

Cellule Staminali Neurali Adulte (ANSCs) e neurogenesi endogena

“Once the development was ended, the founts of growth and regeneration of the axons and dendrites dried up irrevocably. In the adult centers, the nerve paths are something fixed, ended, and immutable. Everything may die, nothing may be regenerated. It is for the science of the future to change, if possible, this harsh decree”

(Ramon y Cajal, 1913)

La “scienza del futuro” ha, effettivamente, distrutto tale “dogma” dimostrando che la complessa e intricata rete di neuroni che si forma durante lo sviluppo embrionale, attraverso processi finemente orchestrati, non è, in realtà, perenne e immutabile. Infatti, in alcune regioni discrete del cervello di mammifero adulto sono presenti cellule staminali neurali (ANSCs) deputate alla formazione di nuovi neuroni. Il termine “cellula staminale neurale” fa riferimento a cellule del sistema nervoso centrale (SNC), dotate non solo di capacità proliferativa, ma anche di capacità autorigenativa e di multipotenzialità, intesa come capacità di generare i tre fenotipi cellulari neurali (astrociti, neuroni, oligodendrociti).

La prima evidenza di neurogenesi risale a studi effettuati negli anni '60 da Altman e Das. Infatti, tali ricercatori, utilizzando la tecnica innovativa dell'autoradiografia con ³H-timidina, scoprirono la presenza di neuroni di nuova formazione nel giro dentato dell'ippocampo (Altman and Das, 1965), nella neocorteccia (Altman, 1966) e nel bulbo olfattorio (Altman, 1969) di ratti adulti. Negli anni '90 l'introduzione di nuovi metodi di marcatura delle cellule in divisione, come i retrovirus e la bromdeossiridina (BrdU), ha

permesso di confermare la presenza di neurogenesi nel cervello di mammifero adulto, compresi pazienti umani (Eriksson et al., 1998).

Le due principali aree neurogeniche del cervello di mammifero adulto sono: la zona sottoventricolare (SVZ) dei ventricoli laterali, che genera i neuroni dei bulbi olfattori, e la zona sottogranulare (SGZ) dell'ippocampo deputata alla produzione dei neuroni dello strato granulare del giro dentato (DG) (Taupin and Gage, 2002).

La zona sottoventricolare

La zona ventricolare (VZ) e la SVZ sono le principali regioni germinali deputate alla genesi dei neuroni e delle cellule gliali del cervello di mammifero adulto. Le cellule della VZ derivano dalla piastra neurale, circondano il compartimento ventricolare formando un epitelio pseudostratificato e si differenziano, nel periodo prenatale, in glia radiale, neuroni ed astrociti. Con il procedere dello sviluppo, la glia radiale, dotata di corpo cellulare situato nella VZ e di un lungo prolungamento esteso fino alla superficie piaie, favorisce la migrazione verso la pia madre di nuovi neuroni derivati dal differenziamento di cellule della regione ventricolare con conseguente diminuzione di tale popolazione (Misson et al., 1991; Rakic et al., 1971). Contemporaneamente si osserva un aumento esponenziale delle cellule della SVZ che raggiunge il suo massimo sviluppo durante la prima settimana dopo la nascita nei roditori e approssimativamente la trentacinquesima settimana di gestazione nell'uomo (Globus and Kuhlenbeck, 1944; Kershman, 1938).

La SVZ si estende lungo la parete laterale del ventricolo laterale, verso lo striato, mentre non comprende la parete mediale e il tetto del ventricolo laterale.

La composizione e l'organizzazione tridimensionale della SVZ murina, è stata studiata, ultrastrutturalmente ed immunohistochimicamente, da Doetsch e collaboratori (1997) che hanno identificato la presenza di quattro tipi cellulari: gli astrociti o cellule di tipo B1 e B2, i neuroblasti o cellule di tipo A, le cellule di tipo C e le cellule endoteliali di tipo E (Figura 1).

Le cellule di tipo B esprimono la Proteina Fibrillare Acida Gliale (GFAP), marker astrocitario, ma sono caratterizzate da una morfologia unipolare o bipolare con un numero inferiore di processi cellulari rispetto agli astrociti; inoltre, tali cellule mostrano alcune caratteristiche immunocitochimiche simili a quelle della glia radiale come l'espressione di vimentina, filamento intermedio espresso da precursori cellulari, e della nestina, marker di cellule staminali embrionali neuroepiteliali (Garcia et al., 2004).

Gli astrociti B sono scarsamente proliferanti e comprendono due sottotipi: cellule di tipo B1 e di tipo B2. Gli astrociti B1 sono adiacenti allo strato endoteliale che viene coperto da una lamina formata dai loro processi. Le cellule di tipo B2 sono, invece, localizzate all'interfaccia con il parenchima striatale. Talora gli astrociti B estendono un processo citoplasmatico tra le cellule endoteliali a contatto con il ventricolo laterale ed esibiscono un unico piccolo ciglio caratteristico delle cellule staminali neuroepiteliali embrionali (Doetsch et al., 1996).

Le cellule di tipo A sono precursori neuronali migranti e proliferanti che esprimono β -tubulina III, PSA-NCAM (poly-sialylated-neural cell-adhesion molecule) e DCX (doublecortin), markers di neuroni immaturi. Tali cellule costituiscono catene orientate parallelamente alla parete laterale del ventricolo laterale e disposte all'interno di strutture tubulari formate dagli astrociti B1 e B2 che separano le catene di cellule A rispettivamente dallo strato endoteliale e dallo

striato (Doetsch et al., 1997). Le catene, a loro volta, convergono nella via rostrale migratoria (RMS) attraverso la quale i neuroblasti A raggiungono i bulbi olfattori dove si differenziano in interneuroni granulari e periglomerulari (Luskin 1993; Lois and Alvarez-Buylla, 1994; Doetsch and Alvarez-Buylla, 1996) (Figura 2).

Le cellule di tipo C sono precursori immaturi mitoticamente attivi che esprimono *Dlx2*, proteina che può funzionare come repressore trascrizionale e modulare la produzione di cellule della SVZ. Le cellule di tipo C si trovano generalmente in piccoli gruppi (clusters) e occasionalmente come cellule singole che contattano le catene di cellule A.

Infine, la SVZ è separata dalla cavità ventricolare da un monostrato di cellule endodimali di tipo E positive al marker *nestina*.

Negli anni '90 molti studi hanno cercato di chiarire a quale tipo cellulare della SVZ appartenesse la ANSC deputata, in vivo, alla genesi dei neuroni dei bulbi olfattori. Infatti, la mancanza di markers specifici per le ANSCs ne ha reso difficile l'identificazione.

Johansson e collaboratori (1999) hanno identificato le ANSCs come le cellule endodimali di tipo E o una loro sottopopolazione, constatando l'espressione da parte di tali cellule del marker *nestina* e osservando la loro capacità di generare in vitro aggregati clonali, detti neurosfere, capaci di autorigenerarsi e dotati di multipotenzialità. Molti altri lavori hanno dimostrato la derivazione delle ANSCs dallo strato subependimale (Chiasson et al., 1999; Laywell et al., 2000; Morshead and Van der Kooy, 2001; Capela and Temple, 2002).

