la creazione di organoidi di tessuto adiposo.

Questi nuovi protocolli aprono la strada all'utilizzo di colture adipose di lunga durata, derivate direttamente dai pazienti obesi o diabetici, per esplorare la patologia del tessuto adiposo nelle malattie metaboliche, i processi di lipolisi,

lipogenesi e adipogenesi, i meccanismi alla base dell'insorgenza dell'insulino-resistenza del tessuto adiposo, il network secretorio degli adipociti in diversi contesti fisiopatologici e, infine, il cross-talk tra adipociti e altri tipi cellulari che compongono il tessuto adiposo (cellule endoteliali e cellule del sistema immunitario) (Fig. 4).

MODELLI PER LO STUDIO DELLE COMPLICANZE DIABETICHE

Parte delle complicanze croniche del diabete sono determinate da alterazioni a carico del microcircolo, che portano a nefropatia, retinopatia e neuropatia diabetica. La mancanza di modelli accurati che riproducono le alterazioni patologiche molecolari e funzionali di queste complicanze ha limitato la comprensione dei meccanismi di malattia coinvolti, e delle modalità con cui tali complicanze possono essere trattate o prevenute. Al riguardo, gli organoidi possono costituire una opportunità.

L'esposizione all'iperglicemia provoca un ispessimento della membrana basale dei vasi, con conseguente compromissione della distribuzione di ossigeno e nutrienti ai tessuti, che porta ad infiammazione e danno tissutale. L'esposizione di organoidi vascolari umani derivati da iPSCs ad elevate concentrazioni di glucosio ha determinato un ispessimento anomalo della membrana basale, analogamente a quanto osservato nei vasi sanguigni quando esposti alla condizione di iperglicemia. Lo screening farmacologico eseguito su questo modello, ha consentito di identificare una nuova via, coinvolta nell'ispessimento della membrana basale, quale bersaglio farmacologico, confermando la potenzialità degli organoidi quali modelli di malattia (74).

Organoidi renali derivati da PSCs umane e di topo sono stati generati utilizzando protocolli diversi (75-76). Nelle prime strutture non erano riprodotti tutti i tipi cellulari renali e i nefroni erano disconnessi dai dotti collettori. Il miglioramento dei protocolli, con differenziazione separata per generare nefroni e bottoni ureterici, ha prodotto organoidi renali meglio definiti. L'applicazione di questi protocolli a iPSCs umane ha reso possibile la produzione di strutture nefroniche e bottoni ureterici *in vitro*; queste strutture, una volta trapiantate sotto la capsula renale di topo, sono andate incontro a connessione e vascolarizzazione (77). Studi per la creazione di modelli di nefropatia diabetica e danno renale, derivati da PSC, sono in corso, come pure per la creazione di un modello di fibrosi renale.

La retina umana è un organo complesso privo di capacità rigenerativa, che la rende particolarmente vulnerabile al danno. Organoidi retinici possono essere generati da ESCs umane e murine e da iPSCs umane, che, incluse in Matrigel, formano spontaneamente vescicole ottiche epiteliali emisferiche, che si invaginano e formano la coppa ottica (78-80). L'affinamento dei protocolli ha consentito di ottenere coppe retiniche in 3D contenenti fotorecettori maturi, provvisti di dischi nel segmento esterno e fotosensibilità (81). Organoidi retinici derivati dalle cellule di pazienti con retinopatia diabetica costituiscono una opportunità per meglio comprendere la fisiopatologia della complicanza, forniscono una piattaforma per lo screening di farmaci, e consentono di esplorare le varianti genomiche che rendono alcuni pazienti diabetici più suscettibili di altri al danno retinico.

