



Università degli Studi di Firenze
Facoltà di Medicina e Chirurgia
Dipartimento di Anatomia Istologia e Medicina Legale

Scuola di Dottorato in Scienze e Tecnologie
Biomolecolari e Morfologiche
Dottorato di Ricerca in Morfologia e Morfogenesi Umana
XXII ciclo
Settore disciplinare BIO/16

**“TRAPIANTO NEURONALE DI TESSUTO
STRIATALE FETALE UMANO
NELLA MALATTIA DI HUNTINGTON”**

Dott.ssa Erica Sarchielli

Coordinatore:
Prof. Paolo Pacini

Tutor:
Prof. Gabriella Vannelli

INDICE

INTRODUZIONE	1
CENNI BIBLIOGRAFICI	3
LA MALATTIA DI HUNTINGTON	3
IL GENE <i>Htt</i> E LA PROTEINA HUNTINGTINA.....	3
DEGENERAZIONE NEURONALE E QUADRO CLINICO.....	5
TRAPIANTO DI CELLULE E TESSUTI FETALI	7
TRAPIANTO DI CELLULE E TESSUTI FETALI IN MODELLI ANIMALI.....	8
TRAPIANTO DI CELLULE E TESSUTI FETALI NELL’UOMO.....	9
RICERCA DI FONTI ALTERNATIVE AL TESSUTO STRIATALE FETALE.....	12
ORGANOGENESI DEI NUCLEI DELLA BASE	15
ETA’ GESTAZIONALE E PREPARAZIONE DEL TESSUTO STRIATALE FETALE OTTIMALI PER IL TRAPIANTO CAUDATO PUTAMINALE	21
RICERCHE PERSONALI	25
MATERIALI E METODI	25
AUTORIZZAZIONI AL TRAPIANTO.....	25
I PAZIENTI.....	27
IL TESSUTO FETALE.....	28
LA PROCEDURA NEUROCHIRURGICA.....	29
IMAGING.....	30
ANALISI IMMUNOGENETICA.....	31
REAL TIME RT-PCR.....	32
IMMUNOCITOCHIMICA.....	33
WESTERN BLOTTING.....	33
ALLESTIMENTO DI COLTURE PRIMARIE.....	35
SAGGI DI MIGRAZIONE SU MATRIGEL.....	35
ZIMOGRAFIA.....	36
RISULTATI	37
RISULTATI PRELIMINARI AL TRAPIANTO	37
PREPARAZIONE DEL TESSUTO STRIATALE FETALE.....	37
CARATTERIZZAZIONE DEL TESSUTO STRIATALE FETALE.....	38

IL TRAPIANTO	41
RISULTATI CLINICI	42
IMAGING	43
PROFILO IMMUNOGENETICO	51
ESPRESSIONE GENICA DEI DONATORI	51
COLTURE PRIMARIE DI NUCLEO CAUDATO FETALE	54
CARATTERIZZAZIONE DELLE COLTURE PRIMARIE DI NUCLEO CAUDATO FETALE	54
TRATTAMENTO CON BDNF	55
DISCUSSIONE	62
BIBLIOGRAFIA	68

INTRODUZIONE

Il trapianto di tessuto nervoso di origine fetale è stato recentemente proposto come una potenziale nuova terapia per la cura di alcune patologie neurodegenerative. Negli ultimi venti anni sono state numerose le evidenze sperimentali che hanno dimostrato il successo di tale terapia nella riparazione a livello cellulare e nel ripristino della funzionalità compromessa in modelli animali di topo, ratto e scimmia (Dunnett & Rosser, 2007a).

In particolare in alcuni modelli sperimentali di Malattia di Huntington (MH) è stata osservata una crescita dei graft trapiantati nella sede primaria della degenerazione, un corretto differenziamento ed una interconnessione con il tessuto dell'ospite accompagnati da un miglioramento dei sintomi sia motori che comportamentali (Dunnett & Rosser, 2007a).

Date queste incoraggianti premesse sono stati intrapresi a livello internazionale dei trials clinici di trapianto di tessuto striatale fetale in pazienti affetti da MH. Questi studi hanno dimostrato sia la sicurezza della procedura neurochirurgica che la crescita dei graft trapiantati ed alcuni effetti benefici dal punto di vista clinico (Dunnett & Rosser, 2007b). Il trial che ha ottenuto i risultati più rilevanti è stato quello effettuato dal gruppo di Cretéil (Francia) in cui cinque pazienti sottoposti alla sperimentazione, durante un follow up di sei anni, hanno mostrato una stabilizzazione e talora un miglioramento dei gravi sintomi della patologia (Bachoud-Lévi et al., 2006).

Nel febbraio 2006, dopo aver ricevuto l'approvazione del Comitato di Bioetica Nazionale e dell'Istituto Superiore di Sanità, è stata avviata presso l'Università degli Studi di Firenze una sperimentazione clinica di trapianto caudato-putaminale di tessuto striatale fetale in pazienti affetti da MH. Questa sperimentazione vede coinvolti operatori e strutture di questa Università: il Dipartimento di Anatomia, Istologia e Medicina Legale, Dipartimento di Ginecologia, Perinatologia e Riproduzione Umana, Dipartimento di Fisiopatologia Clinica, Dipartimento di Neurologia, Dipartimento di Ematologia ed il Dipartimento di Neurochirurgia.

Sulla base di tali presupposti è stata intrapresa una ricerca con i seguenti obiettivi:

- Studio della vitalità, crescita, differenziazione del tessuto striatale fetale umano, in funzione di età gestazionale, modalità di preparazione e conservazione, allo scopo di identificare il materiale fetale ottimale da utilizzare nella procedura di trapianto caudato putaminale.

- Trapianto neuronale su una serie di dodici pazienti affetti da MH allo scopo di analizzare fattibilità, sicurezza ed effetti clinici dell'intervento.
- Studio in vitro dei meccanismi cellulari e molecolari di controllo della neurogenesi striatale.

I nostri risultati hanno confermato non soltanto il potenziale ricostruttivo del tessuto fetale una volta trapiantato a livello dello striato degenerato dei pazienti, ma anche la grande plasticità del cervello adulto che, nonostante la grave malattia, si è dimostrato in grado di accogliere queste nuove strutture ed interagire con esse. Infatti dal nostro studio è risultato che i neuroblasti trapiantati sono in grado di sopravvivere, crescere, migrare e differenziare dando luogo a strutture con caratteristiche anatomiche e funzionali simili a quelle del tessuto sano. Sono stati inoltre osservati miglioramenti clinici anche considerevoli in molti dei nostri pazienti.

CENNI BIBLIOGRAFICI

LA MALATTIA DI HUNTINGTON

La malattia di Huntington (MH) o Corea di Huntington è una patologia neurodegenerativa incurabile ed ad esito letale caratterizzata da un progressivo decadimento delle capacità motorie e cognitive e riconducibile ad una primaria degenerazione del nucleo striato e della corteccia. I sintomi di tale patologia vennero descritti per la prima volta nel 1872 da George Huntington nel suo articolo scientifico “On chorea” (Huntington, 1872), ma solo nel 1993 un’associazione costituita da vari centri di ricerca scoprì ed isolò il gene mutato responsabile della patologia (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993).

La MH è una patologia rara con un’incidenza di circa 5-10 casi su 100.000, con un tasso di nuove mutazioni dell’1-3% e con un’età media di insorgenza di circa 37 anni (con un range d’età compreso tra l’infanzia e gli 80 anni) (Rosas et al., 2008). Inoltre tale patologia viene trasmessa con modalità autosomica dominante, per cui la progenie presenta circa il 50% di probabilità di sviluppare la malattia.

IL GENE *Htt* E LA PROTEINA HUNTINGTINA

Il gene responsabile della MH (gene *Htt* o *IT15*) è localizzato sul braccio corto del cromosoma 4 (4p63) e codifica per la proteina huntingtina (Htt). All’interno di tale gene, in prossimità dell’estremità 5’, è presente una zona caratterizzata da ripetizioni variabili della tripletta CAG (codificante l’aminoacido glutammina). Negli individui sani il numero dei codoni CAG è compreso tra 17 e 35, mentre nei pazienti affetti da MH questo varia tra 36 e 121.

Dalla mutazione genetica consegue una proteina huntingtina mutata (mHtt) in cui è presente una anormale espansione del tratto di poliglutamine in corrispondenza dell’estremità N-terminale (Fig.1). E’ stato inoltre dimostrato che maggiore è il numero di ripetizioni e più precoce risulta essere l’età di insorgenza della patologia (Caviston & Holzbaur, 2009).

L’huntingtina è una proteina prevalentemente citoplasmatica associata alle vescicole ed ai microtubuli. Le sue funzioni non sono ancora del tutto note anche se la forma wild type risulta associata ad alcune proteine importanti per il trasporto intracellulare ed il traffico vescicolare. Ad esempio alcuni studi biochimici hanno dimostrato una sua

diretta associazione con la dineina, molecola importante per il trasporto mediato dai microtubuli, e con la optineurina, molecola implicata nel trasporto mediato dal citoscheletro di actina (Caviston & Holzbaaur, 2009).

Sebbene tale proteina sia espressa in maniera ubiquitaria nell'organismo, la degenerazione cellulare conseguente alla sua mutazione si osserva quasi esclusivamente a livello del cervello (Gil & Rego, 2008).

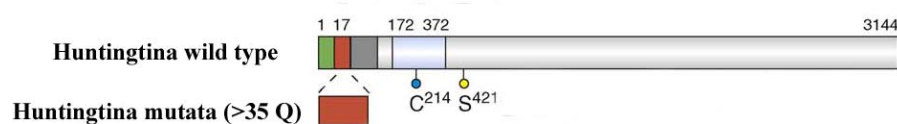


Figura 1. Rappresentazione schematica della proteina huntingtina. In verde la sequenza segnale N-terminale per la localizzazione a membrana; in rosso il tratto di poliglutammine (maggiore di 35 amminoacidi nella MH); in azzurro la regione di associazione con i fosfolipidi acidi di membrana; indicati i siti di fosforilazione su Cys²¹⁴ e Ser⁴²¹.

L'espansione del tratto di poliglutammine nella proteina Htt porta alla formazione di aggregati citoplasmatici ed all'acquisizione di proprietà tossiche. Alcuni studi condotti su modelli animali hanno dimostrato che l'Htt mutata provoca un danno a livello del trasporto vescicolare sia anterogrado che retrogrado ed anche un rallentamento del trasporto mitocondriale, confermando l'ipotesi che tale proteina svolga un ruolo importante nel trasporto intracellulare (Caviston & Holzbaaur, 2009). In particolare è stato ipotizzato che, nella malattia di Huntington, mHtt impedisca il trasporto di BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) dai neuroni corticali, nei quali viene prodotto, ai neuroni striatali. Il BDNF infatti è una molecola necessaria per la neuro protezione e di conseguenza per la sopravvivenza dei neuroni del corpo striato (Ferrer et al., 2000; Gauthier et al., 2004; Altar et al., 1997; Baquet et al., 2004). Ulteriori studi hanno inoltre evidenziato altre possibili funzioni dell'Htt non strettamente correlate al trasporto intracellulare: sempre nell'ambito del pathway del BDNF, ad esempio, Zuccato e collaboratori hanno dimostrato che l'Htt wild type promuove l'espressione di tale fattore di crescita sequestrando nel citoplasma l'inibitore trascrizionale del gene *bdnf* ed impedendone quindi il silenziamento (Zuccato et al., 2003).