Secondo l'ipotesi attualmente più accreditata i precursori primari dei neuroni dei bulbi olfattori sono gli astrociti B (GFAP+) che si dividono lentamente per dare origine alle cellule C mitoticamente attive (GFAP-*Dlx2*+) che, a loro volta, generano i neuroblasti A (GFAP-*Dlx2*+*PSANCAM*+*DCX*) (Doetsch et al., 1999; Garcia et al., 2004). La

transizione dagli astrociti B ai progenitori C altamente proliferanti coincide con una elevata espressione del recettore per EGF che si pensa sia implicato nella trasformazione di cellule relativamente quiescenti in cellule transientemente proliferanti capaci di espandere la popolazione di progenitori cellulari (Doechst et al., 1999a,b). Questi studi dimostrano che le ANSCs nel SNC potrebbero avere caratteristiche citologiche e funzionali di cellule altamente specializzate in contrasto con l'idea comune che le cellule staminali siano elementi indifferenziati mancanti di markers antigenici tipici di cellule mature (Alvarez-Buylla et al., 2001).

Il fatto che le ANSCs in vivo possano avere caratteristiche di cellule gliali suggerisce la possibilità che sia richiesto un processo di dedifferenziamento prima che venga selezionato un particolare fenotipo. Se, infatti, le ANSCs hanno caratteristiche gliali, la formazione dei precursori neuronali, che migrano al bulbo olfattorio, richiederebbe la soppressione dei markers gliali e l'espressione dei markers neuronali (Morshead and Van der Kooy, 2001).

Per anni l'origine di questi astrociti con proprietà neurogeniche è stata elusiva e controversa. Merkle e collaboratori (2004), marcando geneticamente, in modo permanente e specifico, una ristretta popolazione di cellule della glia radiale che persiste nelle pareti laterali dei ventricoli laterali di topi neonati, hanno dimostrato la capacità di tali cellule di dare origine a neuroni, astrociti ed oligodendrociti, ma, soprattutto agli astrociti della SVZ deputati al mantenimento della neurogenesi nel cervello di mammifero adulto. Inoltre, è stata osservata la presenza di neuroblasti marcati nella RMS e nel bulbo olfattorio.

Cellule multipotenti, capaci di generare in vitro neurosfere e di differenziarsi nei tre fenotipi neurali, sono state anche isolate dalla SVZ e dalla SGZ di cervelli umani adulti (Kukulekov et al., 1999).

Nell'uomo, la SVZ è composta da quattro strati distinti con diversa composizione cellulare. Lo strato I è costituito da un monostrato di cellule endoteliali dotate di microvilli apicali ed espansioni basali parallele o perpendicolari alla superficie ventricolare (Quinones-Hinojosa et al., 2006). Adiacente allo strato I, Sanai e collaboratori (2004) hanno osservato un "gap" (strato ipocellulare o strato II) in cui le espansioni endoteliali dello strato I interagiscono strettamente con processi GFAP+. Nello strato II non sono presenti corpi cellulari, fatta eccezione per qualche astrocita e qualche raro corpo cellulare neuronale (Quinones-Hinojosa et al., 2006).

Accanto allo strato II, è presente un nastro di cellule con caratteristiche immunocitochimiche (positività alla GFAP) ed ultrastrutturali simili a quelle degli astrociti (strato III). Sanai e collaboratori (2004), osservando la capacità da parte di una sottopopolazione di questi astrociti di generare, in vitro, neurosfere e di differenziarsi nei tre fenotipi neurali, hanno suggerito la possibilità che rappresentino le ANSCs. Nel nastro di cellule dello strato III sono stati osservati anche oligodendrociti e gruppi di cellule endoteliali. Lo strato IV è caratterizzato dalla presenza di mielina e segna la transizione tra il nastro di astrociti e il parenchima cerebrale circostante (Quinones-Hinojosa et al., 2006).

La presenza di progenitori neuronali proliferanti e di una RMS nel cervello umano rimane tuttora oggetto di dibattito (Curtis et al., 2007; Sanai et al., 2007).

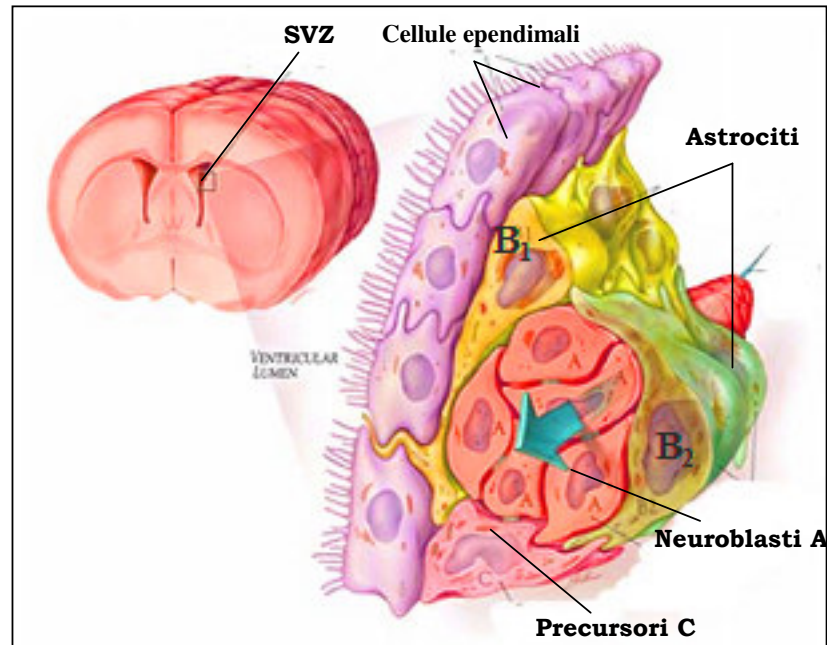


Figura 1. Citoarchitettura della SVZ murina. Catene di neuroblasti A migrano al bulbo olfattorio all'interno di canali formati da astrociti B, cellule ependimali E e progenitori cellulari proliferanti C (Immagine modificata da Quinones-Hinojosa et al., 2007).

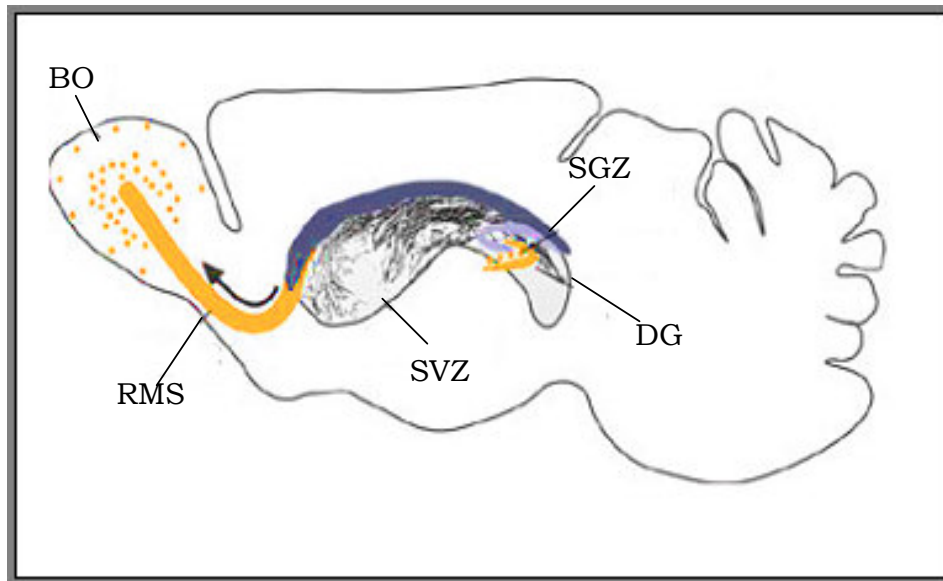


Figura 2. Sezione sagittale di cervello murino. Rappresentazione schematica del sistema SVZ-OB: nuovi neuroni vengono costantemente prodotti nella SVZ e formano catene di neuroblasti che attraverso la Via Rostrale Migratoria (RMS) giungono ai bulbi olfattori dove differenziano in neuroni granulari e periglomerulari. SGZ, zona subgranulare; DG, giro dentato; LV, ventricolo laterale; SVZ, zona subventricolare; RMS, Via Rostrale Migratoria; BO, bulbo olfattorio.

