



scienza attiva[®]

Cellule staminali neurali

Prof. Luca Bonfanti

**Università di Torino - Facoltà di Medicina Veterinaria
Neuroscience Institute Cavalieri Ottolenghi (NICO)**

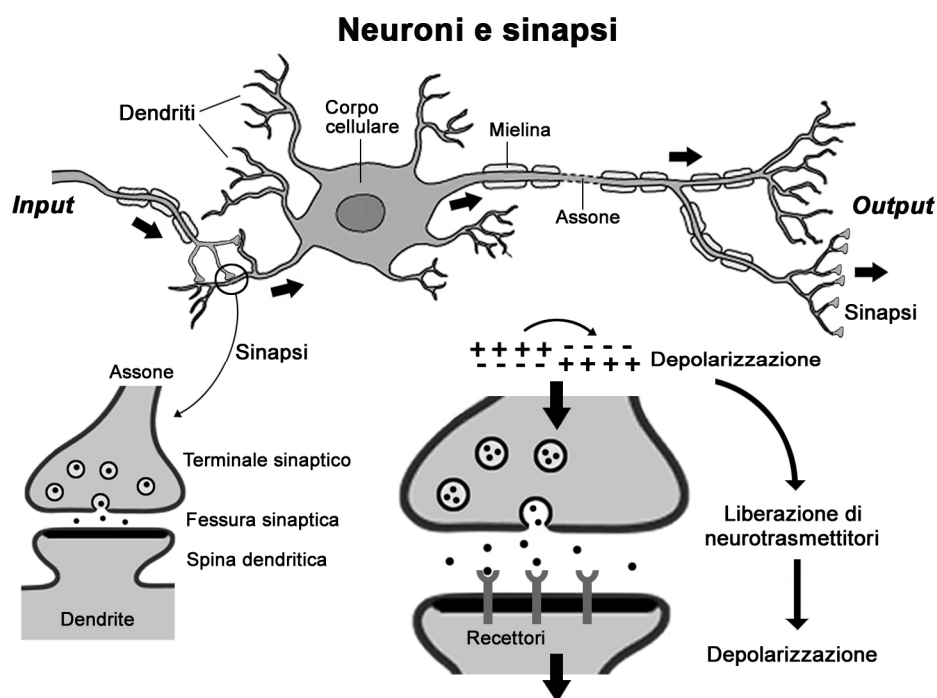
Focus:
Le cellule staminali neurali

Background: Complessità e staticità del sistema nervoso

Il *sistema nervoso* è un insieme di organi che contribuiscono a svolgere le funzioni sensoriali, motorie e di relazione dell'intero organismo. Alcuni di questi organi (cervello, cervelletto, midollo spinale) costituiscono il *sistema nervoso centrale* (SNC), formato dalle *cellule nervose* (neuroni) e *gliali* accolte all'interno del cranio e della colonna vertebrale.

I nervi, fasci di prolungamenti nervosi che originano principalmente dai neuroni del SNC e fuoriescono dalle cavità ossee sopra citate, raggiungono il resto dell'organismo e formano il *sistema nervoso periferico*.