E' stato inoltre dimostrato che mHtt esercita i suoi effetti negativi anche a livello mitocondriale; infatti, interagendo fisicamente con le membrane dei mitocondri, ne modifica il potenziale causando un maggior influsso di ioni Ca²⁺ ed una conseguente diminuzione nella produzione di ATP. Alla diminuzione della produzione energetica

all'interno della cellula si associa inoltre un accumulo di radicali liberi che danno luogo ad addotti idrossilati di DNA ed RNA con proprietà tossiche per la cellula (Oliveira et al., 2007). A conferma di ciò l'8-idrossi-2-guanosina, un addotto idrossilato del DNA, si ritrova in quantità particolarmente elevate nel cervello e nel sangue nei pazienti affetti da MH (Polidori et al., 1999). I radicali liberi inoltre sono in grado di agire come molecole di segnalazione a livello intracellulare portando alla trascrizione di alcuni geni. Pertanto l'esposizione cronica a stress ossidativo, a cui sono sottoposti i malati di MH, potrebbe attivare alcune cascate di trascrizione genica che possono portare le cellule verso la morte. Ad esempio PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator) è un co-attivatore di alcuni fattori di trascrizione ed un potente stimolatore del metabolismo mitocondriale e della respirazione cellulare la cui espressione alterata risulta implicata nella patogenesi della MH (McGill & Beal, 2006; Rosas et al., 2008).

Recentemente inoltre è stata formulata l'ipotesi per la quale gli aggregati citoplasmatici di mHtt avrebbero un ruolo neuroprotettivo, mentre l'effetto citotossico risulterebbe mediato dalla forma solubile di mHtt. Subramanian e collaboratori (Subramanian et al., 2009) hanno infatti descritto il ruolo fondamentale della proteina Rhes (Ras homolog enriched in striatum), localizzata selettivamente a livello dello striato, nei meccanismi di citotossicità mediati da mHtt. Rhes, infatti, promuove la sumoilazione, cioè l'attacco covalente della proteina SUMO (Small Ubiquitine-like Modifier), sulla mHtt, portando alla separazione degli aggregati citoplasmatici ed alla conseguente solubilizzazione ed attivazione di mHtt. È stato infatti dimostrato in vitro che la deplezione di Rhes o di SUMO1 annulla la citotossicità di mHtt (Subramanian et al., 2009). Questo risultato potrebbe portare in futuro anche ad interessanti e possibili applicazioni cliniche, data la presenza di Rhes quasi esclusivamente a livello striatale.

DEGENERAZIONE NEURONALE E QUADRO CLINICO

Studi neurofisiologici, morfologici e di imaging hanno dimostrato che i processi degenerativi che accompagnano la MH colpiscono primariamente e prevalentemente il corpo striato, in particolare a livello dei neuroni di tipo II di Golgi (neuroni spinosi medi), che rappresentano circa il 95% della popolazione. Si tratta di neuroni GABAergici che hanno fisiologicamente il compito di inibire, attraverso la via talamica, l'eccitazione corticale; una loro degenerazione risulta pertanto in una eccessiva eccitazione corticale che si riflette nell'insorgenza di movimenti ipercinetici.

Questa neurodegenerazione striatale si riflette a livello macroscopico con una progressiva atrofia del nucleo caudato e del putamen, con conseguente diminuzione del metabolismo striatale. Con il progredire della patologia altre regioni del cervello vengono interessate dalla degenerazione, tra esse alcune aree della corteccia cerebrale, la substantia nigra, il globus pallidus, il talamo ed il nucleo sub-talamico. A causa di questa atrofia generalizzata nei casi più gravi il cervello può arrivare a perdere anche il 40% del suo peso (Gil & Rego, 2008).

Dal punto di vista clinico l'esordio della patologia è spesso accompagnato da sintomi di natura psichiatrica come alterazioni della personalità, irrequietezza, depressione. In seguito, si verifica una progressiva compromissione del sistema motorio con movimenti involontari rapidi della muscolatura facciale e degli arti, tanto da dare luogo ad una strana "danza"; infatti il nome Corea di Huntington deriva dal greco "*chorea*" che appunto significa danza. Precocemente viene osservata anche una compromissione dei movimenti oculari ed il manifestarsi di turbe della memoria fino ad arrivare alla demenza.

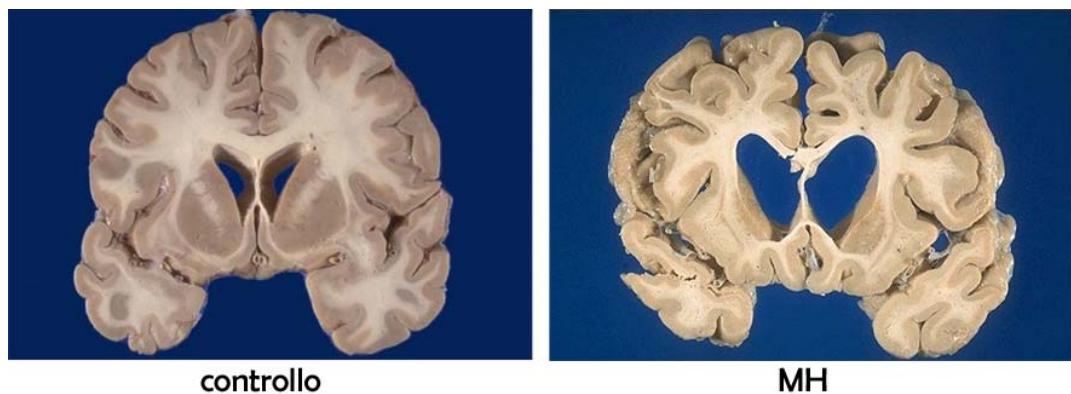


Figura 2. Sezione coronale di un cervello sano e di un cervello affetto da MH.

La durata media della malattia è di circa 15-20 anni con un progressivo raggiungimento dell'invalidità totale ed un'elevata incidenza di suicidi. Sebbene la patologia colpisca il sistema nervoso, il decesso sopraggiunge solitamente per cause concomitanti come complicazioni a livello polmonare o cardiaco e traumi conseguenti alle frequenti cadute dovute alle instabili condizioni di equilibrio.

TRAPIANTO DI CELLULE E TESSUTI FETALI

Recenti scoperte nella biologia cellulare hanno aperto la strada ad una serie di nuove strategie terapeutiche per la cura di numerose patologie del sistema nervoso volte a sostituire i neuroni degenerati tramite il trapianto di cellule staminali o progenitrici (Bjorklund & Lindvall, 2000; Muller et al., 2006; Lindvall & Kokaia, 2006). Ad esempio sono numerosi gli studi effettuati su modelli animali ed i trials clinici che si propongono di sostituire i neuroni dopaminergici degenerati nel morbo di Parkinson (MP) (Bjorklund et al., 2003; Dunnett et al., 2001). Comunque, per quanto riguarda tale patologia, sono reperibili già da tempo delle cure a base di L-DOPA o terapie dopaminergiche analoghe che possono alleviare in maniera significativa i sintomi della malattia; in tal modo il trapianto viene preso in considerazione solo in stati molto avanzati della patologia quando i benefici associati ad altri tipi di approccio non danno più risultati o presentano inaccettabili effetti collaterali. Quindi, ad oggi, nel MP le opzioni chirurgiche vengono prese in considerazione solo quando la degenerazione risulta molto avanzata e la possibilità di un'effettiva riparazione del danno cellulare diventa ancora più difficile. A differenza del MP e di altre patologie neurodegenerative, la malattia di Huntington invece risulta più adatta ad un approccio di tipo trapiantologico, poiché attualmente le terapie farmacologiche sono solo di tipo sintomatico e non riescono ad alleviare in maniera significativa i disturbi dei pazienti. Infatti spesso la cura dei disturbi motori presenta effetti collaterali sul piano cognitivo, mentre quella dei disturbi psichiatrici può portare al peggioramento dei movimenti coreici.

Un altro motivo che rende la MH adatta ad essere curata con il trapianto di cellule è che il danno primario è localizzato in una determinata regione del cervello e rappresenta quindi un target specifico per il rilascio delle cellule durante il trapianto.

Inoltre nel MP lo scopo di un'eventuale terapia è quello di ripristinare il rilascio di dopamina in determinate aree del cervello, pertanto le cellule trapiantate avrebbero il solo compito di produrre tale neurotrasmettitore senza bisogno di integrarsi con il tessuto dell'ospite in una specifica regione. Per quanto riguarda la MH, invece, la scomparsa dei neuroni striatali non solo induce la perdita del GABA a livello dello striato, ma interrompe anche alcuni circuiti che passano dallo striato e connettono aree diverse del cervello. Quindi, per poter ricostruire questi circuiti, i neuroblasti trapiantati devono svilupparsi in una zona ben precisa in modo da tornare a connettere specifiche

aree del cervello. Una tale ricostruzione anatomo-funzionale richiede oltre che il corretto differenziamento dei graft nel cervello dell'ospite, anche la costruzione di connessioni sinaptiche tra gli assoni delle cellule dell'ospite ed il tessuto trapiantato e la proiezione dei prolungamenti delle cellule trapiantate verso appropriati target (Peschanski et al., 1995).

TRAPIANTO DI CELLULE E TESSUTI FETALI IN MODELLI ANIMALI

Un importante passo avanti nella comprensione dei meccanismi alla base della MH è stato possibile grazie allo sviluppo di numerosi modelli animali, prevalentemente murini, in grado di presentare molti degli aspetti clinici, neuropatologici e molecolari di tale patologia. In tal modo è stato possibile testare l'effetto di alcune terapie innovative sia di tipo farmacologico che trapiantologico (Ferrante, 2009).

Alcuni modelli animali di MH sono stati ottenuti trattando gli animali con tossine come l'acido kainico (KA), l'acido ibotenico (IA) e l'acido quinolinico (QA) oppure con molecole in grado di danneggiare il metabolismo energetico mitocondriale. Infatti l'iniezione di tali sostanze in quantità nanomolari nello striato causa morte dei neuroni ed un pattern di degenerazione cellulare, di perdita di capacità motorie e di disturbi comportamentali simile a quello osservato nei pazienti affetti da MH (Kim et al., 2008). Con l'identificazione del gene mutato inoltre sono stati creati dei topi transgenici caratterizzati da varie mutazioni di *Htt*. Tra i diversi animali quello più utilizzato risulta il R6/2 che sviluppa atassia, tremore e tendenza all'epilessia dalle 8 settimane di età fino a morire circa all'età di 13-15 settimane (Mangiarini et al., 1996).