La nicchia neurale

Le ANSCs sono localizzate in specifici microambienti, detti “nicchie”, che più che entità anatomiche sono da considerarsi come entità biochimiche in cui un complesso insieme di segnali, come fattori solubili, molecole legate alle membrane cellulari e alle matrici extracellulari e diversi tipi cellulari, gioca un ruolo fondamentale nel regolare la proliferazione, il differenziamento e la migrazione delle ANSCs.

L'esistenza di questi fattori ambientali è stata dimostrata con esperimenti di trapianto. Se una popolazione di cellule staminali neurali/progenitori cellulari (ANPCs), ottenuta dall'ippocampo di ratti adulti viene trapiantata nell'ippocampo, si ottengono neuroni granulari. Quando la stessa popolazione viene trapiantata nella via rostrale migratoria, si formano, nel bulbo olfattorio, interneuroni sito-specifici tirosina-idrolasi positivi (Suhonen et al., 1996). Cellule ottenute da regioni neurogeniche, come la SVZ, trapiantate in regioni non neurogeniche del cervello generano quasi esclusivamente astrociti (Herrera et al., 1999); similmente, trapiantando cellule isolate da regioni non neurogeniche, come il midollo spinale di ratti adulti, in regioni non neurogeniche (midollo spinale) si è osservata la formazione di cellule gliali. Il trapianto delle stesse cellule nell'ippocampo (area neurogenica) origina neuroni nello strato granulare (Shihabuddin et al., 2000).

I fattori che, nella nicchia neurale, regolano la proliferazione delle ANSCs non sono ancora ben caratterizzati. I mitogeni “Epidermal Growth Factor” (EGF) e “Fibroblast Growth Factor-2” (FGF-2), utilizzati per propagare le ANSCs in vitro, sembrano svolgere una funzione molto importante nel regolare la proliferazione delle ANSCs anche in vivo (Lie et al., 2004). Infatti, almeno una sottopopolazione di cellule della SVZ, le cellule C transientemente proliferanti, esprime

il recettore per EGF (Doetsch et al., 2002). L'infusione di EGF o FGF2 nella SVZ aumenta la proliferazione cellulare (Kuhn et al., 1997), mentre inibendo l'espressione di "Transforming Growth Factor α " (TGF α), ligando del recettore di EGF (EGFR), si è osservata una riduzione della proliferazione cellulare (Tropepe et al., 1997). Anche la proteina Sonic Hedgehog (Shh), un importante morfogeno durante lo sviluppo, non solo promuove la proliferazione delle ANSCs sia in vitro che in vivo (Machold et al., 2003), ma è anche un fattore necessario per il mantenimento della nicchia neurale adulta (Balordi et al., 2007).

La stretta vicinanza, nelle aree neurogeniche del SNC, di clusters di cellule proliferanti ai vasi sanguigni, ha suggerito un'importante relazione tra angiogenesi e neurogenesi. Si parla, infatti, oltre che di nicchia neurale, di nicchia vascolare, in cui l'angiogenesi e la neurogenesi possono essere co-regolate e si possono influenzare reciprocamente. Si è, infatti, osservato che il "Vascular Endothelial Growth Factor" (VEGF), capace di promuovere la proliferazione cellulare endoteliale, promuove anche la neurogenesi stimolando la proliferazione di precursori neuronali sia in vitro che in vivo in seguito a somministrazione nella SVZ e nella SGZ (Jin et al., 2002). Shen e collaboratori (2004), utilizzando un sistema di co-cultura, hanno dimostrato il rilascio da parte delle cellule endoteliali di fattori solubili in grado di stimolare la capacità autorigenerativa delle ANSCs, di promuovere il mantenimento del loro potenziale neurogenico e di inibire la loro differenziazione.

Nella SVZ è stata osservata la presenza di una lamina basale extravascolare costituita da unità disposte regolarmente lungo la parete ventricolare. Ogni unità è costituita da rami che con una estremità contattano i vasi sanguigni e con l'altra formano bulbi nella zona sottostante le cellule endodimali. La lamina basale nella sua

estensione contatta direttamente numerose cellule della SVZ. Inoltre, la base dei rami, a contatto con i vasi sanguigni, ricopre macrofagi e fibroblasti perivascolari che derivano da una rete cellulare che si estende lungo l'asse dei vasi sanguigni. La lamina basale è costituita da glicosaminoglicani eparan solfati che rappresentano siti di legame e di concentrazione di fattori di crescita come EGF, FGF-2 e citochine. La lamina basale potrebbe, quindi, costituire un pathway anatomico per dirigere e scambiare fattori di crescita e citochine tra cellule extraparenchimali, come i macrofagi perivascolari, e le ANSCs. Infatti, dopo essersi legati alla lamina, i fattori potrebbero legarsi ai recettori espressi dalle cellule bersaglio ed influenzarne la proliferazione, la differenziazione e la migrazione (Mercier et al., 2002).

Recenti studi attribuiscono ai glicoconiugati come proteoglicani eparansolfati, proteoglicani, condroitin solfati (Yu e Yanagisawa, 2007) e tenascina C (Garcion et al., 2004), un ruolo fondamentale nel regolare la proliferazione e il differenziamento delle cellule della nicchia neurale.

Un fattore importante della nicchia è il carboidrato LewisX (LeX). LeX sembra essere associato ad una sottopopolazione di astrociti della SVZ. In vitro, le cellule della SVZ che esprimono LeX mostrano proprietà autorigenerative e multipotenzialità (Capela et al., 2002). La funzione di tale carboidrato non è ancora del tutto nota. Tuttavia, i carboidrati presenti nei proteoglicani ed altri glicoconiugati sono generalmente implicati nella presentazione di fattori di crescita sulla superficie delle ANSCs e della loro progenie (Alvarez-Buylla et al., 2004).

Anche il ligando Jagged1, che attiva il recettore Notch1, espresso dalle ANSCs putative, svolge un ruolo centrale nella stimolazione della capacità autorigenerativa delle ANSCs e nel mantenimento della

popolazione staminale della SVZ (Chambers et al., 2001; Nyfeler et al., 2005).

Liu e collaboratori (2005) hanno dimostrato che i neuroblasti, generati dalle cellule GFAP-positive, possono innescare un meccanismo a feedback deputato al controllo della proliferazione dei progenitori astrocitari. Nei neuroblasti, infatti, depolarizzazioni spontanee sono sufficienti per determinare il rilascio di acido γ -aminobutirrico (GABA) che, attivando i recettori GABA_A delle cellule GFAP-positive, limita la loro progressione attraverso il ciclo cellulare. Tale meccanismo a feedback contribuirebbe, quindi, a mantenere un equilibrio tra amplificazione e mobilitazione dei progenitori.

Torroglosa e collaboratori (2007) hanno dimostrato che l'ossido nitrico (NO), un inibitore fisiologico della neurogenesi, esercita un effetto antiproliferativo in vitro su precursori neurali isolati da SVZ, ma non riduce la sopravvivenza cellulare. Infatti, in vitro, donatori di NO riducono sia il numero sia la dimensione delle neurosfere mediante un'azione citostatica, e non pro-apoptotica, prevenendo la transfosforilazione, mediata da EGF, del recettore EGFR e la successiva fosforilazione di chinasi Akt. Somministrando in vivo L-NAME, inibitore dell'ossido nitrico sintasi, si è osservato un aumento della proliferazione cellulare e della fosforilazione di Akt.