IL FUTURO IN 3D

La tecnologia ha reso possibile la creazione di organoidi, quali modelli fedeli di qualsiasi tessuto corporeo. Essi promettono di facilitare la scoperta di nuovi meccanismi di malattia e di rendere veloce e sicura la scoperta di nuovi farmaci. Tuttavia, non esistono organi isolati; il cross-talk tra organi è rilevante per la fisiopatologia, soprattutto per malattie che colpiscono organi diversi come il diabete. Pertanto gli organoidi non possono sostituire gli studi *in vivo* condotti sull'intero organismo. Un contributo per lo studio *in vitro* delle interazioni tra organi proviene dalla bioingegneria attraverso la creazione di chip multifluidici ("organ-on-a-chip"): si tratta di sistemi in cui strutture rappresentative di organi diversi possono essere coltivate simultaneamente in compartimenti diversi e un sistema multifluidico controlla il flusso tra compartimenti simulando la attività, la meccanica e la risposta fisiologica di interi organi (82). Questi sistemi sono stati già utilizzati per le colture di cellule in 2D, la sfida ora è la loro applicazione alla tecnologia degli organoidi in 3D. Al riguardo, organoidi di isole umane derivati da iPSCs generati su una piattaforma "organ-on-a-chip",

in cui le cellule sono state prima differenziate e quindi portate a maturazione, hanno mostrato una somiglianza con i tessuti nativi maggiore rispetto agli organoidi ottenuti in coltura statica, con strutture insulino-simili funzionali (83). Attualmente sono disponibili sistemi “organ-on-a-chip” che variano da sistemi semplici, che usano la forza di gravità per dirigere il flusso, a tecnologie più complesse, basate su chip dotati di pompe di perfusione. È facile prevedere un futuro dove saremo in grado di connettere organoidi rappresentativi di tessuti umani diversi utilizzando la tecnologia basata su chip per studiare la comunicazione tra organi nella patogenesi del diabete. La tecnologia degli organoidi è pronta per poter essere applicata alla ricerca diabetologica.

BIBLIOGRAFIA

1. Tsakmaki A, Fonseca Pedro P, Bewick CA. Diabetes through a 3D lens: organoid models. *Diabetologia* 63: 1093-1102, 2020.
2. Fatehullah A, Tan SH, Barker N. Organoids as an in vitro model of human development and disease. *Nat Cell Biol* 18: 246-254, 2016.
3. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459: 262-265, 2009.
4. Sugimoto S, Sato T. Establishment of 3D intestinal organoid cultures from intestinal stem cells. *Methods Mol Biol* 1612: 97-105, 2017.
5. McCracken KW, Howell JC, Wells JM, Spence JR. Generating human intestinal tissue from pluripotent stem cells in vitro. *Nat Protoc* 6: 1920-1928, 2011.
6. Spence JR, Mayhew CN, Rankin SA, et al. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature* 470: 105-109, 2011.
7. Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science* 345: 1247125, 2014.
8. Sinagoga KL, Wells JM. Generating human intestinal tissues from pluripotent stem cells to study development and disease. *EMBO J* 34: 1149-1163, 2015.
9. Drost J, Clevers H. Translational applications of adult stem cell-derived organoids. *Development* 144: 968-975, 2017.
10. Artegiani B, Clevers H. Use and application of 3D organoid technology. *Hum Mol Genet* 27: R99-R107, 2018.
11. Takahashi T. Organoids for drug discovery and personalized medicine. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 59: 447-462, 2019.
12. Driehuis E, Clevers H. CRISPR/Cas 9 genome editing and its applications in organoids. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 312: G257-G265, 2017.
13. Gonneaud A, Asselin C, Boudreau F, Boisvert FM. Phenotypic analysis of Organoids by proteomics. *Proteomics* 17: 1700023, 2017.
14. Basak O, Beumer J, Wiebrands K, et al. Induced quiescence of Lgr5+ stem cells in intestinal organoids enables differentiation of hormone-producing enteroendocrine cells. *Cell Stem Cell* 20: 177-190 e174, 2017.
15. Lindeboom RG, van Voorthuijsen L, Oost KC, et al. Integrative multi-omics analysis of intestinal organoid differentiation. *Mol Syst Biol* 14: e8227, 2018.
16. Dekkers JF, Alieva M, Wellens LM, et al. High-resolution 3D imaging of fixed and cleared organoids. *Nat Protoc* 14: 1756-1771, 2019.
17. Holloway EM, Capeling MM, Spence JR. Biologically inspired approaches to enhance human organoid complexity. *Development* 146: dev166173, 2019.
18. Watson CL, Mahe MM, Munera J, et al. An in vivo model of human small intestine using pluripotent stem cells. *Nat Med* 20: 1310-1314, 2014.
19. Hohwieler M, Illing A, Hermann PC et al. Human pluripotent stem cell-derived acinar/ductal organoids generate human pancreas upon orthotopic transplantation and allow disease modelling. *Gut* 66: 473-486, 2017.
20. Dayem AA, Lee SB, Kim K, et al. Recent advances in organoid culture for insulin production and diabetes therapy: methods and challenges. *BMB Rep* 52: 295-303, 2019.