Il primo trapianto su un modello animale di MH è stato effettuato nel 1983 quando frammenti di tessuto striatale fetale di ratto vennero trapiantati nello striato lesionato con KA, con conseguente miglioramento dei disturbi comportamentali e motori (Deckel et al., 1983). Successivamente frammenti di tessuto striatale fetale, contenenti precursori e neuroni differenziati e preparati come sospensioni cellulari, sono stati trapiantati in modelli animali di topo, ratto e scimmia con lesioni a livello dello striato. I risultati sono stati incoraggianti: questo tessuto trapiantato era in grado di sopravvivere, procedere nel suo differenziamento e ripopolare le aree atrofizzate dello striato. Inoltre le cellule trapiantate stabilivano delle proiezioni verso appropriati targets nel cervello dell'ospite, in particolare verso il globus pallidus e la pars reticolata della substantia nigra, e ricevevano una nuova innervazione da corteccia, talamo e pars compacta della substantia nigra (Wictorin et al., 1988; Wictorin, 1992). Curiosamente sono invece stati

effettuati solo due studi su trapianto in topi transgenici, che rappresentano un modello più veritiero della MH poiché, come nell'uomo, la mutazione è presente a livello genetico ed il danno non è dovuto a cause esterne. Il primo studio ha dimostrato che i graft trapiantati sopravvivevano e rimanevano sani, ma senza particolari miglioramenti dei sintomi della patologia (Dunnett et al., 1998). Nel secondo invece lo sviluppo del graft era accompagnato anche da un miglioramento dei sintomi motori (Van Dellen et al., 2001).

Pertanto numerose evidenze sperimentali ottenute su vari modelli animali hanno mostrato che le cellule trapiantate sono in grado di proliferare, sopravvivere, stabilire connessioni con il tessuto dell'ospite e ricostruire anatomicamente nel cervello adulto le strutture danneggiate. Questi dati incoraggianti hanno quindi indirizzato alcuni gruppi di ricerca a tentare un simile approccio anche nell'uomo.

TRAPIANTO DI CELLULE E TESSUTI FETALI NELL'UOMO

Il primo trial clinico di trapianto di tessuto striatale fetale in pazienti affetti da MH venne tentato nel 1990 in Messico, seguito da Cuba e Cecoslovacchia. Ognuno di essi descrisse il protocollo di trapianto in cui il materiale fetale veniva impiantato 1-2 ore dopo l'aborto spontaneo e riportò la fattibilità e l'assenza di effetti collaterali gravi. Tuttavia questi trials non hanno fornito molti dati oggettivi rendendo così difficile determinare l'efficacia della procedura (Dunnett & Rosser, 2007a).

Il primo studio esteso ad un maggior numero di pazienti venne effettuato a metà degli anni '90 a Los Angeles. Per ogni trapianto venivano utilizzati frammenti di tessuto fetale di 8-10 settimane di gestazione ottenuti dalla disgregazione delle eminenze ganglionari laterali di 5-8 donatori. Questo gruppo, oltre a ribadire la sicurezza della procedura chirurgica, descrisse alcuni benefici clinici sia dal punto di vista motorio che cognitivo solo su un ristretto numero di pazienti. Tuttavia tramite immagini di risonanza magnetica dimostrò anche la crescita ed il differenziamento dei graft in un totale di 14 pazienti (Kurth et al., 1996; Ross et al., 1998). Recentemente sono state descritte le valutazioni morfologiche effettuate dopo il decesso di tre dei pazienti appartenenti a questo trial clinico. In un primo articolo scientifico Keene e collaboratori hanno mostrato i risultati su due autopsie a sei anni dall'intervento, nelle quali era evidente il differenziamento in senso striatale e la sopravvivenza del tessuto trapiantato, anche se era presente una scarsissima integrazione con il tessuto dell'ospite. Infatti il tessuto di origine fetale costituiva delle nicchie ben separate dal circostante tessuto ed in

corrispondenza delle aree raggiunte dall'ago durante l'intervento. Questi risultati si accompagnavano però ad una mancanza di miglioramenti clinici in questi pazienti (Keene et al., 2007). In un secondo articolo invece è stato descritto lo sviluppo di overgrowth a livello dei graft trapiantati in un paziente deceduto circa 10 anni dopo il trapianto. Anche in questo caso il tessuto trapiantato rimaneva delimitato rispetto a quello circostante e, dopo un'iniziale fase di miglioramento, il paziente mostrava comunque la progressione della patologia (Keene et al., 2009).

Il primo trial clinico basato su un protocollo sperimentale standardizzato è stato intrapreso a Créteil (Francia) alla fine degli anni '90 da M. Pechanski, C. Bachoud-Lévi e collaboratori (Bachoud-Lévi et al., 2000). Questo studio utilizzava per la prima volta il CAPIT-HD (Core Assessment Protocol for Intracerebral Transplantation in Huntington Disease) che definisce un insieme di valutazioni neurologiche, psicologiche, psichiatriche e di imaging da ripetere ad intervalli definiti per un minimo di un anno prima dell'intervento e due anni dopo (Quinn et al., 1996). Il protocollo si basava sull'isolamento di entrambe le eminenze ganglionari appartenenti a più feti di età gestazionale compresa tra le 7.5 e le 9 settimane, la loro frammentazione ed il loro impianto mediante procedura stereotassica in 4 o 5 siti all'interno di nucleo caudato e putamen del paziente. Ogni paziente riceveva il trapianto bilateralmente a distanza di circa un anno. Il gruppo di Créteil ha riportato i dati ottenuti in cinque pazienti dopo circa sei anni di follow up. Tre di questi pazienti hanno mostrato un miglioramento dei sintomi della patologia associato ad una crescita e funzionalità dei graft apprezzabile tramite risonanza magnetica, FDG-PET e valutazioni elettrofisiologiche. Dopo due anni di significativo miglioramento tuttavia è stata osservata una stabilizzazione dei parametri cognitivi ed un deterioramento di alcuni parametri motori. Un quarto paziente non ha mai mostrato segni di miglioramento ed un quinto, dopo un'iniziale progresso, è regredito probabilmente a causa di rigetto del materiale trapiantato, mostrando quindi un decorso della malattia analogo a quello osservato in pazienti non sottoposti al trapianto. Questo follow up di sei anni dimostrava quindi che il trapianto di tessuto striatale fetale poteva apportare miglioramento e stabilità dei sintomi anche per alcuni anni (Bachoud-Lévi et al., 2006), rimanendo un risultato estremamente incoraggiante se confrontato con il continuo progredire della patologia presente nei pazienti non sottoposti a trapianto.

Risultati clinici ed autoptici interessanti sono stati ottenuti anche da un trial clinico intrapreso a Tampa (Florida, USA). Sono stati descritti i risultati conseguiti in sette

pazienti sottoposti a procedura stereotassica bilaterale utilizzando l'eminenza ganglionare laterale di 2-8 feti di 8-9 settimane di gestazione. Sei pazienti hanno mostrato un miglioramento dei sintomi dopo un anno di follow up. Inoltre valutazioni effettuate su un paziente deceduto 18 mesi dopo l'intervento hanno evidenziato la crescita dei graft con morfologia tipicamente striatale raggiunti da fibre dopaminergiche provenienti dal tessuto dell'ospite ed assenza di reazioni immunologiche e gliosi (Hauser et al., 2002). In un articolo del 2009 inoltre venivano descritte valutazioni immunoistochimiche e di microscopia elettronica ottenute sui nuclei della base di tre pazienti deceduti dieci anni dopo il trapianto. In questo studio veniva confermata l'interconnessione tra i grafts ed il tessuto dell'ospite tramite proiezioni corticali di quest'ultimo, ma veniva dimostrato anche che la sopravvivenza dei grafts si riduceva dopo 10 anni (soprattutto nel nucleo caudato rispetto al putamen) e che questi andavano incontro ad una degenerazione neuronale che colpiva prevalentemente i neuroni con prolungamenti piuttosto che gli interneuroni, ricapitolando in tal modo la perdita di neuroni striatali tipica della MH (Cicchetti et al., 2009).

Un altro trial clinico di trapianto di tessuto striatale fetale nella MH è stato intrapreso in Inghilterra. Si tratta di una collaborazione tra sei centri (chiamata "NEST-UK"). Il protocollo è analogo a quello utilizzato dal gruppo di Créteil anche se in Gran Bretagna il tessuto non veniva frammentato, ma veniva preparata una sospensione cellulare che era congelata in attesa di essere utilizzata per l'intervento. In letteratura sono presenti dati relativi alla sicurezza dell'intervento e assenza di effetti collaterali, anche se non sono stati descritti dei miglioramenti nei pazienti (Dunnett & Rosser, 2007a; Dunnett & Rosser, 2007b).

A seguito di un trial clinico recentemente iniziato in Germania, sono stati pubblicati i risultati di un'autopsia effettuata su un paziente deceduto per cause non correlate al trapianto 6 mesi dopo l'intervento. Analisi immunoistochimiche con vari marker di proliferazione e differenziamento in senso neuronale e striatale hanno confermato la sopravvivenza, lo sviluppo ed il differenziamento dei grafts anche a tempi brevi dopo l'intervento, senza tuttavia la presenza di benefici dal punto di vista clinico. In particolare i grafts mostravano cellule positive per markers di differenziamento in senso striatale e gliale, ma anche cellule nervose immature in grado di migrare nel tessuto circostante e di proliferare attivamente. Era inoltre già presente una interconnessione tra il tessuto trapiantato e quello dell'ospite, deducibile dalla presenza di fibre

dopaminergiche dell'ospite che raggiungevano le cellule dei grafts differenziate in senso striatale (Capetian et al., 2009).

A partire da febbraio 2006 presso l'Università di Firenze anche il nostro gruppo di ricerca ha iniziato questo tipo di approccio sperimentale che ad oggi ha portato all'intervento su dodici pazienti con risultati incoraggianti (Gallina et al., 2008; Gallina et al., 2009).

RICERCA DI FONTI ALTERNATIVE AL TESSUTO STRIATALE FETALE

Gli ultimi dieci anni hanno visto il moltiplicarsi di studi volti all'identificazione di fonti alternative che possano sostituire la dipendenza da tessuto fetale fresco nella cura della MH e di altre malattie neurodegenerative (Dunnett & Rosser, 2007b).

Una delle possibili alternative si basa sull'utilizzo delle cellule staminali, poichè relativamente facili da ottenere rispetto al tessuto fetale fresco e manipolabili in vitro al fine di eliminare l'eventuale rigetto da parte dell'ospite. Le cellule staminali possono essere isolate da tessuto embrionale, fetale, neonatale ed anche adulto ed essere propagate in vitro; negli ultimi anni inoltre è stato proposto l'uso di cellule trans-differenziate, cioè cellule già commissionate successivamente trasformate in tipi cellulari diversi.

Le cellule staminali possono essere utilizzate direttamente oppure differenziate in vitro prima del trapianto. In tal senso un esempio è costituito dallo studio di Dinsmore e collaboratori nel quale cellule staminali embrionali di topo sono state differenziate in vitro tramite l'utilizzo di acido retinoico, acquisendo il fenotipo di neurone GABAergico. Utilizzate per il trapianto in un modello animale di MH, tali cellule hanno mantenuto la capacità di produrre GABA anche dopo il trapianto sviluppando masse che presentavano markers di cellule nervose come acetilcolina esterasi ed enolasi neurone-specifica; l'utilizzo di tali cellule però non ha mostrato alcun miglioramento dei sintomi della patologia. Nell'ambito dello stesso studio cellule non differenziate in vitro hanno mostrato invece un minimo differenziamento spontaneo in senso nervoso anche 6 settimane dopo il trapianto, dando luogo a masse di tipo tumorale (Dinsmore et al., 1996).