Nella nicchia neurale gli astrociti, oltre ad essere i progenitori primari, sono posizionati in modo tale da svolgere la funzione di regolatori e sensori; infatti, con i loro processi citoplasmatici contattano tutti i tipi cellulari della nicchia e la lamina basale dei vasi sanguigni. Gli astrociti, quindi, si trovano in una posizione favorevole per ricevere informazioni riguardanti eventuali alterazioni del numero dei precursori neuronali e per tradurre segnali provenienti dai vasi sanguigni. Essendo connessi fra di loro tramite "gap junctions", gli astrociti sono in grado di propagare rapidamente i segnali nella

nicchia neurale (Doetsch, 2003). Inoltre, tali cellule secernono fattori che supportano la neurogenesi in vitro. Infatti, astrociti adulti, isolati dalla SVZ e dall'ippocampo, partecipano alla regolazione della neurogenesi sia promovendo la proliferazione sia inducendo il differenziamento verso un fenotipo neuronale delle ANSCs (Lim & Alvarez-Buylla, 1999; Song et al., 2002). Song e collaboratori (2002) hanno dimostrato che l'effetto neurogenico è dipendente dall'area di provenienza degli astrociti. Infatti, astrociti prelevati da regioni non neurogeniche, come il midollo spinale, non mostrano lo stesso effetto neurogenico di astrociti prelevati da un'area neurogenica come l'ippocampo. Questi studi dimostrano che le caratteristiche della popolazione astrocitaria locale giocano un ruolo fondamentale nella creazione di un microambiente neurogenico.

Gli astrociti della SVZ producono le “Bone Morphogenetic Proteins” (BMPs) che dirigono il differenziamento gliale ed inibiscono la neurogenesi sia in vitro che in vivo. Le cellule ependimali della SVZ secernono il polipeptide Noggin che funziona come antagonista delle BMPs determinando una modulazione fine dell'ambiente neurogenico (Gross et al., 1996; Lim et al., 2000). Sebbene Noggin blocchi i segnali gliogenici, sembra che non sia sufficiente ad indurre la differenziazione neuronale delle ANSCs (Lim et al., 2000) e che le proteine Wnt, molecole chiave nella regolazione delle NSCs embrionali, svolgano un ruolo fondamentale nell'induzione del fenotipo neuronale (Lie et al., 2005). Le ANSCs stesse sono in grado di secernere sFRP3, antagonista delle proteine Wnt, bloccando il differenziamento neuronale. L'equilibrio tra segnali autocrini e paracrini, come BMPs/Noggin e Wnts/sFRP3, assicura che le ANSCs e i neuroni vengano prodotti in modo coordinato nello spazio e nel tempo.

Anche cellule non-neurali come le cellule microgliali giocano un ruolo fondamentale nella stimolazione della neurogenesi nella nicchia sottoventricolare. Cellule isolate dalla SVZ perdono nel tempo la capacità di generare in coltura neuroblasti. Walton e collaboratori (2006) hanno dimostrato che tale riduzione della capacità neurogenetica è dovuta alla progressiva scomparsa nella coltura cellulare di cellule microgliali. Infatti, la capacità di ANSCs ad elevati passaggi di generare neuroblasti può essere ripristinata coltivando tali cellule con cellule microgliali o in presenza di terreno condizionato da cellule microgliali. Le cellule microgliali forniscono, quindi, fattori solubili necessari per la neurogenesi.

L'interazione dei precursori neuronali migranti con l'ambiente circostante è essenziale per una migrazione corretta. Nella nicchia sottoventricolare sono state descritte alcune molecole come la glicoproteina PSA-NCAM, essenziali per la migrazione verso il bulbo olfattorio di neuroni di nuova formazione. Infatti, la delezione di PSA-NCAM induce alterazioni migratorie dei neuroblasti (Ono et al., 1994). La conoscenza di tali fattori potrà essere importante nello sviluppo di approcci terapeutici atti ad indurre la migrazione dei precursori neuronali verso regioni danneggiate del SNC.

Gli astrociti B della SVZ sono in contatto con il fluido cerebrospinale (CSF) attraverso processi citoplasmatici estesi attraverso lo strato ependimale. Il ruolo del CSF nella regolazione del comportamento delle ANSCs non è noto. Tuttavia, Sawamoto e collaboratori (2006) hanno dimostrato che il flusso del CSF, generato dalle cellule ependimali ciliate, è caratterizzato da gradienti di concentrazione di molecole che influenzano la direzione di migrazione dei neuroblasti.

Anche i recettori tirosin chinasi Eph-B1-3 e Eph A4 ed i loro ligandi transmembrana, le efrine B2/3 hanno un ruolo regolatorio nella migrazione dei precursori neurali. Tramite immunomicroscopia

elettronica è stato possibile osservare la presenza di efrine B sugli astrociti (ANSCs) della SVZ. Una infusione di tre giorni nel ventricolo laterale sia di Eph B2 sia di Efrina B2 interrompe la migrazione dei neuroblasti e stimola la proliferazione cellulare (Conover et al., 2000).

Comportamento “in vitro” di ANSCs/ANPCs (cellule staminali/precursori neurali adulti)

In mancanza di markers specifici che identifichino in modo inequivocabile le ANSCs, le caratteristiche che, comunemente vengono considerate, in vitro, per l'identificazione sono la capacità autorigenativa e la multipotenzialità.

Le cellule della SVZ, infatti, possono essere isolate ed espanse in vitro in condizioni appropriate ed in presenza di fattori di crescita come EGF e FGF-2 (Raynolds e Weiss, 1992; Gritti et al., 1996). L'espansione in vitro delle ANSCs può essere ottenuta sia seguendo un protocollo che comporta la formazione di neurosfere, sia seguendo un protocollo che comporta la proliferazione delle cellule in monostrato.

Il protocollo di coltura “a neurosfera” permette di selezionare positivamente le ANSCs dalla coltura primaria eterogenea in quanto i progenitori e le cellule mature muoiono rapidamente, mentre le ANSCs sopravvivono e proliferano. Le ANSCs proliferando danno origine a cellule che rimangono attaccate le une alle altre e generano “clusters” sferici (le neurosfere) che flottano in sospensione. Le ANSCs proliferanti possono dividersi sia in modo simmetrico, con formazione di due ANSCs, sia in modo asimmetrico, con formazione di una ANSC ed un precursore cellulare oppure di una cellula apoptotica.

Ogni neurosfera è, quindi, costituita da un insieme di ANSCs, progenitori cellulari e cellule terminalmente differenziate. Per questo

si preferisce indicare questa popolazione cellulare mista con il termine ANSCs/ANPCs. Le sfere possono essere successivamente dissociate enzimaticamente e/o meccanicamente a singole cellule che possono essere ripiastrate nelle medesime condizioni di crescita. Come nelle colture primarie le cellule differenziate ed i progenitori cellulari muoiono rapidamente, mentre le ANSCs continuano a proliferare generando neurosfere secondarie (Galli et al., 2003).

L'identità in vivo delle cellule che in vitro sono capaci di generare neurosfere non è ancora del tutto chiara. Doetsch e collaboratori (2002) hanno dimostrato che la maggior parte delle cellule che proliferano in vitro, in risposta al fattore di crescita EGF, non derivano dalle cellule B relativamente quiescenti in vivo, ma dai precursori C Dlx2⁺ altamente proliferanti. Quando tali cellule vengono esposte ad EGF riducono l'espressione di Dlx2 ed arrestano la produzione neuronale. Distruggendo in vivo le cellule Dlx2⁺ si osserva una riduzione sia della risposta all'EGF sia della formazione, in vitro, di neurosfere.