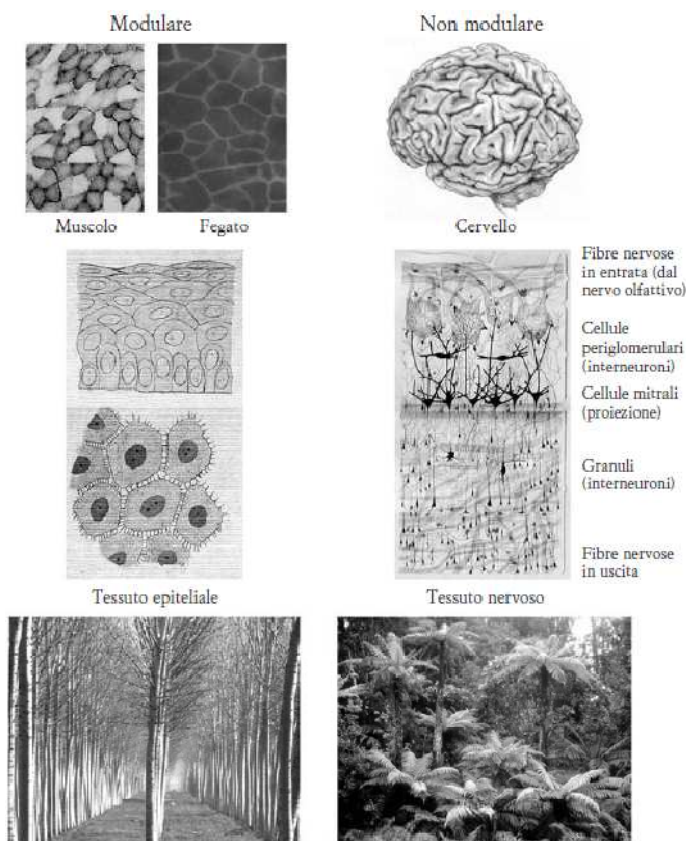
Il SNC contiene da 10 a 100 miliardi di cellule nervose, i *neuroni*. I neuroni sono costituiti da un *corpo cellulare*, che contiene il nucleo con il DNA, da uno o più *dendriti* (prolungamenti molto ramificati che conducono gli stimoli provenienti da altri neuroni o dalla periferia verso il corpo cellulare) e da un *assone* (prolungamento che conduce lo stimolo dal corpo cellulare ad altri neuroni o alla periferia). La membrana cellulare dei neuroni è eccitabile, cioè in grado di condurre stimoli di tipo elettrico (*onde di depolarizzazione*) a grandissima velocità, derivanti da un rapido passaggio di ioni tra l'esterno e l'interno della membrana, in senso centripeto (nei dendriti) e centrifugo (nell'assone). Essi possono dunque raccogliere informazioni e generare nuovi stimoli da trasmettere ad altri neuroni tramite le *sinapsi*, costituendo complesse *reti neurali*. Mentre alcuni neuroni proiettano l'assone verso le cellule vicine (ad es. tra diverse parti della corteccia cerebrale) altri raggiungono notevoli distanze (ad es. tra la corteccia cerebrale e il midollo spinale).



Oltre ai neuroni, nel SNC vi sono le cellule gliali: gli *astrociti*, che danno sostegno fisico e metabolico ai neuroni, gli *oligodendrociti*, che formano un rivestimento isolante intorno agli assoni (la mielina), e la *microglia*, che rappresenta le cellule di tipo immunitario all'interno del SNC. Anche se il SNC è formato da soli 4 'tipi' di cellule, ognuno di essi, soprattutto i neuroni, è estremamente eterogeneo. E' infatti possibile distinguere numerosi 'sottotipi' di neuroni in base alla loro forma, profilo molecolare, funzione, ecc.

L'insieme delle caratteristiche anatomiche (diversi tipi cellulari e complesse reti neurali), e funzionali (sensitive, motorie, di connessione, di pensiero astratto, ecc.) del SNC fanno di questo tessuto un esempio di estrema complessità, ed è pertanto intuitivo comprendere come una lesione di tale sistema sarà difficilmente riparabile. In realtà, il vero problema sta nel fatto che il tessuto nervoso, a differenza della maggior parte degli altri tessuti del corpo, è 'perenne', cioè non è in grado di rinnovare le sue cellule. Ciò implica che ogni neurone o altro tipo cellulare che venga perso in seguito a malattia o all'invecchiamento, non verrà sostituito.

Questo limite del SNC ha senso se si considerano i circuiti neurali come un insieme di cavi e connessioni che non devono subire grosse variazioni nel tempo. In realtà, alcune piccole variazioni, soprattutto a livello delle sinapsi, sono possibili. E' il fenomeno della *plasticità neuronale* che consente di adattare l'attività del SNC (e in parte anche la sua struttura microscopica) alle sfide ambientali in cui l'individuo vive.