La maggior parte degli studi sperimentali si è basata comunque sul trapianto di cellule nervose di origine fetale espanse in coltura come neurosfere; tali studi tuttavia hanno mostrato una scarsa sopravvivenza dei graft, una scarsa differenziazione oltre che talvolta la formazione di tumori ed assenza di miglioramenti rilevanti dal punto di vista

dei sintomi. I risultati migliori sono stati ottenuti da cellule tenute in coltura per tempi molto brevi (inferiori ai 10 giorni) (Dunnett & Rosser, 2007b).

Altri studi su modelli animali si sono concentrati sull'utilizzo di cellule staminali adulte umane e murine (del sangue, midollo osseo, cordone ombelicale o derivanti da compartimenti staminali nervosi adulti come la regione sub-ventricolare dell'encefalo) oppure cellule di linee non nervose trans-differenziate in senso striatale. Sebbene questi studi abbiano riportato dei miglioramenti in alcuni test soprattutto a livello comportamentale e la capacità di queste cellule di differenziare talvolta in senso nervoso, sembra che l'effetto benefico sia dovuto più ad una neuroprotezione che ad un effettivo ripristino della funzionalità striatale (Dunnett & Rosser, 2007b).

Oltre agli studi basati sull'uso di cellule staminali embrionali, fetali ed adulte altri hanno considerato linee cellulari immortalizzate, poichè queste cellule possono essere ampiamente espanse in vitro per poi essere differenziate in diversi fenotipi. Trapiantate in modelli animali di MH, queste cellule hanno mostrato la capacità di sopravvivere e migrare, ma scarse capacità di differenziamento ed un potenziale proliferativo troppo elevato ed in grado di causare la formazione di strutture tumorali (Dunnett & Rosser, 2007b).

Un ulteriore approccio alternativo si è basato sull'utilizzo di fattori di crescita somministrati a livello della degenerazione neuronale. Dato che i fattori di crescita sono molecole di alto peso molecolare che non sono in grado di attraversare facilmente la barriera emato-encefalica, è stato sperimentato il loro trasporto nella sede della degenerazione tramite trapianto di cellule ingegnerizzate o uso di vettori virali in grado di rilasciare neurotrofine come BDNF, GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) e CNTF (ciliary neurotrophic factor). Alcuni di questi studi erano basati sull'utilizzo di cellule trasformate per produrre tali fattori di crescita ed incapsulate all'interno di membrane semi-permeabili, in modo che le interazioni con il tessuto ospite fossero limitate solo allo scambio di molecole, senza il rischio di crescita tumorale o rigetto dei grafts; sperimentazioni su modelli animali hanno mostrato alcuni risultati promettenti (Clelland et al., 2008). Inoltre cellule ingegnerizzate a produrre CNTF sono state utilizzate in un trial clinico su pazienti affetti da MH senza ottenere però miglioramenti dal punto di vista clinico (Bloch et al., 2004).

Alcune sperimentazioni su modelli animali hanno investigato anche la possibilità di una auto-riparazione della degenerazione striatale tramite la up-regolazione della neurogenesi endogena. E' noto infatti che nei mammiferi, compreso l'uomo, sono

presenti nell'encefalo dei compartimenti staminali anche nell'individuo adulto, localizzati nell'ippocampo e a livello della regione sub-ventricolare (SVZ) (Eriksson et al., 1998). E' stato osservato un miglioramento dei sintomi motori e cognitivi in modelli animali di MH dopo induzione di neurogenesi endogena tramite fattori di crescita ed alcuni farmaci. Ad esempio, in un modello murino di MH, il trattamento con FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2) è stato in grado di aumentare del 150% la proliferazione delle cellule della SVZ accompagnato da un aumento di neuroni immaturi e dalla diminuzione degli aggregati formati dall'huntingtina mutata. Queste cellule erano inoltre in grado di migrare verso lo striato e formare prolungamenti alleviando i sintomi della patologia (Cho et al., 2007). Questi risultati potrebbero aprire la strada ad un possibile trattamento non chirurgico della MH tramite modificazione della neurogenesi endogena, anche se i dati presenti in letteratura non sono ancora sufficienti per poter auspicare un simile trattamento a breve anche nell'uomo (Clelland et al., 2008).

I dati presenti in letteratura dimostrano comunque che ad oggi il tessuto striatale fetale fresco rappresenta la migliore fonte cellulare per il trapianto nella MH. Infatti questa metodica utilizza una corretta popolazione di cellule, cioè i precursori di quei neuroni striatali degenerati che necessitano di essere sostituiti. Il fenotipo dei neuroni fetali è già ben delineato durante lo sviluppo fetale all'età gestazionale in cui le cellule vengono prelevate per il trapianto ed infatti numerosi studi hanno dimostrato che dopo il trapianto queste cellule sono in grado di differenziare nelle popolazioni normali di interneuroni, neuroni e glia presenti nel cervello sano ed in alcuni casi di stabilire connessioni appropriate con altre strutture cerebrali dell'ospite. Le fonti alternative di cellule elencate in questo paragrafo invece hanno raramente mostrato risultati davvero incoraggianti mostrando invece spesso presenza di overgrowth e mancato differenziamento in senso striatale (Dunnett & Rosser, 2007b).

ORGANOGENESI DEI NUCLEI DELLA BASE

TELENCEFALO. Le vescicole telencefaliche originano durante la settima settimana di sviluppo fetale come evaginazioni laterali della cavità prosencefalica. Ogni vescicola si dilata precocemente e la sua cavità, il ventricolo laterale, rimane in comunicazione con il terzo ventricolo tramite il forame interventricolare (Fig.3a; Hochstetter 1919, 1929). Inoltre la vescicola si accresce in modo rapido superiormente, anteriormente e posteriormente, mentre mostra una crescita più lenta inferiormente (Fig.3b; Hochstetter 1919, 1929). Nella porzione basale la parete diviene più spessa rispetto alle altre zone. L'espansione in senso posteriore delle due vescicole porta le loro porzioni caudali lateralmente rispetto alla parte più alta del diencefalo, mentre superiormente ed anteriormente le vescicole si trovano in diretto contatto con il diencefalo; così prendono origine i due emisferi cerebrali, separati tra loro da una lamina di tessuto connettivo detta falce cerebrale (Fig.3c; Hochstetter 1919, 1929). In tal modo ogni emisfero può essere suddiviso in una porzione basale più spessa o porzione striatale, che darà luogo nel corso dello sviluppo al corpo striato, ed in una porzione sopra-striatale più sottile, il pallio, che darà luogo alla corteccia cerebrale (Fig.3d; Hochstetter 1919, 1929). Medialmente, lungo la zona di contatto con il diencefalo, ogni parete palliale diviene molto sottile e proietta nella cavità del corrispondente ventricolo laterale dando luogo alla tela corioidea (Fig.3c-d; Hochstetter 1919, 1929).

La linea di invaginazione, che compare a livello del forame interventricolare, è detta fessura corioidea e si estende indietro lungo la parete mediana dell'emisfero cerebrale.

Sopra la regione di connessione del plesso corioideo, una piccola area della parete si ispessisce e si invagina medialmente nella cavità del ventricolo laterale dando luogo ad una elevazione longitudinale da cui deriverà l'ippocampo (Fig.3c; Hochstetter 1919, 1929). Quest'ultimo è indicato sulla superficie mediale dell'emisfero da un solco longitudinale, la fessura ippocampale, che si porta superiormente e parallelamente alla fessura corioidea.

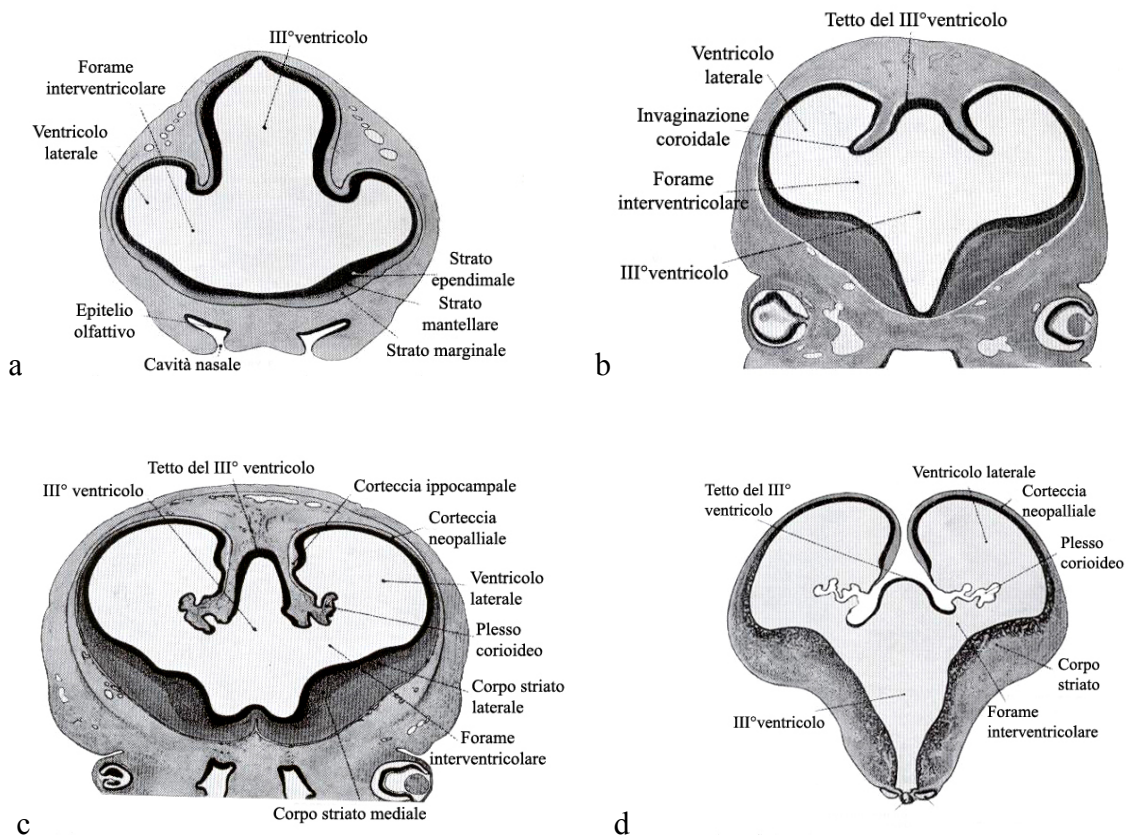


Figura 3. a) Sezione coronale del prosencefalo in un feto umano di 13 mm. b) Sezione trasversale del prosencefalo in un feto umano di 15 mm. c) Sezione trasversale del prosencefalo in un feto umano di 17 mm. d) Sezione trasversale del prosencefalo in un feto umano di 19 mm.

La parete mediale dell'emisfero sopra l'ippocampo e le pareti dorsale e laterale della porzione sopra-striatale rappresentano la struttura primordiale che corrisponder  alla corteccia neopalliale, che si svilupper  in stretta associazione con il talamo e ricever  da esso impulsi afferenti non olfattivi provenienti da tutto il corpo.

La zona ispessita laterale rispetto al corpo striato in via di sviluppo   inizialmente priva di neuroblasti, ma si assiste ad una precoce migrazione di cellule che popolano questa regione (Fig.4) dando origine ad una formazione corticale irregolare, il paleopallium o corteccia piriforme, che riceve i neuroni olfattivi secondari dal bulbo olfattivo (Hochstetter 1919, 1929).