La rimozione dei fattori di crescita e l'aggiunta di un substrato di adesione induce il differenziamento della popolazione di ANSCs/ANPCs nei tre fenotipi neurali: astrociti, oligodendrociti e neuroni (Gage et al., 2000; Quian et al., 2000; Van der Kooy e Weiss, 2000). Il differenziamento delle ANSCs/ANPCs può essere influenzato da molti fattori extracellulari come i mitogeni "Platelet-derived Growth Factor" (PDGF), "Ciliary Neurotrophic Factor" (CNTF), ormone tiroideo T3, "Brain Derived Neurotrophic Factor" (BDNF) e da fattori di adesione come poli-D-ornitina, laminina e fibronectina. Diverse combinazioni di substrati e mitogeni inducono cambiamenti nel tasso di crescita e nella capacità differenziativa delle ANSCs (Whittemore et al., 1999).

La mancanza di un marker specifico per le ANSCs che permetta di isolare una popolazione pura, limita fortemente lo studio della biologia di queste cellule e le applicazioni terapeutiche. Per tale motivo in lavori recenti si è cercato di arricchire in ANSCs la popolazione di cellule isolate da SVZ.

A questo scopo, Rietze e collaboratori (2001) e Capela e Temple (2002) hanno utilizzato PNA^{low}/HSA^{low} ed il carboidrato Lewis X.

Goodel e collaboratori (1997), utilizzando Hoechst 33342 e osservando le cellule al citofluorimetro hanno osservato la presenza di due popolazioni distinte di cellule isolate dal midollo osseo adulto: una popolazione caratterizzata da bassa fluorescenza, detta “side-population” (SP), e una popolazione caratterizzata da elevata fluorescenza, detta “non side-population” (non-SP). La frazione SP comprende circa l’1% delle cellule del midollo osseo e possiede tutta l’attività staminale ematopoietica. La presenza di una popolazione SP dipende da un diverso efflusso del colorante a seguito di una maggiore attività di proteine di trasporto della famiglia “ATP-binding cassette”. Kim e Morshead (2003) marcando una popolazione eterogenea di ANSCs e ANPCs, derivata da neurosfere, con il colorante Hoechst 33342, hanno ottenuto una popolazione SP arricchita di cellule staminali. Tale lavoro ha dimostrato che la più elevata capacità di eliminare le tossine è una caratteristica comune alle cellule staminali adulte, indipendentemente dal tessuto di origine. Combinando la separazione della SP con il marker LewisX è stato osservato un ulteriore arricchimento in ANSCs.

Corti e collaboratori (2006) hanno descritto l’isolamento di ANSCs da neurosfere e da tessuto dissociato sfruttando l’attività dell’enzima aldeide-deidrogenasi (ALDH). Dopo incubazione delle cellule con Aldefluor, un substrato fluorescente della ALDH, è stata isolata, al citofluorimetro, una popolazione con basso “side scatter” (SSC^{lo}) ed

elevata attività della ALDH (ALDH^{br}). Tale popolazione SSC^{lo} ALDH^{br} è capace di autorinnovarsi, generare neurosfere ed è multipotente. Tale protocollo, oltre ad essere semplice ed altamente riproducibile, è più sicuro e meno tossico rispetto a protocolli che prevedono l'utilizzo di coloranti che si intercalano nel DNA; inoltre permette di discriminare tra cellule vive e cellule morte in quanto solo le cellule con una membrana intatta e una attività enzimatica funzionale possono essere marcate.

Coltivando le ANSCs, isolate con questa tecnica, in monostrato, in terreno con EGF + FGF-2, è possibile ottenere una popolazione pura di ANSCs positiva a RC2, marker di glia radiale (Conti et al., 2005).

La neurogenesi nel cervello adulto in condizioni patologiche

In condizioni patologiche si osserva spesso un'alterazione della neurogenesi endogena conseguente ad una riduzione o ad un aumento della proliferazione dei progenitori nella SGZ e nella SVZ. Talvolta, l'aumento della proliferazione è seguito dalla migrazione dei neuroni di nuova formazione nei siti danneggiati. Inoltre, in alcuni tipi specifici di danno, sembra che la neurogenesi endogena venga stimolata anche in regioni in cui normalmente è limitata o assente (Magavi et al., 2000).

Danni cerebrali ischemici possono stimolare la proliferazione dei progenitori cellulari sia nella SGZ sia nella SVZ di topi adulti come dimostrato da esperimenti di incorporazione di BrdU (Kokaia e Lindvall, 2003). Arvidsson e collaboratori (2002) hanno dimostrato che l'occlusione dell'arteria cerebrale media determina un aumento della proliferazione cellulare nella SVZ, la migrazione dei neuroni di nuova formazione nell'area striatale danneggiata e l'acquisizione da

parte di questi neuroni del fenotipo dei neuroni danneggiati. Il livello di rigenerazione endogena è, però, basso e la maggior parte dei nuovi neuroni muore tra la seconda e la quinta settimana dopo il danno ischemico. L'ambiente locale, sebbene fornisca segnali con funzione attraente nei confronti dei neuroni di nuova formazione e induca il differenziamento neuronale, sembra non essere adeguato per la sopravvivenza a lungo termine di tali neuroni (Ming e Song, 2005). L'infusione intraventricolare di EGF e FGF-2 dopo ischemia globale porta ad un aumento della proliferazione e del differenziamento neuronale di progenitori localizzati nell'estensione caudale della SVZ; tali neuroni successivamente migrano e si integrano nell'ippocampo danneggiato (Nakatomi et al., 2002). Inoltre, Jin e collaboratori (2006), basandosi sull'espressione di markers di proliferazione cellulare endogena e di markers tipici neuronali, hanno dimostrato la presenza di neurogenesi in zone di penombra ischemica in cervelli umani.

La neurogenesi adulta, inoltre, è alterata in malattie neurodegenerative croniche. Il cervello di pazienti affetti da malattia di Huntington (HD) mostra un significativo aumento della proliferazione cellulare nella regione subependimale ed alcune di tali cellule proliferanti esprimono il marker neuronale Tuj1 (Curtis et al., 2003). Anche in un modello animale di malattia di Huntington è stato osservato un aumento della proliferazione dei progenitori cellulari, la migrazione di alcuni precursori verso lo strato danneggiato e il differenziamento di un sottogruppo di progenitori in neuroni immaturi Dcx⁺ (Tattersfield et al., 2004). Molti lavori hanno dimostrato che la SVZ di pazienti HD è arricchita di fattori endogeni e recettori che regolano attivamente il ciclo cellulare e/o il differenziamento dei precursori cellulari.

Un aumento della proliferazione dei precursori cellulari e dell'espressione di markers neuronali precoci, sia nella SVZ sia nella SGZ, è stato osservato in un modello murino transgenico di malattia di Alzheimer, anche prima che fossero osservabili perdita neuronale e deposizione di amiloide (Jin et al, 2004).

La proliferazione dei progenitori neurali della SVZ e della SGZ sembra invece ridotta in pazienti affetti da malattia di Parkinson (PD) probabilmente a seguito della denervazione dopaminergica (Hoglinger et al., 2004). Hoglinger e collaboratori hanno, infatti, dimostrato che i precursori proliferanti della regione subependimale esprimono recettori dopaminergici e ricevono afferenze dopaminergiche; la deplezione sperimentale di dopamina nei roditori riduce la proliferazione dei precursori cellulari nella SVZ e nella SGZ. La riduzione della neurogenesi in SVZ e quindi della migrazione di neuroblasti ai bulbi olfattori, determina un'alterata discriminazione degli odori (anosmia), un comune e precoce segno di PD.