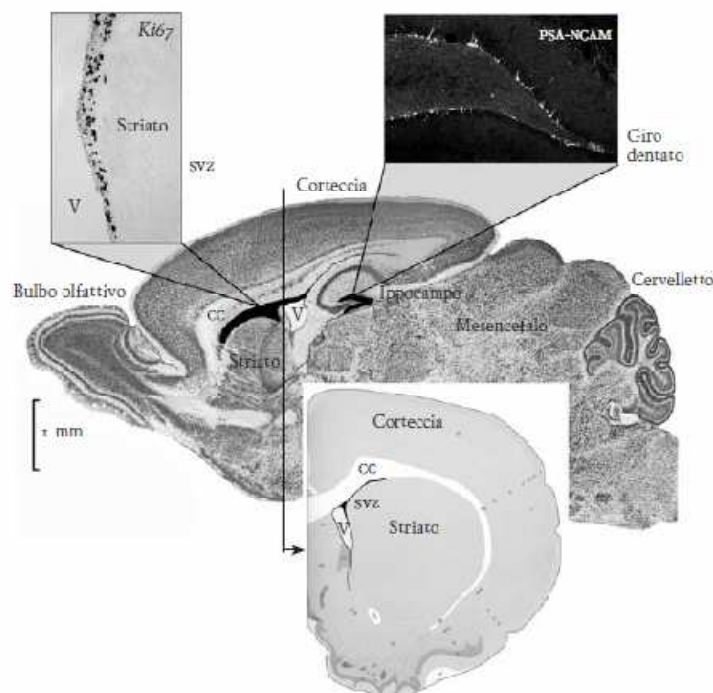
Complessità del sistema nervoso. Il tessuto nervoso ha un'organizzazione prevalentemente *non modulare*, diversa da quella *modulare* (cioè formata da *unità ripetitive*) riscontrabile in molti altri organi. Il paragone con diversi tipi di vegetazione (il pioppeto regolare e la foresta pluviale caotica) può dare un'idea di tale complessità morfologica, e di come i processi riparativi/rigenerativi siano altamente improbabili nel tessuto nervoso. Sarà infatti possibile sostituire alcuni alberi del pioppeto ma non la complessa nicchia ecologica di una porzione di foresta.

Negli ultimi 20 anni, la ricerca ha rivelato che la genesi di nuovi neuroni è in realtà possibile in alcune zone del SNC dei mammiferi, incluso l'uomo. Questo fenomeno è detto *neurogenesi adulta*.

La neurogenesi adulta

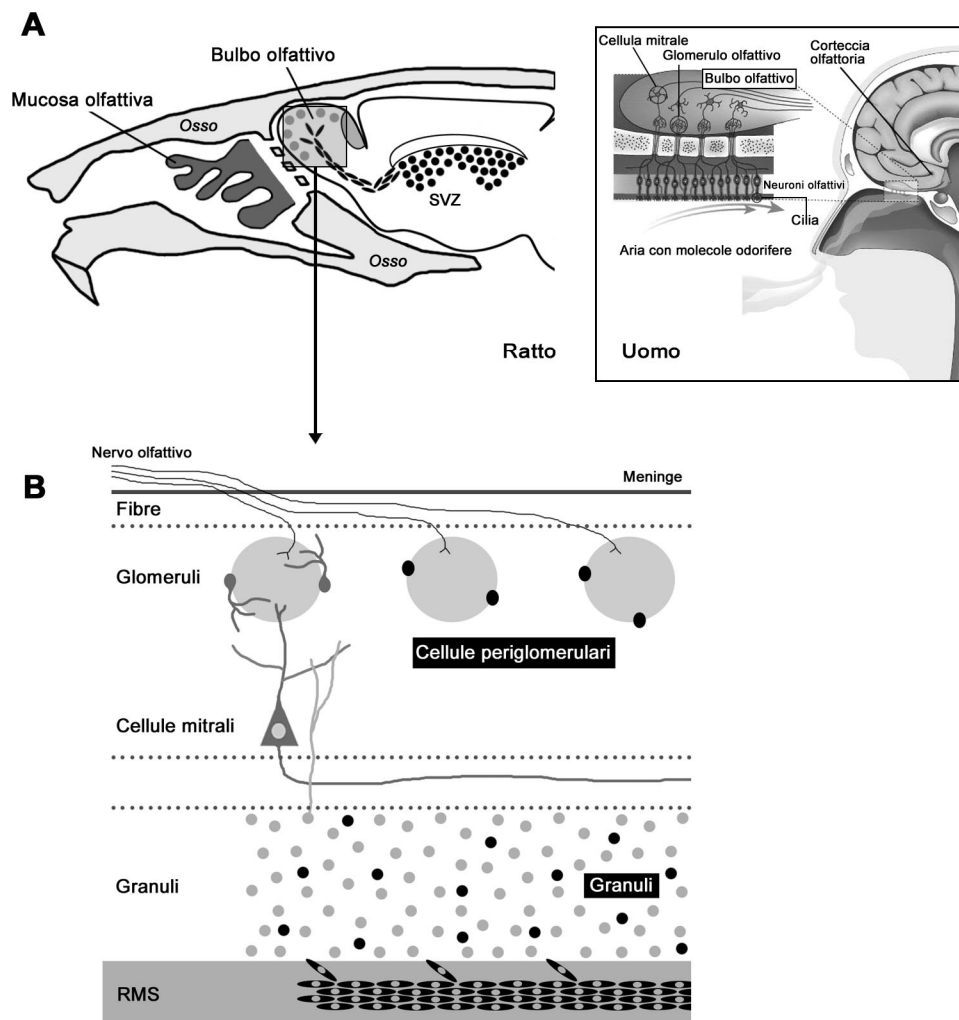
Sebbene l'idea fosse già stata proposta negli anni '60, la genesi di nuovi neuroni in un cervello di mammifero adulto è stata negata per lungo tempo, e soltanto nel 1994 definitivamente accettata. Questa lunga 'gestazione' dimostra come la scienza proceda in modo lento, con progressive verifiche, ratificando un concetto nuovo come 'vero' solo dopo dimostrazioni incrociate di diversi laboratori. L'impiego di nuove tecniche d'indagine è stata fondamentale per consentire la dimostrazione definitiva del fenomeno. Ad esempio è stata introdotta una nuova tecnica molecolare per marcare le cellule in divisione: iniettando nel sangue un analogo delle basi azotate (le molecole che compongono il DNA) legato ad un marcatore fluorescente, questo viene 'incorporato' durante la duplicazione del DNA rendendo così 'visibile' il nucleo delle cellule figlie. Ciò ha consentito di 'vedere' le cellule neo-generate nel cervello e di seguire il loro comportamento nel tempo.