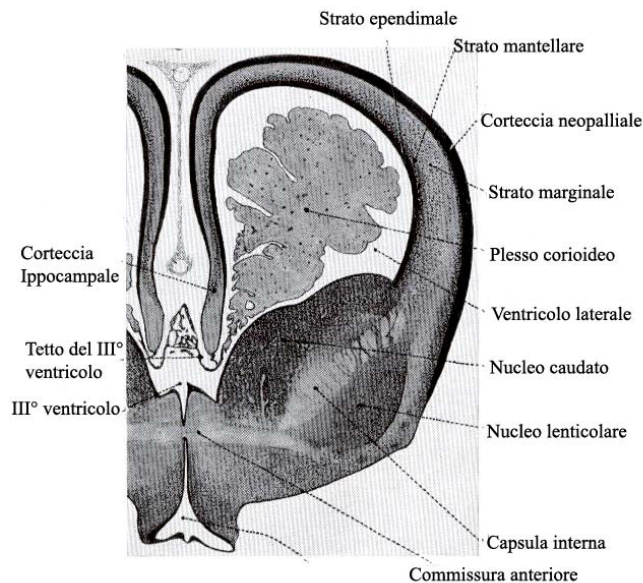


Figura 4. Sezione coronale dell'emisfero cerebrale sinistro di un feto umano di 73 mm.

Ogni emisfero cerebrale, oltre ad accrescersi ed andare incontro ad una crescita differenziale della sua parete, mostra cambiamenti nella forma e nell'estensione soprattutto posteriormente andando a ricoprire in maniera progressiva il diencefalo, il mesencefalo e la porzione superiore del mesencefalo (Fig.5a; Hochstetter 1919, 1929). Questi cambiamenti portano alla formazione della corteccia frontale, temporale e, in un secondo tempo, occipitale. A causa di un relativo rallentamento durante la crescita nella regione compresa tra i lobi frontale e temporale, nella quale si sta sviluppando il corpo striato, si forma una depressione chiamata insula, sopra e dietro l'area parietale che comparirà successivamente. Con una crescita superficiale maggiore rispetto a quella degli emisferi, le aree corticali sviluppano circonvoluzioni e solchi. In tal modo l'area insulare viene gradualmente ricoperta dalle adiacenti regioni corticali che la rivestono formando l'opercolo (Fig.5b; Hochstetter 1919, 1929).

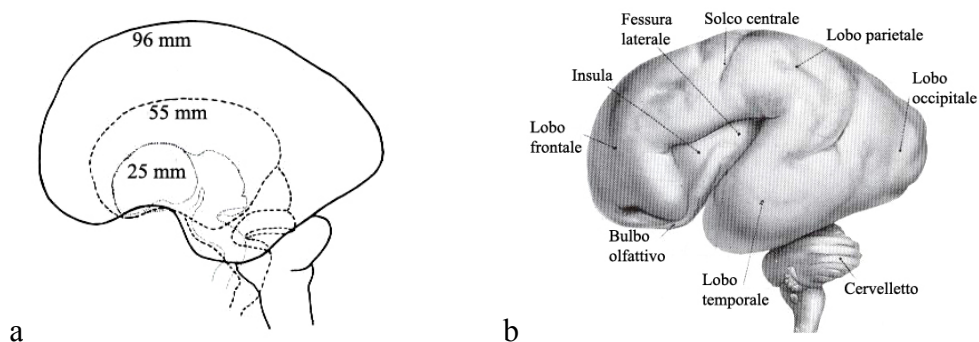


Figura 5. a) Sovrapposizione degli emisferi cerebrali in feti umani di 25 mm, 55 mm e 96 mm. B) Superficie laterale di un cervello umano alla fine del quinto mese di gestazione.

Mentre la superficie dell'emisfero cerebrale subisce tali cambiamenti, modifiche correlate si verificano al suo interno. Come l'emisfero si espande il ventricolo laterale si estende indietro e, con la formazione del lobo temporale, si curva ventro-lateralmente a formare il corno inferiore. Inoltre, quando il lobo occipitale si è formato, un'ulteriore espansione della cavità ventricolare forma il corno ventricolare posteriore (Fig.6; Hochstetter 1919, 1929).

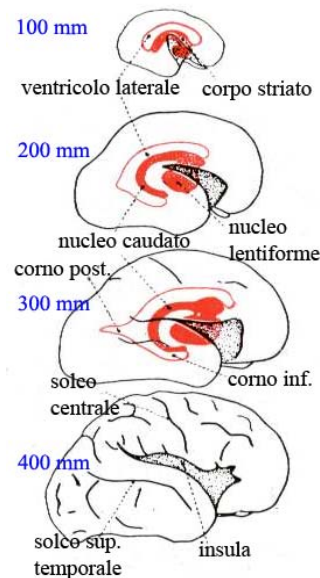


Figura 6. Sviluppo dei ventricoli laterali e del corpo striato in feti umani di 100 mm, 200 mm, 300 mm e 400 mm.

Alle modifiche a livello ventricolare si associano cambiamenti che si verificano nella regione striatale basale e nel pallio. Questi cambiamenti determinano ulteriori variazioni nella forma del ventricolo e si concludono nella definitiva formazione del corpo striato e della corteccia.

CORPO STRIATO. La regione striatale compare inizialmente come una sporgenza della base del telencefalo nella cavità ventricolare a livello del forame interventricolare. Essa rappresenta il risultato di una consistente proliferazione della zona germinale e può essere suddivisa precocemente in un'eminenzia striato-mediale ed una laterale. Con l'espansione posteriore dell'emisfero cerebrale e del ventricolo laterale in esso contenuto, i sollevamenti striatali formano dei solchi longitudinali che si estendono per la maggior parte del pavimento della cavità ventricolare (Fig.7; Hochstetter 1919, 1929); quando si sono portati caudalmente essi si vengono a trovare nella parete anteriore della porzione discendente del ventricolo e nella volta del corno inferiore (Fig.6; Hochstetter 1919, 1929). La linea di invaginazione del plesso corioideo si trova

dorso medialmente al sollevamento striatale mediale nella parte anteriore della cavità ventricolare, ma poichè la fessura corioideale segue il margine mediale del corpo striato che si sta sviluppando, essa viene a trovarsi al di sotto di esso quando questo si approfonda nel corno inferiore del ventricolo. In modo simile, l'ippocampo è situato dorso-medialmente alla fessura corioidea nella parte anteriore della cavità ventricolare, ma risulta infero-laterale nel corno ventricolare inferiore.

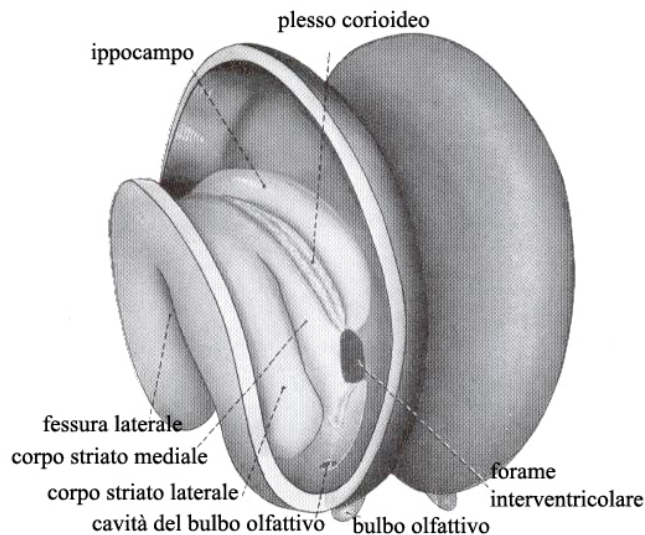


Figura 7. Schema dell'emisfero cerebrale di un feto umano di 46,5 mm: è rappresentata la cavità ventricolare destra, il corpo striato e l'invaginazione corioideale.

Mentre si sta definendo la forma generale del corpo striato, un numero crescente di fibre afferenti ed efferenti procedono da e verso la corteccia in fase di differenziamento. Nel loro decorso gli assoni separano in maniera incompleta il corpo striato in una porzione dorso-mediale, che sporge nella cavità ventricolare, ed una porzione ventro-laterale separata dal ventricolo dai fasci di fibre che costituiscono la capsula interna. La sporgenza intraventricolare degli iniziali rigonfiamenti striatali è rappresentata dal nucleo caudato che si trova nel pavimento della parte anteriore della cavità ventricolare, nella parete anteriore della sua porzione discendente e nel tetto del corno inferiore. La porzione ventro-laterale del corpo striato, che diventa il nucleo lentiforme, può essere divisa in una regione laterale, il putamen, con cellule scure molto simili alla struttura del nucleo caudato, ed una regione mediale più chiara, il globus pallidus.

Non tutte le fibre di provenienza corticale passano nella capsula interna, alcune si portano lateralmente al nucleo lentiforme nella capsula esterna e lo separano da un gruppo appiattito di cellule, il claustrum, che giace profondamente alla corteccia insulare.

Il nucleo caudato viene a trovarsi in stretto contatto con il talamo, mentre il nucleo lentiforme rimane separato da esso dalle fibre della capsula interna che passano medialmente attraverso la spessa parete posteriore del forame interventricolare; le fibre poi passano attraverso la regione sub-talamica per entrare nei peduncoli del mesencefalo (Hochstetter 1919, 1929).

ETA' GESTAZIONALE E PREPARAZIONE DEL TESSUTO STRIATALE FETALE OTTIMALI PER IL TRAPIANTO CAUDATO PUTAMINALE

Nonostante molti studi effettuati su modelli animali, il periodo gestazionale ottimale per il prelievo del corpo striato fetale, da utilizzare per il trapianto caudato putaminale in pazienti affetti da MH, non è stato ancora stabilito in maniera risolutiva; tutti gli studi concordano comunque che tale tessuto si debba trovare in quella fase di differenziamento neuronale nella quale la crescita assonale non è ancora iniziata. In previsione di studi clinici sull'uomo, molti modelli animali sono stati utilizzati per stabilire l'età gestazionale più opportuna in cui effettuare il prelievo. I dati ottenuti hanno dimostrato che il massimo effetto dal punto di vista clinico in un modello murino di MP è stato conseguito impiantando tessuto fetale E14, Carnegie stage 18; questi impianti inoltre assicuravano anche la maggior proporzione di tessuto simil striatale (Fricker et al., 1997). Nella marmotta, inoltre, è stato osservato un buon recupero funzionale con tessuti di 13-16 mm di lunghezza cranio-caudale, corrispondenti a 73-75 giorni di età gestazionale, Carnegie stage 18-21 (Kendall et al., 1998). Mutuando questi dati nell'uomo, il tessuto del donatore più adatto sembrerebbe quello di embrioni di lunghezza cranio-caudale di 13-24 mm, corrispondente a 44-53 giorni di età gestazionale. Dato che l'abbozzo striatale può essere isolato solo in feti umani di minimo 20 mm di lunghezza cranio-caudale, nell'uomo questa finestra di opportunità dovrebbe essere spostata più avanti seguendo la stadiazione di Carneige; infatti Hurelbrink (Hurelbrink et al., 2000) ha suggerito una finestra di 66-82 giorni post-concepimento, ottimale in termini di volume di tessuto impiantabile. I dati presenti in letteratura mostrano che nell'uomo è stato impiegato esclusivamente tessuto striatale fetale di 7-12 settimane di età gestazionale (Keene et al., 2009; Bochoud-Lévi et al., 2006; Hauser et al., 2002; Dunnett & Rosser, 2007a; Capetian et al., 2009). Per ottenere un trapianto ricco di neuroni GABAergici, cioè quelli che costituiscono la maggior parte del corpo striato, è necessario prelevare l'eminanza ganglionare prominente sul pavimento del ventricolo laterale di ciascun emisfero cerebrale, lateralmente all'abbozzo del plessi corioidei (Fig.8); questa è organizzata in una porzione laterale ed una mediale corrispondenti a due creste costituite da uno strato germinale, uno subependimale ed uno profondo.