21. Dossena M, Piras R, Cherubini A, et al. Standardized GMP-compliant scalable production of human pancreas organoids. *Stem Cell Res Ther* 11: 94, 2020.
22. Greggio C, De Franceschi F, Figueiredo-Larsen M, et al. Artificial three-dimensional niches deconstruct pancreas development in vitro. *Development* 140: 4452-4462, 2013.
23. Bonfanti P, Nobecourt E, Oshima M, et al. Ex vivo expansion and differentiation of human and mouse fetal pancreatic progenitors are modulated by epidermal growth factor. *Stem Cells Dev* 24: 1766-1778, 2015.
24. Jin L, Feng T, Shih HP, et al. Colony-forming cells in the adult mouse pancreas are expandable in Matrigel and form endocrine/acinar colonies in laminin hydrogel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 3907-3912, 2013.
25. Lee J, Sugiyama T, Liu Y, et al. Expansion and conversion of human pancreatic ductal cells into insulin-secreting endocrine cells. *Elife* 2: e00940, 2013.
26. Pagliuca FW, Millman JR, Gurtler M, et al. Generation of functional human pancreatic beta cells in vitro. *Cell* 159: 428-439, 2014.
27. Russ HA, Parent AV, Ringler JJ, et al. Controlled induction of human pancreatic progenitors produces functional beta-like cells in vitro. *EMBO J* 34: 1759-1772, 2015.
28. Shim JH, Kim J, Han J, et al. Pancreatic islet-like threedimensional aggregates derived from human embryonic stem cells ameliorate hyperglycemia in Streptozotocin-induced diabetic mice. *Cell Transplant* 24: 2155-2168, 2015.
29. Kim Y, Kim H, Ko UH, et al. Islet-like organoids derived from human pluripotent stem cells efficiently function in the glucose responsiveness in vitro and in vivo. *Sci Rep* 6: 35145, 2016.
30. Candiello J, Grandhi TSP, Goh SK, et al. 3D heterogeneous islet organoid generation from human embryonic stem cells using a novel engineered hydrogel platform. *Biomaterials* 177: 27-39, 2018.
31. Takahashi Y, Sekine K, Kin T, et al. Self-condensation culture enables vascularization of tissue fragments for efficient therapeutic transplantation. *Cell Rep* 23: 1620-1629, 2018.
32. Powell N, Pantazi E, Pavlidis P, et al. Interleukin-22 orchestrates a pathological endoplasmic reticulum stress response transcriptional programme in colonic epithelial cells. *Gut* 69: 578-590, 2019.
33. Ibiza S, Garcia-Cassani B, Ribeiro H, et al. Glial-cell derived neuroregulators control type 3 innate lymphoid cells and gut defence. *Nature* 535: 440-443, 2016.
34. Neal JT, Li X, Zhu J, et al. Organoid modeling of the tumor immune microenvironment. *Cell* 175: 1972-1988, 2018.
35. Sugiyama T, Benitez CM, Ghodasara A, et al. Reconstituting pancreas development from purified progenitor cells reveals genes essential for islet differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 12691-12696, 2013.
36. Nauck M, Stöckmann F, Ebert R, Creutzfeldt W. Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 29: 46-52, 1986.
37. Buffa R, Polak JM, Pearse AC, et al. Identification of the intestinal cell storing gastric inhibitory peptide. *Histochemistry* 43: 249-255, 1975.
38. Eissele R, Göke R, Willemer S, et al. Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. *Eur J Clin Invest* 22: 283-291, 1992.
39. Barker N. Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 19-33, 2014.
40. Sjölund K, Sandén G, Håkanson R, Sundler F. Endocrine cells in human intestine: an immunocytochemical study. *Gastroenterology* 85: 1120-1130, 1983.
41. Beumer J, Artegiani B, Post Y, et al. Enteroendocrine cells switch hormone expression along the crypt-to-villus BMP signalling gradient. *Nat Cell Biol* 20: 909-916, 2018.
42. Gehart H, van Es JH, Hamer K, et al. Identification of enteroendocrine regulators by Real-Time single-cell differentiation mapping. *Cell* 176: 1158-1173, 2019.
43. Zietek T, Rath E, Haller D, Daniel H. Intestinal organoids for assessing nutrient transport, sensing and incretin secretion. *Sci Rep* 5: 16831, 2015.