Così è stato possibile dimostrare che alcuni neuroni vengono continuamente generati in due piccole aree cerebrali: la *zona sottoventricolare* (SVZ) che si trova vicino ai ventricoli (cavità ripiene di liquido nel profondo degli emisferi cerebrali) e la *zona sottogranulare* (SGZ) dell'ippocampo (implicato in memoria e apprendimento). Le cellule generate nell'SVZ migrano fino al bulbo olfattivo, la parte anteriore del cervello che elabora gli stimoli olfattivi. In entrambi i casi le cellule neogenerate vanno a sostituire dei neuroni morti nei circuiti nervosi preesistenti. Ciò consente una maggiore plasticità che non consiste solo nella formazione di nuove sinapsi (formate da neuroni già esistenti) ma nell'introduzione di nuovi neuroni.



Zone neurogeniche adulte (in nero) nel cervello dei roditori. Nella foto a sinistra in alto si vedono i nuclei (pallini neri) delle cellule in proliferazione nella zona sottoventricolare (SVZ). Nella foto a destra in alto si vedono le cellule neogenerate (in bianco) nell'ippocampo.

La neurogenesi adulta ha scardinato un dogma della neurobiologia: la convinzione che tutti i nostri neuroni siano generati durante lo sviluppo embrionale e che dopo la nascita non ne possono nascere di nuovi. Il fatto che la genesi di nuove cellule sia possibile per l'intera vita dell'individuo ha ovviamente aperto nuove prospettive per la cura delle malattie neurodegenerative (Alzheimer, Huntington, Parkinson, ecc.) in cui i neuroni persi in seguito alla degenerazione non vengono rimpiazzati spontaneamente. Tuttavia, il fenomeno di genesi avviene solo nelle due piccole aree sopra descritte e il resto del SNC (cioè quello in genere colpito dalle patologie) rimane sostanzialmente un tessuto perenne. E' stato infatti osservato che in caso di perdita di neuroni le cellule dell'SVZ e dell'SGZ *non* sono in grado di provvedere alla loro sostituzione. Infatti, le cellule neogenerate in bulbo olfattivo e ippocampo hanno solo la funzione di garantire la plasticità 'fisiologica' dei circuiti legati all'apprendimento, alla memoria e all'olfatto. Queste funzioni sono di fondamentale importanza per la sopravvivenza (ricerca del cibo, riproduzione, percezione dei predatori, ecc.) per cui la neurogenesi adulta è stata selezionata dall'evoluzione.