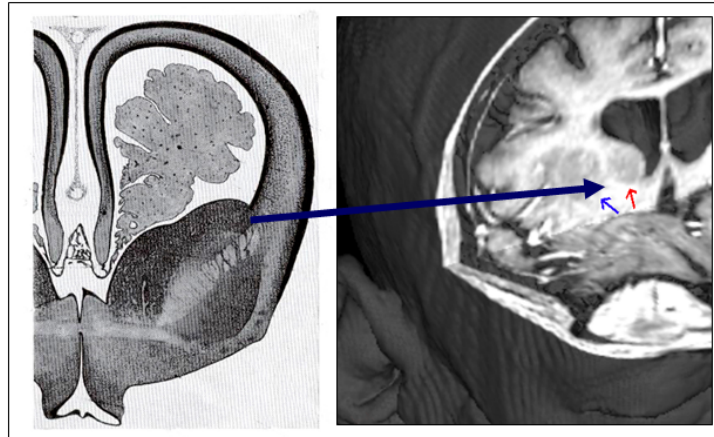


Figura 8. Eminenza ganglionare di un feto umano di 73mm e nuclei della base di un paziente sottoposto a trapianto (Gallina et al., 2008a).

Precursori striatali e non striatali prendono origine dagli strati superficiali e migrano ventralmente e lateralmente verso e attraverso il sottostante abbozzo striatale. In tal modo diventa impossibile isolare esclusivamente le cellule striatali rispetto alle altre popolazioni che migrano attraverso la stessa area; di conseguenza quelli che vengono definiti grafts striatali, prelevati dall'eminenza ganglionare, in realtà comprendono in parte anche cellule non striatali (Dunnett & Rosser, 2007a). Tuttavia è possibile separare popolazioni cellulari diverse prelevando o l'eminenza ganglionare laterale o quella mediale. Dall'eminenza ganglionare laterale hanno origine prevalentemente i neuroni spinosi medi dello striato, mentre dall'eminenza ganglionare mediale originano primariamente gli interneuroni, le cellule gliali ed altri neuroni non striatali. Date queste premesse, alcuni ricercatori hanno proposto che i grafts striatali utilizzati per il trapianto debbano essere sezionati esclusivamente dall'eminenza ganglionare laterale (Pakzaban et al., 1993). Tuttavia, se questa selezione aumenta il numero dei neuroni striatali, risulta comunque incompleta di cellule importanti per il corretto sviluppo dello striato. Pertanto ad oggi l'utilizzo dell'intera eminenza risulta il miglior compromesso (Dunnett & Rosser, 2007a).

Il successo dei trapianti di cellule fetali umane nelle malattie neurodegenerative sembra dipendere anche dalle modalità di preparazione e conservazione del materiale utilizzato per il trapianto. Dalla letteratura risulta che l'intervallo tra la raccolta ed il trapianto di tessuto fetale e le sue modalità di preparazione (es. temperatura e durata della conservazione, pH della soluzione di conservazione, densità cellulare, metodi di dissociazione del tessuto) possono influenzare la sopravvivenza delle cellule neuronali (Peschansky et al., 1995; Thajeb et al., 1997; Kopyov et al., 1997; Kopyov et al., 1998; Rosser et al., 2002; Rosser et al., 2003; Brunet et al., 2003; Negishi et al., 2002). Risulta

quindi estremamente importante, per assicurare il mantenimento della vitalità cellulare, che i protocolli di preparazione siano definiti e riproducibili, anche se ad oggi non è ancora stata ben definita quale sia la migliore condizione di conservazione e di preparazione del tessuto fetale.

Per quanto riguarda l'intervallo tra la raccolta ed il trapianto, sono state utilizzate tre strategie: impianto a fresco, dopo conservazione a breve termine e dopo criopreservazione.

Per l'impianto a fresco è stato suggerito un intervallo ottimale tra il momento della raccolta e l'impianto di circa 2-6 ore, dato che la vitalità cellulare si riduce con il progredire del tempo di conservazione (Brundin et al., 1985). In trapianti effettuati su pazienti affetti da MP, infatti, è stato stimato che solo il 5-10% dei neuroni fetali secernenti dopamina è in grado di sopravvivere per un intervallo di tempo più lungo (Brundin & Björklund, 1987). Sebbene ottimale da un punto di vista della vitalità, l'impianto a fresco presenta lo svantaggio di non rendere sempre possibile effettuare tutti i controlli dello screening pre-impianto del donatore (Thajeb et al., 1997).

Per assicurare un'adeguata vitalità cellulare ed allo stesso tempo superare le problematiche legate all'uso del tessuto fresco, sono state sperimentate metodiche di conservazione a breve termine, la maggior parte delle quali basate sull'uso di un medium di ibernazione costituito da soluzione tampone con elevate concentrazioni di potassio. La maggior parte degli studi riporta la possibilità di conservare in tali condizioni il tessuto fetale tra i 2 e gli 8 giorni. Il protocollo di Rosser e collaboratori (Rosser et al., 2002) prevede la conservazione del tessuto fetale in un medium di ibernazione ad una temperatura di 4°C, per un periodo massimo di 8 giorni, anche se la maggior parte dei loro pazienti è stata sottoposta a trapianto entro 48 ore dalla raccolta. Kopyov (Kopyov et al., 1998) utilizza invece un medium privo di siero, al quale viene aggiunto siero autologo del paziente ad una concentrazione del 5%, 5mmol di 2L-glutammina e 10µg/mL di kanamicina; questa miscela permette di conservare il tessuto striatale fetale a 4°C per 5 giorni, con una vitalità media del 91%.

Studi condotti su modelli animali e successivamente sull'uomo hanno dimostrato anche la possibilità di criopreservare il tessuto cerebrale (Frodl et al., 1995; Negishi et al., 2002, Brunet et al., 2003). Questi studi hanno evidenziato che la vitalità post-scongelo è legata ad una serie di condizioni quali le dimensioni del tessuto criopreservato (piccoli frammenti risultavano in una resa maggiore di cellule vitali), la concentrazione di DMSO (la concentrazione che assicurava un recupero più elevato di

cellule vitali post scongelamento era compresa tra l'8% ed il 10%), la geometria dei criovials utilizzati (provette coniche con filettatura esterna permetterebbero una criopreservazione ottimale ed un omogeneo scongelamento), la temperatura durante la preparazione cellulare dopo scongelamento (Brunet et al., 2003).

Indipendentemente dalla tecnica utilizzata per criopreservare il tessuto cerebrale, comunque questo tipo di procedura comporta una perdita di cellule rispetto al tessuto fresco; alcuni autori hanno ottenuto ad esempio un recupero del 20-30%, con una vitalità dell'84,5% (Negishi et al., 2002). Tuttavia tutti gli studi hanno dimostrato che le colture di cellule cerebrali dopo criopreservazione risultano indistinguibili da quelle a fresco, così come la quantificazione di proteine specifiche, dimostrando che la criopreservazione non influenza la differenziazione neuronale né la formazione di sinapsi in coltura.

Vari studi hanno dimostrato che la vitalità ed i risultati clinici ottenuti dipendono anche da altri parametri, tra cui la modalità di preparazione del tessuto impiantato. Alcuni autori utilizzano metodiche che prevedono l'impianto diretto di piccoli frammenti di tessuto, mentre altri utilizzano sospensioni cellulari ottenute con tecniche di dissociazione meccanica od enzimatica (Rosser et al., 2002; Rosser et al., 2003). La dissociazione meccanica può essere effettuata attraverso la disgregazione del tessuto, precedentemente suddiviso in frammenti, con una pipetta munita di punta sterile, in modo tale da ottenere una sospensione cellulare omogenea. La dissociazione enzimatica può essere invece effettuata mediante incubazione con tripsina e DNAasi. Studi comparativi hanno dimostrato che, nonostante entrambe le tecniche possano determinare danni alla componente cellulare, la dissociazione meccanica comporta una maggiore vitalità (Thajeb et al., 1997). La dissociazione enzimatica con papaina o tripsina, anche se più efficace per l'ottenimento di una sospensione cellulare, comporta anche una digestione enzimatica delle proteine della matrice extracellulare che influenza la vitalità cellulare (Barker et al., 1995).

RICERCHE PERSONALI

MATERIALI E METODI

AUTORIZZAZIONI AL TRAPIANTO

La stesura del progetto sul quale è basata la sperimentazione clinica oggetto della presente tesi risale all'inizio dell'anno 2003. Un lungo iter burocratico durante il quale sono state conseguite tutte le necessarie autorizzazioni (Comitato Etico di Firenze, Centro Nazionale Trapianti, Comitato Nazionale per la Bioetica, Consiglio Superiore di Sanità, Centro Nazionale Trapianti) ha portato alla fine dell'anno 2005 all'approvazione da parte del Ministero della Salute e nel Febbraio 2006 al primo trapianto. Di seguito sono riportati alcuni articoli inclusi in deliberazioni del Comitato Nazionale per la Bioetica, nel Deontologico Medico ed in decreti legislativi inerenti l'utilizzo di cellule staminali e donazione di organi per uso trapiantologico.

Comitato Nazionale per la Bioetica: Identità e statuto dell'embrione umano, 22 giugno 1996.

Il Comitato ne ha dedotto unanimemente una serie di indicazioni circa i trattamenti moralmente illeciti nei confronti degli embrioni umani, a qualunque stadio del loro sviluppo:

- produzione di embrioni a fini sperimentali, commerciali o industriali;
- generazione multipla di esseri umani geneticamente identici mediante fissione gemellare o clonazione;
- creazione di chimere;
- produzione di ibridi uomo-animale;
- trasferimento di embrioni umani in utero animale o viceversa.

Una parte del Comitato ritiene che tale illiceità sussista incondizionatamente anche nei casi seguenti:

- soppressione o manipolazione dannosa di embrioni;
- diagnosi preimpianto finalizzata indiscriminatamente alla soppressione di embrioni;
- formazione in vitro di embrioni di cui non si intenda provvedere all'impianto nell'utero materno.

Il Comitato ha unanimemente ritenuto moralmente leciti:

- eventuali interventi terapeutici in fase sperimentale su embrioni, quando siano finalizzati alla salvaguardia della vita e della salute dei medesimi;

- le sperimentazioni su embrioni morti ottenuti da aborti.

Comitato Nazionale per la Bioetica: impiego terapeutico delle cellule staminali, 27 ottobre 2000.

Il Ministro della Sanità prof. Umberto Veronesi ha ritenuto opportuno nominare una Commissione ad hoc, la cui presidenza è stata affidata al prof. Renato Dulbecco, per valutare gli aspetti scientifici ed etici delle fonti e dell'uso terapeutico delle cellule staminali.

