

IL TRAPIANTO DI CELLULE NERVOSE NEL CERVELLO FETALE DURANTE LO SVILUPPO

*L. Magrassi, S. Pezzotta, G. Butti, D. Adinolfi, R. Knerich, G. Sangiovanni,
G. Spanu, L. Infuso*

*SEZIONE DI CLINICA NEUROCHIRURGICA,
DIPARTIMENTO DI CHIRURGIA
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI, IRCCS POLICLINICO S. MATTEO, PAVIA*

Da circa un secolo (Spemann, 1906) i trapianti cellulari intracerebrali si sono rivelati insostituibili strumenti di lavoro in neurobiologia ed hanno permesso di rispondere a numerose domande altrimenti insolubili. Tra i principali obiettivi storicamente perseguiti vi sono lo studio dello sviluppo del Sistema Nervoso Centrale, ovvero i meccanismi coinvolti nei processi di differenzamento, migrazione, integrazione sinaptica dei neuroni così come l'analisi delle relazioni funzionali e strutturali fra le varie regioni del Sistema Nervoso Centrale (Le Douarin, 1993).

Negli ultimi vent'anni, la ricerca trapiantologica in neurobiologia ha assunto anche un interesse applicativo di tipo clinico (Peschanski et al. 1999), portando all'impiego sperimentale nell'uomo dei trapianti intracerebrali per il trattamento dapprima del morbo di Parkinson (Baklund et al. 1985) e poi di altre malattie del Sistema Nervoso Centrale tutt'ora prive di una terapia farmacologica definitiva quali per esempio la Corea di Huntington (Bachoud-Levi et al. 2000) o il dolore neuropatico cronico (Buchser et al. 1996).

In parallelo sono stati sviluppati metodi capaci di favorire la replicazione in vitro di cellule staminali neuroepiteliali derivate sia dal sistema nervoso durante lo sviluppo embrionale sia dopo la nascita (Reynold & Weiss 1992, Richards et al. 1992, Gritti et al. 1996). Per cellule staminali neuroepiteliali si intendono cellule capaci sia di rinnovare se stesse sia di generare precursori per tutte le cellule gliali e neuronali che normalmente popolano il sistema nervoso centrale (McKay 1997).

La possibilità di estendere queste osservazioni anche all'uomo, dove finora però è stata dimostrata solo l'espansione in vitro di cellule staminali derivate da feti (Villa et al. 2000), renderebbe disponibili fonti di cellule adatte al trapianto intracerebrale indipendenti dall'uso di materiale fetale fresco e potenzialmente, qualora si mettessero a punto metodi di espansione in vitro di cellule

staminali neuroepiteliali umane derivate dall'adulto, autologhe.

Infatti, almeno teoricamente, la fonte ideale di cellule per un trapianto all'interno del Sistema Nervoso Centrale dovrebbe essere omologa (meglio se addirittura autologa), le cellule dovrebbero provenire da un unico individuo e dovrebbero essere sufficientemente indifferenziate e plastiche da poter assumere un fenotipo tipico della regione in cui vengono impiantate o da poter assumere un particolare fenotipo se pretrattate in vivo o in vitro in condizioni differenziative opportune e riproducibili.

In vista delle possibili applicazioni cliniche è perciò diventato indispensabile caratterizzare le condizioni di sopravvivenza e di differenziazione delle cellule staminali e dei precursori neuroepiteliali durante i loro diversi stadi maturativi, e la loro risposta dopo trapianto in particolare ectopico e/o eterocronico.

Per studiare in condizioni ottimali le capacità differenziative dei precursori neuroepiteliali in vivo abbiamo sviluppato un metodo per il trapianto di cellule all'interno del sistema nervoso centrale di mammifero durante lo sviluppo intrauterino (Cattaneo 1994).

In pratica questa tecnica prevede nei roditori una piccola laparotomia con esposizione alternata dei corni dell'utero in cui si possono facilmente distinguere rispettivamente le sedi d'impianto degli embrioni, successivamente mediante transilluminazione della parete uterina con fibra ottica si localizzano le strutture cefaliche fetali. Localizzati in trasparenza alcuni reperi encefalici fondamentali quali il seno sagittale superiore, i collicoli ed il IV ventricolo si procede al trapianto intracerebrale delle cellule neuroepiteliali risospese in un piccolo volume (1-2 μ l) mediante una micropipetta in vetro con cui si trapassano tutte le strutture (parete uterina, membrane gestazionali, cute, cranio e tessuto nervoso fetale). Regioni facilmente trapiantabili con questa tecnica sono rappresentate dal cervelletto, dai collicoli, dalla corteccia cerebrale, dai gangli della base, e dal sistema ventricolare.

Con questa tecnica i precursori neuroepiteliali trapiantati sono in grado di integrarsi sia come cellule isolate sia come gruppi di cellule (cluster) all'interno del sistema nervoso dell'ospite (Cattaneo et al. 1994).

Studi successivi hanno dimostrato che almeno alcune delle cellule trapiantate, fra quelle disperse nel cervello dell'ospite possono divenire neuroni con caratteristiche simili a quelle dei neuroni che li circondano (Brustle et al. 1995, Campbell et al. 1995, Magrassi 1996 a, b). Con la medesima tecnica sono state saggiate le capacità differenziative di cellule fetali umane impiantate nei ventricoli di ratti al 17°-18° giorno di gestazione che, nonostante si trattasse di trapianto eterologo, hanno dato origine a neuroni in tutto simili a quelli dell'ospite (Brustle et al. 1998).