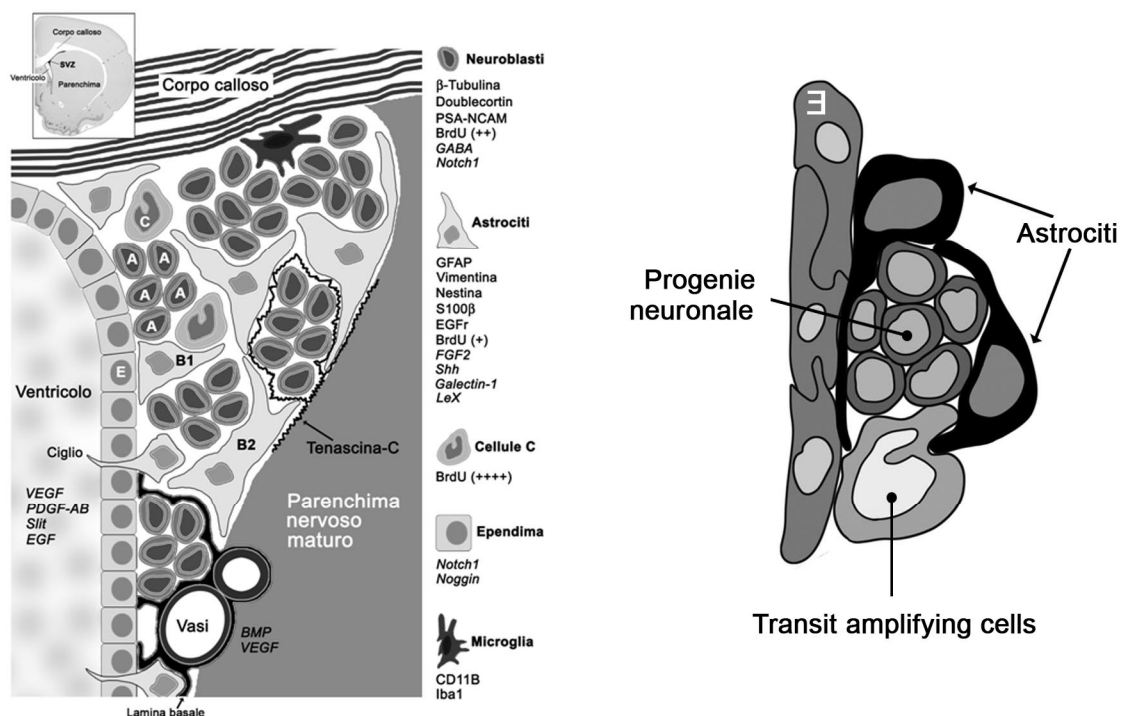
Neurogenesi nel sistema olfattivo. A, Schema del sistema olfattivo nel ratto (a sinistra) e nell'uomo (a destra). Due diverse fonti di plasticità strutturale convergono nel bulbo olfattivo. Quelle in provenienza dalle cavità nasali forniscono nuove terminazioni nervose, mentre dall'svz cerebrale arrivano nuove cellule. B, Schema ingrandito dei diversi strati del bulbo olfattivo, con alcune componenti cellulari (a sinistra) e le cellule neogenerate (in nero) provenienti dal rostral migratory stream (RMS). I granuli, le cellule mitrali e le cellule periglomerulari costituiscono gli elementi della «corteccia a tre strati» (gl: glomeruli olfattivi).

In realtà, in altri animali non mammiferi, come i pesci, gli anfibi e gli invertebrati, la neurogenesi è molto più attiva e persiste in varie zone del SNC. Come conseguenza, in queste specie il SNC può rigenerare in caso di lesione, talvolta arrivando a ricostruire interi circuiti nervosi. E' evidente, quindi che nel corso dell'evoluzione la capacità rigenerativa è stata persa, e la capacità neurogenica fortemente ridotta. Nei mammiferi sono rimaste alcune aree di neurogenesi ma esclusivamente finalizzate al ricambio di neuroni in specifici circuiti nervosi.

Ma come è possibile che in un tessuto così statico, complesso e da sempre considerato incapace di rinnovarsi la genesi di nuovi neuroni possa avvenire? E' possibile in quanto nelle due aree neurogeniche esistono *cellule staminali* in grado di auto-rinnovarsi e di generare progenitori neurali. E ciò è possibile poiché nell'SVZ e SGZ esiste una nicchia staminale di derivazione embrionale e attiva per tutta la vita. Infatti, come è stato precedentemente descritto (si veda la parte generale), le cellule staminali adulte possono sopravvivere e svolgere il loro compito soltanto in 'nicchie' tissutali in cui vengano prodotti tutti i fattori che ne regolano la biologia.