Problemi etici:

17. L'impiego delle cellule staminali umane solleva importanti problemi di natura etica che riguardano essenzialmente l'origine delle cellule ed il modo con cui esse sono derivate. Il fatto che tali cellule vengano oggi isolate da embrioni umani allo stadio di blastocisti (che hanno circa 5 o 6 giorni), oppure da tessuti prelevati da aborti spontanei o causati da interruzioni volontarie di gravidanza, implica che i problemi etici vanno considerati con molta attenzione. Ciò deve avvenire preliminarmente ad ogni discussione scientifica sulle potenzialità terapeutiche della ricerca in questo settore. Se si considera la questione in relazione all'origine delle cellule staminali, è opportuno articolare le argomentazioni a seconda che tali cellule derivino:

1) da embrioni creati specificamente a fini di ricerca scientifica;

18. L'illiceità di creare un embrione in vivo o in vitro per esclusivi fini di ricerca è principio su cui esiste un'ampia convergenza a livello nazionale ed europeo. Più in particolare, il Consiglio d'Europa ha formulato un esplicito divieto in tal senso all'art. 18, comma 2 della Convenzione su diritti umani e biomedicina. Anche il Comitato Nazionale per la Bioetica si è espresso in questo senso e ribadisce tale posizione con le motivazioni precedentemente formulate. Rimangono quindi da argomentare le differenti questioni etiche poste dalle altre procedure per derivare le cellule staminali.

2) da tessuti di feti risultanti da aborto spontaneo o per interruzione volontaria della gravidanza;

19. Sull'impiego di cellule, tessuti e organi del feto non esistono in Italia specifici testi normativi, ma è ben possibile desumere norme in materia da convenzioni internazionali e da altre leggi o regolamenti. Sotto il profilo etico, l'impiego di tessuti di feti abortiti è stato già preso in considerazione dal Comitato Nazionale per la Bioetica in un precedente documento e, in linea di principio, ritenuto lecito, quando sia giustificato da esclusivi fini di studio, di ricerca e di terapia. Peraltro

l'opinione del Comitato Nazionale per la Bioetica è che la decisione di interrompere la gravidanza non può essere condizionata dall'aspettativa di possibili benefici economici e terapeutici derivanti dall'impiego di cellule, tessuti e organi del feto.

Egualemente deve essere esclusa la loro commerciabilità e brevettabilità.

Il Comitato Nazionale per la Bioetica ritiene:

- che l'utilizzo a fini terapeutici di cellule staminali provenienti da tessuti fetali debba avvenire sulla base del consenso informato della donna che ha abortito;
- che si deve trattare di un atto di disposizione libero, gratuito e privo di condizionamenti;
- che i medici che effettuano l'aborto devono essere distinti da quelli che effettuano i prelievi.

Codice di Deontologia Medica, 16 dicembre 2006.

Capo VI: Trapianto Di Organi, Tessuti E Cellule

- Art.40. Donazione di organi, tessuti e cellule. E' compito del medico la promozione della cultura della donazione di organi, tessuti e cellule anche collaborando alla idonea informazione ai cittadini.

- Art.41. Prelievo di organi e tessuti. Il prelievo di organi e tessuti da donatore cadavere a scopo di trapianto terapeutico può essere effettuato solo nelle condizioni e nei modi previsti dalla legge.

D.Lgs. n. 91, 1° aprile 1999. Disposizioni in materia di prelievi e di trapianti di organi e di tessuti.

Art. 1. (*Finalità*). La presente legge disciplina il prelievo di organi e di tessuti da soggetto di cui sia stata accertata la morte ai sensi della legge 29 dicembre 1993, n. 578, e regola le attività di prelievo e di trapianto di tessuti e di espanto e di trapianto di organi.

Art. 18. (*Obblighi del personale impegnato in attività di prelievo e di trapianto*). I medici che effettuano i prelievi e i medici che effettuano i trapianti devono essere diversi da quelli che accertano la morte.

I PAZIENTI

Il trial clinico oggetto della presente tesi ha coinvolto dodici pazienti affetti da MH (geneticamente confermata) con età compresa tra 33 e 53 anni, che avevano firmato il consenso informato alla partecipazione.

Al loro ingresso nello studio tutti i pazienti sono stati sottoposti ad un periodo di osservazione di almeno un anno durante il quale sono state effettuate tutte le valutazioni previste dal protocollo internazionale CAPIT-HD (Core Assessment Protocol For Intra-striatal Transplantation in HD) (Quinn et al., 1996).

Tutti i soggetti presentavano i sintomi clinici della patologia da 5-8 anni, tra i quali corea ed altri sintomi motori oltre che cognitivi e psichiatrici. Essi sono stati sottoposti all'intervento solo quando è stato osservato un marcato peggioramento di tali sintomi durante il periodo di osservazione. Inoltre tutti i pazienti sono stati sottoposti a cura con farmaci antidopaminergici ed antidepressivi, che è rimasta invariata per tutta la durata dello studio tranne che per dieci giorni prima di ogni analisi IBZM-SPECT.

IL TESSUTO FETALE

Il materiale fetale è stato ottenuto da aborti spontanei o terapeutici (legge 194) presso il Dipartimento di Ginecologia, Perinatologia e Riproduzione Umana dell'Università di Firenze, sotto controllo ecografico con tecnica standard di aspirazione.

La nostra attenzione era rivolta a feti di età gestazionale compresa tra le 9 e le 12 settimane. L'età del concepimento è stata confermata mediante la misurazione della lunghezza testa-podice. Le donatrici erano donne maggiorenni che avevano espresso il consenso informato alla donazione. La richiesta alla donazione è stata effettuata dopo l'aborto ed il consenso è stato formulato per iscritto utilizzando specifici moduli. Era esclusa qualunque forma di incentivo o remunerazione economica per la donatrice. Il siero materno è stato testato per una serie di agenti patogeni (HbsAg/Hb Ag HCV, HIV 1-2, HTLV I –II, CMV, toxoplasmosi e TPHA) ed i risultati erano disponibili prima del prelievo del tessuto fetale. Inoltre è stata effettuata un'accurata anamnesi delle donatrici.

Il materiale è stato poi trasportato presso l'unità funzionale di Ematologia dell'Azienda Ospedaliera Universitaria di Careggi (AOUC), struttura certificata alla manipolazione di campioni ad uso trapiantologico. Successivamente, in condizioni di sterilità e sotto cappa a flusso laminare, è stato separato il tessuto striatale, sezionato dal pavimento dei ventricoli laterali in corrispondenza dell'abbozzo ganglionare, lateralmente rispetto ai plessi corioidei. Immediatamente dopo l'isolamento, il tessuto striatale è stato lavato in soluzione fisiologica a 4°C, tagliato in piccoli frammenti e successivamente dissociato utilizzando pipette con punte di diametro decrescente. Questa sospensione cellulare è stata poi risospesa in 500 µl di soluzione fisiologica e dissociata ulteriormente utilizzando una pipetta da 200 µl (Fig.9).

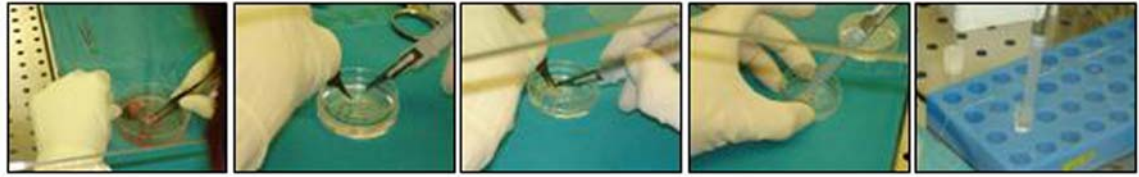


Figura 9. Preparazione del materiale striatale fetale utilizzato per il trapianto.

Una piccola aliquota di questo materiale è stata utilizzata per la valutazione della vitalità cellulare (tramite utilizzo di Trypan Blu e test della 7-Actinomicina D), una seconda aliquota è stata utilizzata per il profilo immunofenotipico del donatore tramite FACS, una terza aliquota per valutazioni morfologiche e biomolecolari ed allestimento di colture cellulari. A questo punto, il materiale è stato inserito in un contenitore sterile e tenuto a 4°C fino al momento in cui è stato trapiantato poche ore più tardi. Il materiale è stato utilizzato solo quando i suddetti test di valutazione della vitalità avevano dato un risultato > dell'85%.

L'aliquota rimasta dopo il trapianto è stata utilizzata per colture volte ad escludere la presenza di eventuali infezioni batteriche (in condizioni aerobiche ed anaerobiche) e per la determinazione del cariotipo.

LA PROCEDURA NEUROCHIRURGICA

Per il trapianto di tessuto striatale è stata utilizzata una procedura stereotassica basata sul rilascio del materiale fetale a livello caudato putaminale in entrambi gli emisferi cerebrali in due distinte sessioni distanti tra loro 2-3 mesi. In tutti i pazienti la prima procedura è stata effettuata a livello del corpo striato dell'emisfero destro. Il giorno dell'intervento ogni paziente è stato sottoposto ad una tomografia computerizzata in stereotassi attraverso la quale, confrontata con un precedente esame di risonanza magnetica, era possibile calcolare le coordinate da utilizzare durante l'intervento per l'ingresso dell'ago neurochirurgico. Il trapianto è stato effettuato in anestesia totale, con procedura robotica (NeuroMate Robotic System, Schaerermayfield, Francia) ed entro 4-6 ore dall'aborto. Il materiale fetale è stato depositato nella testa del nucleo caudato e nel putamen pre e post-commissurale in vari siti (50 µl per ogni deposito) utilizzando un ago collegato ad una siringa Hamilton (Gallina et al., 2008b) (Fig.10).

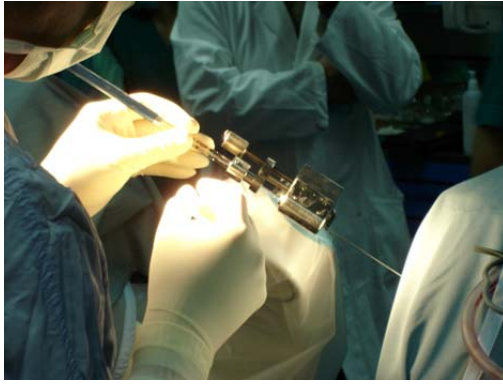


Figura 10. Procedura neurochirurgica.

Ogni paziente è stato sottoposto a profilassi antibiotica con 2 g di cefotaxime e 200 mg di teicoplanina al giorno, che si è protratta dal giorno prima dell'intervento e per sei giorni; il giorno dell'intervento inoltre è stata somministrata una singola dose di fluoconazolo 400 mg.

IMAGING

Tutte le analisi di risonanza magnetica (MRI) sono state effettuate con il paziente che respirava spontaneamente, lievemente sedato ed in un'unità da 1.5T (Siemens Symphony, Siemens, Monaco, Germania).

Il protocollo includeva acquisizioni assiali e coronali con sequenze fast spin eco T2 (TR 4490 ms, TE 120 ms), coronali con sequenze inversion recovery fast spin eco T1 (TR 3000 ms, TI 400 ms, TE 28 ms) e assiali con FLAIR (TR 5000 ms TI 1500 ms TE 60 ms); tutte le immagini sono state acquisite con uno spessore di 5 mm. Inoltre, sequenze 3D T1 MPRAGE (TR 2100 ms TI 1000 ms TE 4.4 ms) con uno spessore di 1 mm ed una matrice di 256x256 sono state ottenute dopo somministrazione endovenosa di Gadolinio chelato (0.1 mmol/kg) per la co-registrazione con la tomografia computerizzata per il calcolo delle traiettorie dell'ago durante l'intervento. L'imaging del tensore di diffusione (DTI) è stata effettuata utilizzando una sequenza di acquisizioni eco-planari: TR 10400, TE 113, matrice 128x128, spessore della sezione di 3 mm con gradienti di diffusione applicati in dodici direzioni. La trattografia delle fibre è stata ottenuta utilizzando un DTI software (MedINRIA, Francia).