44. Petersen N, Reimann F, van Es JH, et al. Targeting development of incretin-producing cells increases insulin secretion. *J Clin Invest* 125: 379-385, 2015.
45. Petersen N, Frimurer TM, Terndrup Pedersen M, et al. Inhibiting RHOA signaling in mice increases glucose tolerance and numbers of enteroendocrine and other secretory cells in the intestine. *Gastroenterology* 155: 1164-1176, 2018.
46. Petersen N, Reimann F, Bartfeld S, et al. Generation of L cells in mouse and human small intestine organoids. *Diabetes* 63: 410-420, 2014.
47. Lund ML, Sorrentino G, Egerod KL, et al. L-Cell differentiation is induced by bile acids through GPBAR1 and paracrine GLP-1 and serotonin signaling. *Diabetes* 69: 614-623, 2020.
48. Goldspink DA, Lu VB, Miedzybrodzka EL, et al. Labeling and characterization of human GLP-1-secreting L-cells in primary ileal organoid culture. *Cell Rep* 31: 107833, 2020.
49. Nagpal R, Newman TM, Wang S, et al. Obesity-linked gut microbiome dysbiosis associated with derangements in gut permeability and intestinal cellular homeostasis independent of diet. *J Diabetes Res* 2018: 3462092, 2018.
50. Co JY, Margalef-Català M, Li X, et al. Controlling epithelial polarity: a human enteroid model for host-pathogen interactions. *Cell Rep* 26: 2509-2520.e4, 2019.
51. Chen YJ, Finkbeiner SR, Weinblatt D, et al. De novo formation of insulin-producing “neo- β cell islets” from intestinal crypts. *Cell Rep* 6: 1046-1058, 2014.
52. Bouchi R, Foo KS, Hua H, et al. FOXO1 inhibition yields functional insulin-producing cells in human gut organoid cultures. *Nat Commun* 5: 4242, 2014.
53. Takebe T, Sekine K, Enomura M, et al. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature* 499: 481-484, 2013.
54. Takebe T, Sekine K, Kimura M, et al. Massive and reproducible production of liver buds entirely from human pluripotent stem cells. *Cell Rep* 21: 2661-2670, 2017.
55. Huch M, Gehart H, van Boxtel R, et al. Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver. *Cell* 160: 299-312, 2015.
56. Peng WC, Logan CY, Fish M, et al. Inflammatory cytokine TNF α promotes the long-term expansion of primary hepatocytes in 3D culture. *Cell* 175: 1607-1619, 2018.
57. Hu H, Gehart H, Artegiani B, et al. Long-term expansion of functional mouse and human hepatocytes as 3D organoids. *Cell* 175: 1591-1606, 2018.
58. Kruitwagen HS, Oosterhoff LA, Vernooij I, et al. Long-term adult feline liver organoid cultures for disease modeling of hepatic steatosis. *Stem Cell Rep* 8: 822-830, 2017.
59. Ouchi R, Togo S, Kimura M, et al. Modeling steatohepatitis in humans with pluripotent stem cell-derived organoids. *Cell Metab* 30: 374-384, 2019.
60. Vandenburgh HH, Swasdison S, Karlisch P. Computer-aided mechanogenesis of skeletal muscle organs from single cells in vitro. *FASEB J* 5: 2860-7, 1991.
61. Vandenburgh H, Del Tatto M, Shansky J, et al. Tissue engineered skeletal muscle organoids for reversible gene therapy. *Hum Gene Ther* 7: 2195-200, 1996.
62. Powell C, Shansky J, Del Tatto M, et al. Tissue-engineered human bioartificial muscles expressing a foreign recombinant protein for gene therapy. *Hum Gene Ther* 10: 565-577, 1999.
63. Powell CA, Smiley BL, Mills J, et al. Mechanical stimulation improves tissue-engineered human skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 283: C1557-1565, 2002.
64. Gholobova D, Decroix L, Van Muylder V, et al. Endothelial network formation within human tissue-engineered skeletal muscle. *Tissue Eng Part A* 21(19-20): 2548-558, 2015.
65. Gholobova D, Gerard M, Terrie L, et al. Coculture method to obtain endothelial networks within human tissue-engineered skeletal muscle. *Methods Mol Biol* 1889: 169-183, 2019.
66. Gholobova D, Terrie L, Gerard M, et al. Vascularization of tissue-engineered skeletal muscle constructs. *Biomaterials* 235: 119708, 2020.