Le cellule staminali neurali e la loro nicchia

Le staminali neurali sono state scoperte nel 1992. Isolando un po' di tessuto nervoso cerebrale delle zone neurogeniche è possibile espandere in coltura (in vitro) una popolazione di cellule staminali. Sebbene in coltura queste cellule sono oggi ben studiate (vedi paragrafo seguente), molto di meno si sa del loro comportamento all'interno del cervello (in vivo), cioè nel loro ambiente naturale.



Organizzazione cellulare e molecolare della nicchia staminale dell'SVZ. In alto a sinistra, l'svz come appare sugli atlanti del cervello (in nero). Nel disegno ingrandito, a sinistra: i principali tipi cellulari della nicchia staminale e alcune molecole coinvolte nel suo controllo (in tondo, i marcatori e, in corsivo, i fattori di regolazione). A destra, i tre tipi cellulari del lineage.

Questo tipo di studio è reso difficile dall'estrema complessità del tessuto nervoso (le zone neurogeniche si trovano in sede molto profonda, praticamente al centro del cervello) e dal fatto che

in vivo esse si comportano in modo diverso dalle condizioni in vitro. In aggiunta, essendo esse contenute e regolate nella *nicchia staminale*, qualsiasi perturbazione di questo micro-ambiente (ad esempio conducendo l'esperimento) altererà le loro caratteristiche e il loro comportamento.

Detto questo, la ricerca ha comunque chiarito molti aspetti. Ad esempio oggi sappiamo che nelle zone neurogeniche vi è un grande addensamento di astrociti e che le cellule staminali sarebbero identificabili con alcuni di essi (in realtà indistinguibili dagli altri). Questi pochi '*astrociti-staminali*' ogni tanto si dividono e generano progenitori in grado di proliferare velocemente (per questo detti: *transit amplifying cells*), aumentando così in modo clonale la popolazione di cellule figlie. Queste cellule tuttavia sono già diverse dall'astrocita e generano altre cellule con caratteri di *precursore neuronale* (cioè di giovani neuroni).

E' così che, nella 'magia' della nicchia staminale neurale, pochi astrociti-staminali possono generare un gran numero di precursori neuronali (che differenzieranno in neuroni), pur mantenendo la loro doppia identità di astrociti e di cellule staminali.

Le staminali neurali in coltura

Per maggiori dettagli su questo punto si rimanda al focus di Luciano Conti. Qui verrà posta l'attenzione sul fatto che il comportamento delle cellule staminali neurali in vivo e in vitro è molto diverso. Ad esempio, in vivo le staminali neurali danno origine prevalentemente a neuroni mentre in coltura esse generano soprattutto astrociti e soltanto una piccola percentuale di neuroni.

Tuttavia, la coltura è utile per 'vedere' le proprietà staminali di queste cellule. Se infatti, dopo il prelievo dal cervello, si mette il tessuto dell'SVZ in coltura con *fattori trofici* (ovvero molecole in grado di supportare la sopravvivenza delle cellule nervose; es. il fattore di crescita del nervo o NGF, scoperto da Rita Levi Montalcini; *trofismo* = nutrimento), le cellule staminali in esso contenute cominceranno a proliferare attivamente formando piccoli gomitoli cellulari detti *neurosfe*.