La sclerosi laterale amiotrofica (SLA) è una malattia neurodegenerativa progressiva e fatale caratterizzata dalla morte selettiva dei motoneuroni nel midollo spinale, nel tronco encefalico e nella corteccia cerebrale. In particolare, vengono colpiti sia i neuroni da cui originano i fasci cortico-bulbo-spinali sia i neuroni dei nuclei motori dei nervi cranici sia i motoneuroni delle corna anteriori del midollo spinale i cui assoni innervano le fibre striate dei muscoli scheletrici. La disfunzione e la morte motoneuronale causa atrofia muscolare, paralisi progressiva e morte entro 3-5 anni. La malattia è sporadica per circa il 90% dei casi, mentre per il restante 10% è familiare. Le forme familiari comprendono una classe di patologie clinicamente e geneticamente eterogenea con forme autosomiche-dominanti e recessive (Rosen et al., 1993). Circa il 10% dei casi familiari sono legati a mutazioni della Cu/Zn Superossido Dismutasi

1 (SOD1), un enzima antiossidante che protegge la cellula dalla tossicità dell'anione superossido (Subramanian et al., 2002; Williamson e Cleveland, 1999). Non è ancora chiaro come mutazioni nell'enzima SOD1 determinino la patologia. Come modelli animali di SLA sono stati creati topi transgenici che esprimono la SOD1 umana mutata. Il modello più utilizzato è il topo SOD1-G93A con sostituzione di una alanina per una glicina in posizione 93.

In tale modello murino si è osservata, sia in fase presintomatica sia in fase sintomatica, un'alterazione della incorporazione di BrdU nella SVZ, dell'espressione di markers di staminalità e di precursori cellulari (Liu e Martin, 2006). Chi e collaboratori (2006) hanno osservato un aumento della proliferazione di precursori cellulari neurali nelle zone ependimali (EZ) attorno al canale centrale del midollo spinale lombare. Quando questi precursori neurali si allontanano da EZ perdono la capacità proliferativa e migrano verso le corna dorsali del midollo e, solo successivamente, verso le regioni ventrali dove sono presenti i motoneuroni degeneranti. Inoltre, è stato osservato anche un aumento nella neurogenesi de novo nel midollo spinale di tali topi.

Potenziale terapeutico di ANSCs/ANPCs

Negli ultimi anni, l'interesse della comunità scientifica si è focalizzato, sul potenziale terapeutico sia di cellule staminali ottenute da organismi adulti (ASCs), come le ANSCs, sia di cellule staminali embrionali (ESCs), ottenute dalla massa cellulare interna della blastociste e dotate di pluripotenzialità. L'uso terapeutico delle ESCs, oltre a porre problemi di tipo etico e politico dovuti al sacrificio di embrioni, comporta alcuni problemi come la formazione di teratocarcinomi e il rischio di rigetto da parte dell'organismo. La

possibilità di isolare ed espandere in vitro ASCs ha indotto a pensare alla possibilità di effettuare trapianti autologhi. Il trapianto di ASCs autologhe permetterebbe di evitare il fenomeno immunitario del rigetto e l'uso di farmaci immunosoppressivi, favorendo in tal modo anche l'integrazione e la sopravvivenza delle cellule trapiantate.

Una delle maggiori limitazioni all'utilizzo terapeutico di ANSCs/ANPCs per trapianti autologhi consiste nel fatto che il prelievo di tale popolazione cellulare richiederebbe interventi chirurgici invasivi. Tuttavia, tramite una semplice biopsia nasale, è possibile, isolare, dalla mucosa olfattiva adulta umana, una popolazione di ANSCs/ANPCs; tale popolazione rappresenta una candidata promettente per i trapianti autologhi nel SNC (Taupin, 2006).

L'utilizzo terapeutico di ANSCs/ANPCs è indirizzato al recupero di funzioni neurologiche alterate a seguito di un danno acuto o di una malattia neurodegenerativa cronica. Le ANSCs/ANPCs, una volta trapiantate, potrebbero sopperire alla funzione dei neuroni danneggiati attraverso due vie (Bjorklund e Lindvall, 2000): 1) dare origine a nuovi neuroni capaci di integrarsi anatomicamente nelle porzioni danneggiate del cervello ospite ricevendo afferenze, secernendo neurotrasmettitori e riformando proiezioni assonali e sinapsi con altri neuroni ed effettori. Tali neuroni darebbero perciò origine a microcircuiti in grado di sostituire quelli danneggiati; 2) alternativamente, le ANSCs/ANPCs introdotte potrebbero secernere costitutivamente (o perché ingegnerizzate) neurotrasmettitori e/o fattori di crescita capaci di supportare la sopravvivenza e la rigenerazione dei neuroni endogeni.

La conoscenza sempre più accurata del ruolo svolto dai precursori neurali endogeni, del loro potenziale differenziativo e della loro capacità di rispondere a segnali cellulari e molecolari, suggerisce la

possibilità di modulare il comportamento dei precursori endogeni in situ o ex vivo come terapia di sostituzione neuronale. Un limite nella stimolazione della neurogenesi endogena consiste nel fatto che un tale approccio può essere limitato alle regioni del cervello in cui sono localizzati i precursori neurali (SVZ, SGZ). Inoltre, il potenziale differenziativo dei precursori endogeni potrebbe essere limitato tanto da non permetterne l'integrazione nelle varie aree del cervello. Infine, potrebbe essere difficile fornire la corretta combinazione e sequenza di segnali molecolari necessari per indurre i precursori neurali endogeni a proliferare e differenziare nei corretti fenotipi neuronali (Magavi e Macklis, 2001).

Pluchino e collaboratori (2003) hanno dimostrato la capacità di ANSCs murine di raggiungere le aree danneggiate del parenchima cerebrale dopo trapianto intracerebroventricolare in modelli animali di Sclerosi Multipla (SM). Nelle aree demielinizzate è stato osservato un aumento di precursori oligodendrogliali provenienti per il 20% dal differenziamento delle ANSCs inoculate e per la restante parte da precursori di origine endogena. Negli animali inoculati con ANSCs è stata anche osservata una riduzione dell'astrogliosi. Quindi, le ANSCs trapiantate non solo si sono differenziate inducendo una parziale rimielinizzazione, ma hanno anche prodotto fattori in grado di stimolare il differenziamento di precursori oligodendrogliali endogeni e di ridurre l'astrogliosi.

Per quanto riguarda la SLA, una terapia di sostituzione cellulare dovrebbe garantire la sostituzione sia dei motoneuroni superiori sia di quelli inferiori; tali motoneuroni, inoltre, dovrebbero sia integrarsi nei circuiti neurali sia formare giunzioni neuromuscolari.

Corti e collaboratori (2007) trapiantando ANSCs, positive per il carboidrato Lewis X e il recettore di chemochine CXCR4 (LeX+CXCR4+) e capaci di generare in coltura cellule colinergiche

simili a motoneuroni, nel midollo spinale di topi SOD1^{G93A}, hanno osservato un ritardo nell'inizio della malattia e un aumento della sopravvivenza. Le cellule, trapiantate dopo un periodo di condizionamento in coltura, si sono differenziate per la maggior parte in neuroni e per una piccola parte in cellule con fenotipo simile a quello motoneuronale. Inoltre, è stato osservato un effetto neurotrofico delle ANSCs sui motoneuroni degeneranti.

Martin e collaboratori (2007), trapiantando neurosfere, prelevate dal bulbo olfattorio di topi adulti, nel midollo spinale di topi SOD1^{G93A}, hanno osservato un ritardo nell'inizio della malattia, una attenuazione nella perdita delle funzioni motorie e un aumento della durata della vita. Le ANSCs dei bulbi olfattori hanno generato neuroni colina acetiltransferasi positivi, interneuroni e cellule gliali.