67. Maffioletti SM, Sarcar S, Henderson ABH, et al. Three-dimensional human iPSC-derived artificial skeletal muscles model muscular dystrophies and enable multi-lineage tissue engineering. *Cell Rep* 23: 899-908, 2018.
68. Chal J, Pourquie O. Making muscle: skeletal myogenesis in vivo and in vitro. *Development* 144: 2104-2122, 2017.
69. Iovino S, Burkart AM, Warren L, et al. Myotubes derived from human-induced pluripotent stem cells mirror in vivo insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: 1889-94, 2016.
70. Pellegrinelli V, Rouault C, Veyrie N, et al. Endothelial cells from visceral adipose tissue disrupt adipocyte functions in a three-dimensional setting: partial rescue by angiopoietin-1. *Diabetes* 63: 535-549, 2014.
71. Abbott RD, Wang RY, Reagan MR, et al. The use of silk as a scaffold for mature, sustainable unilocular adipose 3D tissue engineered systems. *Adv Healthc Mater* 5: 1667-77, 2016.
72. Klingelhutz AJ, Gourronc FA, Chaly A, et al. Scaffold-free generation of uniform adipose spheroids for metabolism research and drug discovery. *Sci Rep* 8: 523, 2018.
73. Muller S, Ader I, Creff J, et al. Human adipose stromalvascular fraction self-organizes to form vascularized adipose tissue in 3D cultures. *Sci Rep* 9: 7250, 2019.
74. Wimmer RA, Leopoldi A, Aichinger Met, al. Human blood vessel organoids as a model of diabetic vasculopathy. *Nature* 565: 505-510, 2019.
75. Taguchi A, Kaku Y, Ohmori T, et al. Redefining the in vivo origin of metanephric nephron progenitors enables generation of complex kidney structures from pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 14: 53-67, 2014.
76. Takasato M, Er PX, Chiu HS, et al. Kidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis. *Nature* 526: 564-568, 2015.
77. Tsujimoto H, Kasahara T, Sueta SI, et al. A modular differentiation system maps multiple human kidney lineages from pluripotent stem cells. *Cell Rep* 31: 107476, 2020.
78. Eiraku M, Takata N, Ishibashi H, et al Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature* 472: 51-56, 2011.
79. Nakano T, Ando S, Takata N, et al. Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs. *Cell Stem Cell* 10: 771-785, 2012.
80. Meyer JS, Howden SE, Wallace KA, et al. Optic vesicle-like structures derived from human pluripotent stem cells facilitate a customized approach to retinal disease treatment. *Stem Cells* 29: 1206-1218, 2011.
81. Zhong X, Gutierrez C, Xue T, et al. Generation of three dimensional retinal tissue with functional photoreceptors from human iPSCs. *Nat Commun* 5: 4047, 2014.
82. Sosa-Hernandez JE, Villalba-Rodriguez AM, Romero-Castillo KD, et al. Organs-on-a-chip module: a review from the development and applications perspective. *Micromachines* 9: 536, 2018.
83. Tao T, Wang Y, Chen W, et al. Engineering human islet organoids from iPSCs using an organ-on-chip platform. *Lab Chip* 19: 948-958, 2019.