Questi risultati suggeriscono che le capacità differenziative dei precursori neuroepiteliali generati dopo trapianto di cellule staminali sono strettamente legate all'ambiente in cui si vengono a trovare e non alla sede da cui queste sono derivate (Gage 2000).

Eppure questa conclusione non è completamente vera, infatti accanto ad indubbi esempi di differenziazione in accordo con le cellule del tessuto ospite che circondano le cellule trapiantate, caso comune soprattutto per cellule integrate singolarmente, vi sono cellule che invece si aggregano fra loro a formare agglomerati (cluster) all'interno del cervello dell'ospite. Queste cellule si differenziano e danno origine a neuroni e glia con un fenotipo assolutamente indistinguibile da quello che avrebbero adottato se lasciate nel loro ambiente d'origine (Magrassi & Graziadei 1996, Magrassi et al. 1998).

La diversa sensibilità agli stimoli provenienti dalle cellule del tessuto ospite è ancor più evidente quando si trapiantano precursori neuroepiteliali indifferenziati nell'adulto. In questo caso si ha differenziazione neuronale coerente con la sede del trapianto piuttosto che con la sede d'origine delle cellule solo se queste sono trapiantate nelle regioni dell'adulto che mantengono alcune caratteristiche embrionali quali la regione subventricolare del telencefalo dove anche durante la vita adulta sono generati precursori neuronali che migrano verso il bulbo a formare interneuroni (Suhonen et al. 1996).

Non sono immediatamente evidenti le ragioni delle differenze nella risposta all'ambiente dopo il trapianto di precursori neuroepiteliali nel feto. Tutte le cellule sono esposte almeno inizialmente alle medesime condizioni del microambiente nel sistema nervoso centrale in sviluppo dell'ospite. Infatti la formazione di aggregati (cluster) comprendenti alcune delle cellule trapiantate inizia ad essere evidente solo 24 ore dopo il trapianto effettuato nel feto di ratto di 15 giorni di età gestazionale (Cattaneo et al. 1994).

La diversità di sensibilità all'ambiente circostante di precursori neuroepiteliali della medesima età gestazionale sembrerebbe essere frutto di un cosiddetto effetto di popolazione: le cellule trapiantate tenderebbero cioè a differenziarsi in accordo al feto delle cellule che le circondano così quelle che finiscono per riaggregarsi assieme dopo il trapianto continuerebbero a seguire il programma differenziativo previsto se fossero state lasciate nel loro sito d'origine mentre quelle che si disperdono fra le cellule dell'ospite finirebbero per essere sensibili agli stimoli delle cellule circostanti (Magrassi et al. 1998).

Se questo fosse vero, esaminando la regione di contatto fra le cellule dell'ospite e quelle trapiantate nel caso di formazione di aggregati multicellulari, qualche cellula dell'ospite di frontiera che finisse per trovarsi quasi completamente circondata da cellule trapiantate potrebbe anch'essa cambiare il proprio programma differenziativo ed acquisire quello proprio della sede

d'origine delle cellule trapiantate. Risultati preliminari del nostro gruppo in collaborazione con quello del Professor Rossi di Torino ottenuti dopo trapianto ectopico di precursori cerebellari riconoscibili perché provenienti da un topo trasgenico che esprime in tutte le cellule una proteina artificiale fluorescente in verde, hanno messo in evidenza proprio questo fenomeno.

Comprendere i meccanismi con cui i precursori neuroepiteliali si influenzano reciprocamente controllando la differenziazione finale delle cellule da questi derivate ci sembra indispensabile per migliorare anche i trapianti intracerebrali nell'adulto dove la maggioranza delle cellule trapiantate si aggrega a formare grosse masse solo parzialmente capaci di interagire con il tessuto cerebrale circostante.

BIBLIOGRAFIA

1. Spemann H. Verh. Deutschen Zool. Ges. 195-202, 1906
2. Le Douarin N. et al. Trends in Neurosci. 16, 64-72, 1993
3. Peschanski M. et al. Adv. Neurol. 80: 651-653, 1999
4. Baklund EO, et al. J. Neurosurg. 62: 169-173, 1985
5. Bachoud-Levi A, et al. Exp. Neurol. 161: 194-202, 2000
6. Buschser E, et al. Anesthesiology 85: 1005-1012, 1996
7. Reynolds BA, & Weiss S. Science 255: 1707-1710, 1992
8. Richards LJ, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 8591-8595, 1992
9. Gritti A, et al. J. Neurosci. 16: 1091-1100, 1996
10. McKay R. Science 276: 66-71, 1997
11. Villa A, et al. Exp. Neurol. 161: 67-84, 2000
12. Cattaneo E, et al. Dev. Brain Res. 83: 197-208, 1994
13. Brustle O, et al. Neuron 15: 1275-1298, 1995
14. Campbell K, et al. Neuron 15: 1259-1274, 1995
15. Magrassi L., et al. Neurosci. Res. Comm. 18: 175-183, 1996
16. Magrassi L. & Graziadei PPC. Dev. Br. Res., 96: 11-27, 1996
17. Brustle O, et al. Nat. Biotech. 16: 1040-1044, 1998
18. Gage FH Science 287 : 1433-1438, 2000
19. Magrassi L., et al. Development 125: 2847-2855, 1998
20. Shuonen JO, et al. Nature 383, 624-627, 1996