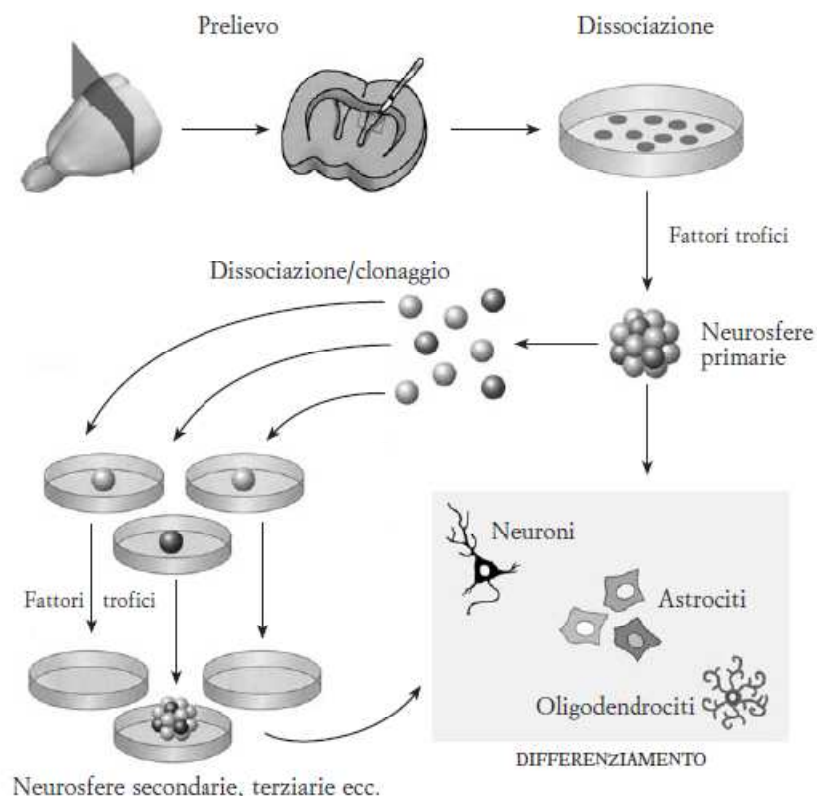


Figura nella pagina precedente: il saggio di formazione delle neurosfere. Dopo aver estratto il cervello, lo si seziona in modo da visualizzare i ventricoli laterali (in alto a sinistra) e quindi si effettua una microdissezione dell'area corrispondente all'svz (in alto al centro). Il tessuto viene dissociato e messo in coltura (in alto a destra), e quindi esposto a fattori trofici in modo da ottenere le *neurosfere primarie*. Dissociando le neurosfere primarie e coltivando le singole cellule si ottengono nuove neurosfere, generate dagli elementi con proprietà staminali (*automantenimento*). Il passaggio può essere ripetuto teoricamente all'infinito, anche se a ogni stadio è possibile far differenziare le cellule (togliendo i fattori trofici) e ottenere così i tre tipi cellulari del sistema nervoso (*multipotenza*).

Dissociando le cellule delle neurosfere e rimettendole sparse in un'altra coltura, si osserverà di nuovo una grande proliferazione e si otterranno ancora altre neurosfere, e così via. Questa espansione clonale delle cellule testimonia la loro capacità di *auto-rinnovamento*. Se poi si spostano le neurosfere in un'altra capsula senza i fattori trofici, si osserverà il *differenziamento* nei tre tipi principali di cellule del sistema nervoso: i neuroni, gli astrociti e gli oligodendrociti. Questa procedura sperimentale, detta 'saggio di formazione delle neurosfere' dimostra la *multipotenzialità*. L'insieme delle due proprietà di auto mantenimento e multipotenzialità conferma che il tessuto prelevato in partenza dal cervello conteneva cellule staminali.

Il fatto di poter ottenere una grande quantità di cellule staminali neurali ha alimentato la fantasia di molti ricercatori che stanno cercando di utilizzarle per trapianti intracerebrali a fini terapeutici. Tuttavia, in base a quanto detto in precedenza sulla complessità del SNC dei mammiferi e come verrà spiegato nel prossimo paragrafo, questo obiettivo rimane ancora lontano. Per il momento le staminali neurali rimangono un affascinante e molto promettente oggetto di studio per la ricerca in Neuroscienze.

