

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE E FUNZIONALE DI NEURONI STRIATALI DERIVATI DA CELLULE STAMINALI EMBRIONALI UMANE

ALESSIA DELLI CARRI (*)

Nota presentata dal s.c. Elena Cattaneo
(Adunanza del 28 giugno 2012)

SUNTO. – Lo sviluppo di protocolli per il differenziamento neurale finalizzato all'ottenimento *in vitro* di neuroni funzionali rappresenta il futuro in campo medico e farmacologico. Il contributo illustra il protocollo sviluppato da laboratorio Cattaneo per ottenere *in vitro* neuroni dello striato da cellule staminali umane embrionali e pluripotenti e pubblicati nel 2013 sulla rivista *Development* (Delli Carri A., Onorati M., *et al.*; 2013). Questi neuroni muoiono nella Corea di Huntington, una malattia degenerativa del sistema nervoso centrale, che determina la degenerazione dei neuroni di tipo striatale localizzati al livello dei gangli della base. La patologia dal punto di vista clinico è caratterizzata da movimenti involontari, da un deterioramento cognitivo progressivo ed alterazione del comportamento.

ABSTRACT. – The development of neural differentiation protocol aimed at obtaining functional neurons *in vitro* represents the future in medicine. The text will explain the protocol developed by Cattaneolab in order to obtain *in vitro* striatal neurons from human embryonic and pluripotent stem cells. The work has been published in 2013 on *Development* (Delli Carri A., Onorati M., *et al.*; 2013). Striatal neurons at ganglia level die in Huntington's Disease, a neurodegenerative disorder of the central nervous system, characterized by a gradual development of involuntary muscle movements, progressive disorientation and confusion, personality disintegration, impairment of memory control.

(*) Center for Stem Cell Research, Università degli Studi di Milano, 20133 Milan, Italy.

E-mail: alessia.dellicarri@unimi.it; elena.cattaneo@unimi.it

C'è molto interesse nel mondo scientifico per lo sviluppo di protocolli per il differenziamento neurale finalizzato all'ottenimento *in vitro* di neuroni funzionali.

Molti laboratori lavorano e collaborano per il raggiungimento di questo obiettivo comune, che rappresenta il futuro in campo medico e farmacologico.

Le cellule staminali embrionali e, più recentemente, quelle pluripotenti indotte (iPS) sono state utilizzate per la messa a punto di protocolli innovativi di differenziamento neuronale. In particolar modo, il trattamento di alcune patologie neurodegenerative attraverso neuroni ottenuti *in vitro* da cellule dello stesso paziente o da embrionali staminali è un'ipotesi attualmente in considerazione per il Parkinson.

Il lavoro condotto dal nostro laboratorio ha coinvolto diversi gruppi, tanti ricercatori e tanti anni di esperimenti ed è stato possibile grazie alla collaborazione con i colleghi facenti parte del consorzio NeuroStemcell (2008-2013), un network di ricerca su scala europea e con il coinvolgimento anche di partner americani. Queste collaborazioni proseguono ancora oggi nel progetto Neurostemcellrepair (2013-2017).

I risultati ottenuti hanno permesso di pubblicare nel 2013 sulla rivista *Development* (Delli Carri A., Onorati M., *et al.*; 2013) il protocollo per ottenere *in vitro* neuroni dello striato da cellule staminali umane pluripotenti. Questi neuroni muoiono nella Corea di Huntington, una malattia degenerativa del sistema nervoso centrale, che determina la distruzione dei neuroni di tipo striatale localizzati al livello dei gangli della base. Questi, che rappresentano la popolazione cellulare più numerosa presente nello striato, utilizzano come neurotrasmettitore il GABA, responsabile di segnali di tipo inibitorio.

Clinicamente è caratterizzata da movimenti involontari, da un deterioramento cognitivo progressivo ed alterazione del comportamento, conseguenza della mancanza dell'azione inibitoria del GABA.

Ad oggi non vi sono farmaci in grado di bloccare o rallentare la progressione della malattia, o curarla; le sostanze attualmente disponibili, benché utili, hanno solo un effetto a livello sintomatico.

Grazie a studi eseguiti sullo sviluppo dello striato nel topo si è riusciti a ricapitolare ciò che succede al livello embrionale durante lo sviluppo del sistema nervoso, *in vitro*, partendo da cellule staminali embrionali umane.

Nelle fasi precoci dello sviluppo del cervello, le cellule staminali sono localizzate in una zona che circonda i ventricoli cerebrali. Quelle

che genereranno i neuroni striatali umani presentano un preciso codice molecolare identificativo, che si modifica, raggiungendo una nuova “impronta molecolare”, quando si allontanano dalla zona, per popolare lo striato. Un terzo codice identificativo viene acquisito, infine, nel momento in cui le cellule raggiungono la zona dello striato dove risiederanno definitivamente.

Il protocollo messo a punto dal nostro laboratorio e pubblicato nel 2013, permette di mimare tutte queste fasi *in vitro* e, dopo 80 giorni, di ottenere neuroni striatali elettrofisiologicamente funzionali. Prevede tre fasi principali: la prima detta d'induzione, in cui le cellule staminali abbandonano lo stato di pluripotenza e sono indirizzate verso un destino neurale. Questa prima fase dura circa 15 giorni e prevede l'uso di particolari terreni di coltura e sostanze sintetiche neuralizzanti.

La seconda fase è di specificazione, in cui l'uso di morfogeni, particolari molecole con specifici segnali regionalizzanti, permette alle cellule di diventare progenitori neurali. Questi saranno capaci di dare origine ad una ridottissima popolazione neuronale, tra cui quelli striatali. La terza fase consiste nell'impartire a questi progenitori una specifica identità di neuroni striatali, inibendo altre identità, e prevede l'utilizzo di una particolare sostanza neurotrofica, che ne permette il loro differenziamento terminale. Questo protocollo permette di ottenere neuroni maturi in 80 giorni.

I colleghi che lavorano sul Parkinson hanno invece dimostrato che è possibile ottenere neuroni dopaminergici autentici da embrionali umane.

Un grande successo è stato la recente pubblicazione, sulla prestigiosa rivista *Stem Cell*, del lavoro condotto da Malin Parmar dell'Università di Lund in Svezia, sull'applicazione clinica delle cellule staminali nei pazienti malati di Parkinson. Anche questo laboratorio ha fatto parte del consorzio NeuroStemcell (2008-2013).

Diverse sono le tappe del sensazionale studio svedese. Gli scienziati, inizialmente, hanno ottenuto neuroni che producono dopamina, gli stessi che vanno incontro a degenerazione nei malati di Parkinson, a partire da cellule staminali embrionali umane. Li hanno trapiantati in topolini da laboratorio e, con sorpresa, hanno constatato che erano in grado di connettersi alle altre cellule nervose del tessuto ospite, attraverso un'estesa rete di ramificazioni. Si tratta di un risultato che ha richiesto tanti anni di ricerca e la speranza dei ricercatori è di poterlo affinare ulteriormente, fino a riuscire a produrre le cellule nel rispetto dei parametri necessari per l'utilizzo clinico. Questo rappresenta uno dei potenziali scenari per il trattamento di alcune patologie neurodegenerative.