Fino ad ora è stato possibile differenziare motoneuroni solo da ESCs. Tali motoneuroni formano in coltura giunzioni neuromuscolari e inducono la contrazione muscolare quando coltivati con mioblasti. Trapiantando motoneuroni differenziati da ESCs murine nel midollo spinale di ratti adulti con danno motoneuronale si è osservata la sopravvivenza del 25% dei motoneuroni trapiantati. Trattando, inoltre, i ratti con inibitori della crescita mielinica, si è osservata la presenza di alcuni motoneuroni nelle corna ventrali (Harper et al., 2004). Non è stato, però, stabilito se questi neuroni possano integrarsi nei circuiti neurali esistenti e ripristinare le funzioni motorie.

In topi chimerici, dotati di una popolazione mista di cellule normali e cellule che esprimono la Superossido Dismutasi 1 (SOD1) mutata, i motoneuroni sono protetti dalla presenza di cellule neuronali e non neuronali sane nell'ambiente circostante (Clement et al., 2003). Ne consegue che il microambiente attorno ai neuroni danneggiati è determinante nel decidere la loro sopravvivenza. L'utilizzo delle cellule

staminali per produrre fattori capaci di prevenire la morte neuronale sembra essere un approccio terapeutico più facilmente realizzabile a breve termine rispetto alla sostituzione motoneuronale.

L'efficacia di tale approccio terapeutico potrebbe essere aumentata modificando geneticamente le cellule staminali affinché producano molecole capaci di promuovere la sopravvivenza motoneuronale. Progenitori corticali umani ingegnerizzati per esprimere il Fattore Neurotrofico di origine Gliale (GDNF) sono stati trapiantati nel SNC di topi transgenici per SOD1 mutata fungendo da "mini-pompe" a lungo-termine. Dopo il trapianto si è osservata una consistente migrazione dei progenitori cellulari verso le aree degeneranti, un'efficiente produzione di GDNF e una consistente conservazione dei motoneuroni sia negli stadi precoci sia in quelli finali della malattia. I progenitori che non esprimono GDNF non mostrano effetti sulla sopravvivenza motoneuronale. Le cellule trapiantate, inoltre, mantengono le caratteristiche di cellule immature. La consistente sopravvivenza neuronale non è accompagnata dal mantenimento dell'innervazione muscolare per cui non si osserva un miglioramento motorio (Suzuki et al., 2007). Wang e collaboratori (2007) hanno osservato, in topi ottenuti incrociando topi transgenici SOD1^{G93A} con topi capaci di overesprimere VEGF nei neuroni, un ritardo nella perdita motoneuronale e nella disfunzione motoria e una sopravvivenza prolungata rispetto a topi SOD1^{G93A}. Il mantenimento della sopravvivenza motoneuronale mediante la produzione di questi fattori neurotrofici potrebbe rappresentare il primo passo di un approccio terapeutico; strategie ulteriori devono essere elaborate per preservare la giunzione neuromuscolare.

Topo Wobbler come modello di malattia del motoneurone

Il mutante “wobbler” (wr/wr), identificato per la prima volta nell’Istituto di Genetica Animale dell’Università di Edinburgo, è portatore di una mutazione spontanea e recessiva in un gene localizzato sul cromosoma 11 (Kaupmann et al., 1992) ed è caratterizzato da un’andatura barcollante. La sintomatologia clinica e le caratteristiche neuropatologiche giustificano l’utilizzo del mutante wobbler come modello di malattia degenerativa del motoneurone.

La patologia wobbler è causata da una mutazione puntiforme L967Q del gene che codifica per la “Vesicular protein sorter 54” (Vps54) (Schmitt John et al., 2005). Questa proteina, insieme con Vps52, Vps53 e Vps51, costituisce un complesso tetrameric (GARP) necessario per il trasporto retrogrado delle proteine dagli endosomi precoci e tardivi al Trans-Golgi Network (TGN) (Conibear et al., 2000; Conibear et al., 2003). La mutazione L967Q, nel dominio C-terminale di Vps54, abolisce in maniera specifica il traffico retrogrado dagli endosomi precoci all’apparato di Golgi senza alterare il pathway di trasporto degli endosomi tardivi (Quenneville et al., 2006).

Mutazioni di geni codificanti per proteine coinvolte nel traffico vescicolare sono responsabili anche in alcune forme di ALS familiare umana. Una mutazione del gene che codifica per la proteina alsina è responsabile di una forma giovanile di ALS, detta ALS2, e di una rara forma recessiva giovanile di sclerosi laterale primaria (PLSJ). ALS2 è caratterizzata da perdita dei motoneuroni superiori, spasticità degli arti e dei muscoli facciali. La proteina alsina ha diversi domini funzionali, tra cui il dominio “vacuolar protein sorting 9” che attraverso il terminale carbossilico la lega alle membrane degli endosomi (Yamanaka et al., 2003).

La forma di ALS chiamata ALS8 (SLA atipica) è autosomica, dominante, a progressione lenta, ed è caratterizzata da fascicolazioni, crampi e tremori posturali. La mutazione missenso P56S associata a questa forma di ALS riguarda la proteina “vesicle-associated membrane protein/synaptobrevin-associated membrane protein B” (VAPB) (Nishimura et al.,2004). E’ stato dimostrato (Soussan et al., 1999) che VAPB si associa alle membrane del reticolo endoplasmatico (ER) ed all’apparato di Golgi mentre la proteina mutata non sarebbe più in grado di interagire con le membrane ER e favorirebbe l’accumulo di proteine con ripiegamento non corretto “misfolded” all’interno dell’ER (Kanekura et al.,2006).

Il decorso clinico della patologia wobbler comprende tre fasi:

-Fase presintomatica (le prime tre settimane di vita postnatale). Il mutante wobbler non mostra segni clinici della malattia.

-Fase sintomatica con progressione veloce della patologia. Dalla terza alla quarta settimana (inizio della fase sintomatica) i topi wobbler sono caratterizzati da una riduzione del 40-50% del peso corporeo, un’andatura instabile e barcollante e un fine tremore della testa. Dalla quarta alla dodicesima settimana si osserva una progressiva riduzione della forza muscolare soprattutto a livello dei muscoli della faccia, del collo e delle zampe anteriori. La riduzione del peso corporeo è dovuta, in parte, a deprivazione nutrizionale. I topi wobbler, diventano progressivamente incapaci di estendere le zampe anteriori ai polsi con conseguente diminuzione della capacità di arrampicarsi e camminare. Le zampe posteriori, invece, rimangono marginalmente colpite dalla malattia fino alla dodicesima settimana di vita.

Quando il topo wobbler viene sollevato per la coda, le zampe posteriori sono flesse invece di essere estese. Intorno ai tre mesi di vita, le analisi elettromiografiche evidenziano una denervazione a

livello dei muscoli delle zampe anteriori, mentre non si osservano anomalie a livello dei muscoli degli arti posteriori (Andrews et al., 1974).

-Fase di stabilizzazione. Il decorso della malattia può essere variabile ma, generalmente, dopo un periodo di rapido peggioramento fino al terzo-quarto mese di età, i sintomi clinici tendono a stabilizzarsi.

Sebbene i mutanti wobbler siano soprattutto conosciuti come modello di malattia neurodegenerativa, i maschi wobbler sono anche sterili. Oltre ad una ridotta spermiogenesi (decremento del 20-30% del numero di spermatozoi nei testicoli), gli spermatozoi presentano ridotta mobilità in seguito ad alterazioni dei microtubuli della coda (Meestma and Sepsenwol, 1980). Inoltre, l'acrosoma di tali spermatozoi non forma un cappuccio attorno al nucleo, ma si presenta sotto forma di vescicole sparse nel citoplasma (Heimann et al., 1991).