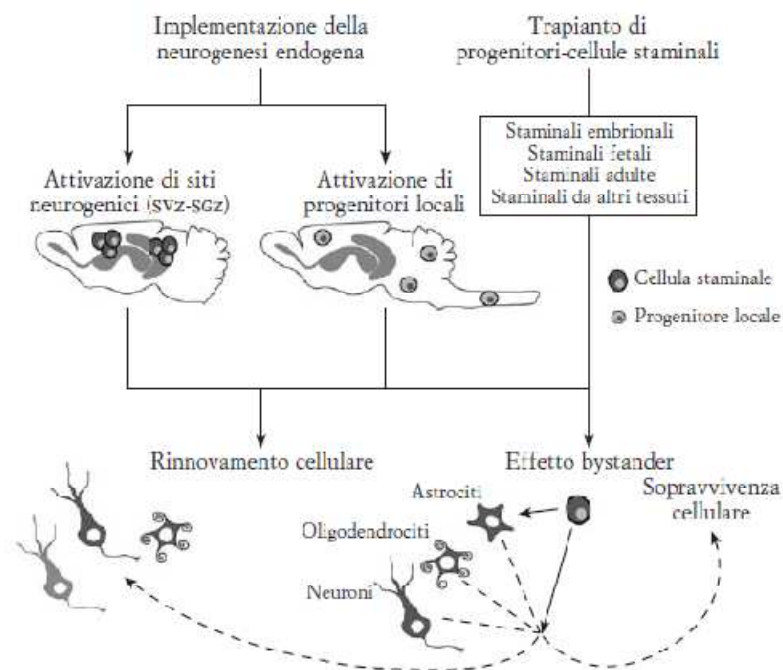
Le prospettive terapeutiche

Al momento non esistono terapie efficaci con cellule staminali in grado di curare e guarire malattie neurodegenerative (o da danno traumatico o vascolare, es: ictus). Meglio, non esistono terapie in grado di sostituire i neuroni persi (o le cellule gliali danneggiate, come gli oligodendrociti nella sclerosi multipla). Ciò è dovuto alle nostre ancora scarse conoscenze sul comportamento di cellule staminali e progenitori nel tessuto nervoso, unite alla nota incapacità di tale tessuto a mettere in atto meccanismi rigenerativi/riparativi che ripristinino le funzioni perdute.

Le staminali cerebrali, pertanto, ci insegnano come queste cellule debbano essere considerate nel loro *contesto tissutale*, che nel nostro caso è decisamente ostile.

Vediamo ora le prospettive terapeutiche oggetto di studio nella ricerca:

- 1) capire, con la ricerca di base, quali sono i meccanismi che impediscono la riparazione nel SNC dei mammiferi e quelli che regolano l'attività delle staminali/progenitori neurali nelle zone neurogeniche;
- 2) un altro aspetto di frontiera della ricerca di base sta lavorando su alcuni progenitori che sono stati identificati nel parenchima cerebrale, cioè nel tessuto al di fuori delle zone neurogeniche. Anche in questa sede esisterebbero progenitori neurali, ma dotati di minori potenzialità che vanno pertanto implementate;
- 3) il trapianto intracerebrale (diretto, mediante iniezioni locali) di cellule staminali neurali, di cellule staminali embrionali e fetali non ha dato risultati soddisfacenti. In alcuni casi le cellule non si adattano e muoiono, in altri sviluppano tumori. In ogni caso il trapianto è invasivo e molte patologie neurodegenerative sono diffuse ad ampie aree del SNC.



Prospettive di impiego terapeutico di cellule staminali neurali.

4) Alcuni studi più avanzati stanno cercando di utilizzare ai fini del trapianto non cellule staminali ma progenitori già in stato di parziale differenziamento. Altri laboratori stanno cercando di indirizzare staminali embrionali o cellule iPS verso un differenziamento neuronale, in modo da ottenere in vitro specifiche popolazioni di neuroni. Tuttavia, come detto al punto precedente, la via del trapianto intracerebrale sembra poco praticabile;

5) In alcune ricerche recenti si sta studiando il comportamento di cellule staminali neurali iniettate per via endovenosa. Esse possono entrare nel SNC colpito da patologie con infiammazione (es. sclerosi multipla) e formare 'nicchie atipiche perivascolari'. Qui esse possono esercitare un effetto benefico (detto effetto *bystander* o 'spettatore') che non consiste nella sostituzione delle cellule perse ma in un effetto trofico che migliora la riparazione e limita i danni al tessuto nervoso.

6) Vengono anche impiegate cellule staminali mesenchimali con lo stesso effetto 'bystander' del punto precedente.

Conclusioni

In Neuroscienze, il caso delle staminali neurali è considerato tra i più affascinanti degli ultimi anni ed è un esempio di come la ricerca possa capovolgere i dogmi preesistenti aprendo nuove, inaspettate prospettive. D'altro canto è anche un esempio emblematico di come le nostre conoscenze non sempre (o almeno, non subito) possano tradursi in applicazioni terapeutiche efficaci e risolutive. La ragione di tale difficoltà non sta certo nei caratteri delle staminali neurali (considerate tra le più facili da coltivare e le più rapide ad espandere) ma nel contesto in cui esse agiscono (il tessuto nervoso) e in cui noi vorremmo vederle agire come strumento terapeutico.

Lettere consigliate:

Le cellule invisibili: il mistero delle staminali cerebrali. Luca Bonfanti, Bollati Boringhieri, Saggi scienze, 2009