

Impiego delle cellule staminali nelle malattie neurologiche

Lorenzo Magrassi, Mirko Minelli, Ilaria Chiaranda, Gianluca Grimod, Giovanni Spanu, Daniela Adinolfi, Stefano Pezzotta, Cesare Arienta
Sezione di Neurochirurgia, Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Rianimatorie-Riabilitative, e dei Trapianti d'Organo, Università di Pavia, I.R.C.C.S. Fondazione Policlinico San Matteo, Pavia

Le malattie neurodegenerative sono tutte caratterizzate da morte neuronale che colpisce dapprima popolazioni limitate e ben identificabili di neuroni (ad esempio i neuroni dopaminergici nel m. di Parkinson o gli interneuroni gabaergici forniti di spine dello striato nella corea di Huntington) e quindi da una degenerazione estesa a popolazioni neuronali non inizialmente interessate. L'idea di rimpiazzare i neuroni irrimediabilmente danneggiati con cellule sane non è nuova, ma solo a partire dagli anni settanta del '900 si è iniziato ad applicarla concretamente con il trapianto intracerebrale di neuroni fetali dapprima in modelli animali e successivamente nell'uomo. Fra i problemi che hanno per ora limitato l'adozione generalizzata di questa strategia terapeutica vi è quello di identificare una popolazione di cellule che una volta trapiantate possano differenziarsi nel fenotipo neuronale che si vuole rimpiazzare e sopravvivere indefinitamente nel microambiente cerebrale del paziente.

Al fine di evitare l'attacco da parte del sistema immunitario delle cellule trapiantate, il donatore ideale sarebbe il paziente stesso; così negli ultimi 10 anni si è proposto di utilizzare cellule staminali emopoietiche indifferenziate raccolte dal midollo osseo del paziente stesso come fonte di neuroni da rimpiazzare. È interessante notare però come i risultati ritenuti inizialmente suggestivi per una transdifferenziazione di cellule staminali emopoietiche in neuroni siano stati successivamente spiegati utilizzando meccanismi che non implicano affatto la trasformazione di precursori mesenchimali in cellule neuroepiteliali ma piuttosto la fusione cellulare.

Infatti, se si sottopone un animale a panirradiazione seguita da un trapianto di cellule staminali emopoietiche omologhe a quelle dell'ospite ma distinguibili da queste per la presenza di un marcatore geneticamente trasmesso quale il gene codificante per la proteina fluorescente in verde dell'alga *Aequorea victoria* opportunamente

modificato per essere espresso efficientemente nelle cellule di mammifero, a distanza di alcuni mesi dal trapianto di midollo decine di neuroni di Purkinje nel cervelletto dell'ospite, acquistano il marcatore tipico delle cellule trapiantate. Questo accade per fusione cellulare fra i neuroni di Purkinje e cellule della microglia che derivano da monociti circolanti generati dalle staminali emopoietiche trapiantate.

La presenza di solo poche decine di neuroni di Purkinje fusi per animale trapiantato ci ha stimolato a studiare se nelle condizioni in cui i neuroni di Purkinje dell'ospite fossero danneggiati tramite l'iniezione ventricolare di una neurotossina, così da mimare quello che accade in una malattia neurodegenerativa la fusione fra cellule microgliali e cellule di Purkinje, aumentasse significativamente il numero delle cellule fuse. Per questo abbiamo iniettato nel ventricolo laterale di topi sottoposti un mese prima a trapianto di cellule emopoietiche, una soluzione di Propidio Ioduro in concentrazioni capaci d'indurre la morte selettiva del 25-35% delle cellule di Purkinje del cervelletto. I risultati di questo esperimento hanno rivelato un incremento di più di un ordine di grandezza del numero delle cellule di Purkinje fuse negli animali con lesione cerebellare selettiva rispetto a quelli di controllo. Abbiamo poi studiato se, una volta fuse, le cellule di Purkinje fossero stabili nel tempo o andassero incontro rapidamente a morte cellulare. Per questo abbiamo dapprima generato topi chimerici in cui oltre il 90% delle cellule circolanti nel sangue derivavano da topi donatori geneticamente modificati in modo che tutte le cellule dell'organismo fossero fluorescenti. Dopo aver lasciato sopravvivere i topi trapiantati per 2 mesi li abbiamo nuovamente sottoposti a panirradiazione e a trapianto di midollo, questa volta però con cellule non fluorescenti in modo che tutte le fusioni fra neuroni di Purkinje e cellule del sangue avvenute dopo il secondo trapianto risultassero in neuroni non fluorescenti. Così facendo solo i neuroni di Purkinje che si fossero fusi nel periodo intercorso fra il primo e il secondo trapianto sarebbero risultati fluorescenti. Sacrificando gli animali che avevano ricevuto il secondo trapianto dopo periodi di sopravvivenza molto prolungati corrispondenti a circa due terzi dell'intera vita dell'animale, abbiamo ancora trovato neuroni di Purkinje fluorescenti nel cervelletto dei topi trapiantati due volte. La presenza di neuroni fluorescenti molti mesi

dopo il secondo trapianto, ci permette di concludere che le cellule di Purkinje fuse fra il primo e il secondo trapianto sono poi sopravvissute alla fusione per un tempo paragonabile a quello degli altri neuroni dell'ospite che non ebbero a fondersi con le cellule microgliali.

Questi come altri studi in corso per svelare i meccanismi che portano alla fusione fra cellule di derivazione ematica ed i neuroni oltre a chiarire i meccanismi di un inatteso fenomeno biologico qual è la fusione spontanea fra cellule nel sistema nervoso centrale, potrebbero permetterci di sfruttare la fusione a fini terapeutici usando per esempio le cellule del sangue per introdurre in neuroni malati nuclei "sani" capaci di correggere difetti genetici o acquisiti dei neuroni a cui si fonderebbero.

Bibliografia

Magrassi L., Grimaldi P., Ibatici A., Corselli M., Ciardelli L., Castello S., Podesta M., Frassoni F., Rossi F. Induction and survival of binucleated Purkinje neurons by selective damage and aging. *J. Neurosci.* 27: 9885-9892, 2007.