I disordini motori osservabili nei mutanti wobbler sono dovuti ad una degenerazione selettiva dei motoneuroni del tratto cervicale del midollo spinale: dalla terza alla dodicesima settimana di vita il numero dei motoneuroni cervicali si riduce del 65%. Morte neuronale è stata anche osservata nel midollo allungato, nel ponte di Varolio ed a livello della corteccia cerebrale. Nella fase presintomatica, si può osservare che il processo degenerativo colpisce inizialmente il soma dei motoneuroni e solo secondariamente l'assone. I motoneuroni degeneranti presentano citoplasma infarcito di vacuoli, soma allargato e corpi di Nissl scarsamente colorati (Duchen and Strich, 1968). Intorno al diciannovesimo-ventiduesimo giorno di vita alcuni nervi intramuscolari contengono assoni frammentati e alcuni assoni pre-terminali mostrano un fenomeno di sprouting innervando più di una fibra muscolare. Le prime fibre mieliniche degeneranti appaiono solo durante la terza settimana di età (Mitsumoto and Bradley, 1982).

Il livello di mRNA del chaperone molecolare Msj-1 è ridotto negli spermatozoi (Meccariello et al., 2002) e nel midollo spinale cervicale dei topi wobbler sia in fase presintomatica (2 settimane) che alla quinta-settimana di età, quando è massima la degenerazione motoneuronale (Boilèe et al., 2002). Al termine della fase presintomatica, sono stati osservati, nel citoplasma dei motoneuroni, aggregati di neurofilamenti e di proteine reattive all'ubiquitina (Andrews JM, 1975; Mitsumoto and Bradley, 1982). Nei motoneuroni colpiti dal processo degenerativo incrementa la sintesi di molecole con proprietà glio e neuro-trofiche come il "Brain derived neurotrophic factor" (BDNF) e il recettore a bassa-affinità p75^{NTR} comune alle neurotrofine (Junior et al., 1998; Tsusaka et al., 2001).

Alla quarta settimana di vita, con la comparsa dei segni clinici della malattia, ha inizio la progressiva morte motoneuronale principalmente nel midollo spinale cervicale e nel tronco encefalico. Tale degenerazione è preceduta da alterazioni ultrastrutturali cellulari: formazione di grossi vacuoli derivanti da dilatazioni del reticolo endoplasmatico (Duchen and Strich, 1968); comparsa di strutture tubulari e aumento del numero dei lisosomi (Andrews, 1975; Bird et al., 1971).

Le alterazioni del soma sono accompagnate da cambiamenti assonali morfologici e funzionali: riduzione del numero di fibre a grosso diametro, perdita dello strato mielinico (Lewkowicz; 1979), alterazione dei sistemi di trasporto assonale (Julien; 1997). I motoneuroni colpiti dal processo degenerativo continuano la sintesi di proteine come il fattore di crescita "Tumor necrosis factor α " (TNF α), la metalloproteasi ADAM8 (Schlomann; 2000), e la "growth-associated protein 43" (GAP43).

Disfunzioni mitocondriali nel midollo spinale cervicale sono state osservate durante le fasi precoci e durante tutta la progressione della malattia (Santoro et al., 2004).

Clowry e collaboratori (1996), osservando l'espressione dell'enzima neuronale ossido nitrico sintasi (nNOS) nei motoneuroni con alterazioni morfologiche, hanno dimostrato l'esistenza di una componente ossidativa nella morte motoneuronale.

La gliosi reattiva è una delle principali risposte del Sistema Nervoso Centrale (SNC) a vari tipi di danno ed è caratterizzata da profondi cambiamenti morfologici e metabolici nelle cellule microgliali e negli astrociti.

Nel topo wobble, a tre settimane di età, sono state osservate cellule microgliali attivate, con morfologia ipertrofica, nel microambiente circostante i motoneuroni degeneranti; durante la fase sintomatica della malattia Boilée e collaboratori (2001) hanno osservato la presenza di cellule microgliali nelle corna ventrali e nella sostanza bianca ventrolaterale.

Fino ad un mese d'età l'astrogliosi è confinata alle corna ventrali del midollo spinale; successivamente si espande anche alle corna dorsali (Laage et al., 1988; Hantaz-Ambroise et al., 1994). Gli astrociti del midollo spinale dei topi wobblers mostrano, sia in situ sia in coltura primaria, le tipiche caratteristiche di astrociti reattivi: aumentata immunoreattività alla GFAP, soma ipertrofico, scarsità di contatti cellulari e processi corti e spessi (Hantaz-Ambroise et al., 1994). Analisi immunoistochimiche hanno messo in luce che, nel topo wobbler, gli astrociti reattivi intensamente GFAP positivi sono Glutamina Sintetasi-negativi (Blondet et al., 1995).

Hantaz-Ambroise e collaboratori (1995) hanno dimostrato, in colture primarie di astrociti ottenuti dal midollo spinale di topi wobblers, una alterazione del metabolismo del glutammato e della glutamina

suggerendo un difetto nel meccanismo che regola la produzione, l'ingresso e/o il rilascio dei due aminoacidi con conseguente possibile effetto citotossico. Tale anomalia del metabolismo del glutammato, riscontrata in vitro, non è stata, però, confermata in vivo.

Gli astrociti wobbler in coltura mostrano anche una differente risposta ai mitogeni rispetto agli astrociti di controllo: l'interleuchina 1α (IL- 1α) e il corticosterone (CORT), che aumentano significativamente la proliferazione degli astrociti di controllo, sono inefficaci sugli astrociti wobbler; il "Transforming Growth Factor β " (TGF β), invece, induce la proliferazione degli astrociti wobbler, ma non quella degli astrociti di controllo. Tale fattore di crescita sembra, inoltre, avere un ruolo nell'induzione dell'espressione della GFAP (Deniselle et al., 1999).

Co-coltivando una popolazione neuronale mista (composta da motoneuroni ed interneuroni) su astrociti wobbler è stata osservata una riduzione della sopravvivenza neuronale. Al contrario, co-coltivando motoneuroni purificati su astrociti wobbler è stato osservato un aumento della sopravvivenza motoneuronale, Ait-Iklef e collaboratori (2000) hanno suggerito la possibilità che gli astrociti wobbler inducano degenerazione motoneuronale in maniera indiretta attraverso gli interneuroni del midollo spinale.

La presenza di alterazioni morfologiche e metaboliche negli astrociti ottenuti da colture primarie di midollo spinale wobbler e il fatto che l'astrogliosi non sia limitata alle zone di neurodegenerazione ha indotto a pensare che la patologia astrocitaria del topo wobbler non dipenda da una risposta alla morte neuronale, ma rappresenti un evento primario nella malattia. Tuttavia, nel midollo spinale dei topi wobbler, si verificano alcuni cambiamenti molecolari che potrebbero essere responsabili dell'induzione della gliosi reattiva. Prima della comparsa degli astrociti reattivi, infatti, i motoneuroni degeneranti

esprimono la chemochina “Transforming Growth factor α ” (TGF α) che è dotata di proprietà gliotrofiche; inoltre, nel momento in cui gli astrociti reattivi, che sono dotati del recettore per TGF α , invadono il midollo spinale, si è osservata la massima produzione della chemochina da parte dei motoneuroni. In tale fase anche gli astrociti reattivi esprimono TGF α (Junior et al., 1994).

Un'altra chemochina che, prodotta dai motoneuroni degeneranti, potrebbe essere responsabile della formazione degli astrociti reattivi è TNF α (Ait-Ikhlef et al., 1999). Tale chemochina è anche capace di aumentare l'espressione della metalloproteinasi ADAM8, necessaria per il rimodellamento della matrice extracellulare a seguito del danno neuronale, in colture primarie di astrociti ottenute da midollo spinale di topi wobblers (Schlomann et al., 2000).