Studi di PET (Positron Emission Tomography) sono stati effettuati tramite un Advance scanner (GE Healthcare, Milano, Italia) utilizzando ¹⁸F-fluorodeossiglucosio (FDG) come tracciante, in una risoluzione assiale planare di 4,6 mm e spessore di 4,25 mm. La testa di ogni paziente è stata posizionata usando due raggi laser ortogonali e le immagini

sono state acquisite con uno scanner inclinato di -25° rispetto al piano cantomeatale. Per ridurre i movimenti della testa durante le scansioni i pazienti hanno indossato un casco in plastica confezionato su misura. L'acquisizione delle immagini PET è stata effettuata circa 35 minuti dopo la somministrazione endovenosa di ^{18}F -FDG (110-370 MBq) ed è durata per 20 minuti. Le immagini sono state ricostruite utilizzando il filtro Hanning con una frequenza di cut off di 5 cicli/pixel e ridimensionate usando uno schema di estrapolazione bilineare a matrice di 256×256 con una grandezza di pixel di 1,52 mm e uno spessore delle sezioni di 4,25 mm.

Scansioni IBZM-SPECT (^{123}I -iodobenzamide single photon emission computed tomography) sono state effettuate 90 minuti dopo la somministrazione endovenosa di ^{123}I -IBZM (185 MBq) con una fotocamera (IRIX, Philips Medical System) equipaggiata con collimatori UHR. Le immagini sono state acquisite su 360° (120 angoli, matrice 128×128) con un tempo di scansione di 45 secondi/step. Le immagini sono state ricostruite utilizzando un algoritmo FBP e corrette per l'attenuazione con un algoritmo Chang ($\mu=0.12 \text{ cm}^{-1}$).

ANALISI IMMUNOGENETICA

I test di istocompatibilità tra donatore e paziente sono stati effettuati su antigeni HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 utilizzando la tipizzazione del DNA e le tecniche CDC, ELISA e Luminex sia prima dell'intervento che dopo 3, 6, 9, 12, 18 mesi dopo il trapianto, e successivamente ogni anno.

TIPIZZAZIONE HLA. La tipizzazione di HLA-A, -B, -DRB1 è stata effettuata utilizzando DNA estratto dal sangue periferico dei pazienti o dal tessuto fetale, amplificato tramite PCR e successivamente ibridizzato con sonde sequenza-specifiche secondo le istruzioni del kit (INNO-LiPA, Innogenetics, Gent, Belgio) utilizzando uno strumento Auto-LiPA (Innogenetics). I risultati ottenuti sono stati analizzati utilizzando una versione adattata ai trials clinici del software LiRAS (Innogenetics).

RICERCA DI ANTICORPI HLA I E II CONTRO GLI ANTIGENI FETALI. Il siero dei pazienti è stato analizzato sia prima che dopo l'intervento per la presenza di alloanticorpi anti-HLA di classe I utilizzando il test della tossicità complemento-dipendente (CDC) (Lymphoscreen HLA-ABC 60, Biotest Italia s.r.l., Milano, Italia) e di alloanticorpi anti-HLA di classe I e II utilizzando il test ELISA (Mixed LATTM, One Lambda, Montpellier, Francia), seguendo le istruzioni del manuale. Inoltre la specificità degli anticorpi HLA I e II è stata determinata tramite il test Luminex (Luminex Corp.,

Austin, TX, USA), quantificata con l'analizzatore di flusso LABScan™ 100 (One Lambda) ed elaborata con il software One Lambda (LABScreen306).

REAL TIME RT-PCR

Estrazione dell'RNA e sintesi del DNA. L'RNA totale è stato isolato dal tessuto striatale fetale mediante "RNeasy Micro kit" (Quiagen, Milano, Italia), secondo le istruzioni del manuale. La concentrazione e la purezza dell'RNA sono state controllate spettrofotometricamente. Successivamente l'RNA è stato retrotrascritto utilizzando il kit "Taqman Reverse Transcription Reagents" (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in un volume finale di 20 µl; il mix di reazione conteneva: tampone 1X, MgCl₂ 5.5 mM, dNTP 2 mM, esameri random 2.5 µM, inibitori di RNAasi 0.4 U/µl, Trascrittasi Inversa 1.25 U/µl. La reazione è stata portata avanti nelle seguenti condizioni: 25°C per 10 minuti, 48°C per 30 minuti e 95°C per 2 minuti.

Real Time RT-PCR. L'espressione dell'mRNA è stata valutata mediante real time RT-PCR basata sull'uso di sonde Taqman, che presentano sequenze omologhe alla regione di amplificazione compresa tra i due primers del gene da analizzare. I reagenti sono stati acquistati da Applied Biosystems come kit già pronti per la valutazione dell'espressione dei seguenti geni: Nanog (Hs02387400_g1), CD15 (Hs00275643_s1), Nestina (Hs00707120_s1), CD133 (Hs00195682_m1), CD90 (Hs00174816_m1), CD44 (Hs00153304_m1), β-Tubulina III (Hs00801390_s1), CD117 (Hs00174029_m1), GFAP (Hs00157674_m1), D1R (Hs00265245_s1), D2R (Hs00241436_m1), GAD1 (Hs00247564_m1), CALB1 (Hs00191821_m1), DARPP32 (Hs00259967_m1), AchE (Hs00241307_m1), CNTF (Hs00173456_m1), GDNF (Hs00181185_m1), p75 (Hs00609976_m1), BDNF (Hs00380947_m1), Htt (Hs00918174_m1), TrkB (Hs00178811_m1). La PCR è stata effettuata in un volume totale di 12.5 µl contenente 6.25 µl di Universal Master Mix (Applied Biosystems), 0.625 µl di sonde e primers specifici per ogni gene (Applied Biosystems) e 2.5 µl di cDNA. La reazione è stata portata avanti nelle seguenti condizioni: 50 °C per 2 minuti, 95°C per 10 minuti e 45 cicli di un protocollo di amplificazione di 95°C per 15 secondi e 60°C per 1 minuto. Tutti i campioni sono stati analizzati in triplicato. L'analisi dell'espressione genica è stata ottenuta mediante il metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001) normalizzando i valori sull'espressione del gene housekeeping GAPDH. I dati ottenuti sono stati espressi come media ± deviazione standard (SD). Per la valutazione statistica è stato utilizzato il

T-Test per dati non appaiati ed un valore di $p < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo.

IMMUNOCITOCHIMICA

L'immunocitochimica è stata effettuata su alcune gocce di sospensione cellulare ottenute dalla dissociazione meccanica del corpo striatale fetale e su colture cellulari primarie di nucleo caudato fetale di 9,6 settimane di gestazione.

La sospensione cellulare di tessuto striatale, una volta asciugata a temperatura ambiente, è stata fissata in paraformaldeide 3,7% per 10 minuti, sciacquata in PBS ed incubata con PBS contenente 1% BSA per 15 minuti a temperatura ambiente. Successivamente i vetrini sono stati incubati per tutta la notte a 4°C con i seguenti anticorpi primari: anticorpo monoclonale anti-GFAP 1:200 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anticorpo monoclonale anti-nestina 1:200 e anticorpo policlonale anti-GAD1 1:200 (Chemicon International, Temecula, CA, USA).

Le colture cellulari, dopo essere state fissate, sono state incubate con i seguenti anticorpi primari: anticorpo monoclonale anti-GFAP 1:200, anticorpo monoclonale anti-nestina 1:200, anticorpo policlonale anti-GAD1 1:200, anticorpo monoclonale anti-RhoA 1:100 (Santa Cruz Biotechnology), anticorpo monoclonale anti-GAP43 1:20 (Novocastra, Leica microsystems GmbH, Mannheim, Germania).

I vetrini sono stati successivamente incubati per 1 ora a temperatura ambiente con i seguenti anticorpi secondari fluorescenti: IgG (H+L) monoclonale coniugata ad Alexa Fluor® 488 1:200 o IgG (H+L) policlonale coniugata ad Alexa Fluor® 488 1:200 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). La membrana plasmatica delle cellule è stata marcata con la lectina rodaminata Wheat Germ Agglutinin 1:250 (Vector Laboratories Inc., Peterborough, U.K.) incubata per 15 minuti prima della fissazione. Il citoscheletro actinico è stato marcato con falloidina rodaminata 1:40 (Chemicon International) dopo fissazione in paraformaldeide 2% per 10 minuti seguita da acetone freddo (-20°C) per 10 minuti. La fluorescenza è stata acquisita mediante un microscopio confocale laser Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Mannheim, Germania).

WESTERN BLOTTING

Il materiale fetale è stato lisato in tampone a 4°C (50mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 0,25% SDS) con aggiunta di un cocktail di inibitori di proteasi al momento dell'uso (Sigma-Aldrich, Sant Louis, MO, USA) e

centrifugato per 15 minuti a 10,000g a 4°C. È stato recuperato il soprannatante del quale sono state dosate le proteine utilizzando il metodo Bradford (Blue Coomassie G 250 in soluzione acido/alcolica, Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Per la separazione del citosol e delle membrane, invece, le cellule, piastrate in piastre da 100 mm di diametro, sono state raccolte in tripsina e processate con ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit (Calbiochem, Merck Chemicals Ltd., Nottingham, U.K.) seguendo le specifiche del manuale.

Aliquote contenenti 20 µg di proteine sono state diluite con tampone Laemli 4X (Tris-HCl 252 mM, glicerolo 40%, SDS 20%, blu di bromofenolo 0.01%, β-mercaptoetanolo 20%).

Il mezzo condizionato di cellule di controllo e cellule trattate con BDNF (1ml) è stato raccolto e concentrato 20 volte tramite centrifugazione su filtri con cut off di 10 kDa. 15 µl di questa soluzione sono stati diluiti con tampone di Laemli 4x.

I lisati proteici ed i mezzi condizionati, denaturati a 100°C per 5 minuti, sono stati poi separati mediante elettroforesi SDS-PAGE su gel di poliacrilammide al 10% e 15%. La corsa elettroforetica è stata eseguita in un'opportuna soluzione tampone (Tris-HCl 25 mM, glicina 0,2 M) per circa 1 h e 30 minuti, applicando un voltaggio costante di 130 V. Terminata la corsa, le proteine separate elettroforeticamente sono state trasferite dal gel su membrane di PVDF (polivinilidene difluoride) (Hybond-P, Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, USA) sotto un campo elettrico di 100V per un ora in un'apposita soluzione tampone (Tris-HCl 24 mM, glicina 192 mM, metanolo 10%). Per ridurre il legame degli anticorpi a siti aspecifici, le membrane sono state poi saturate per 1 h a temperatura ambiente con un tampone Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM contenente lo 0,1% di Tween 20 (TTBS, pH 7,5) e l'1% di BSA. Successivamente le membrane sono state incubate per tutta la notte con l'anticorpo primario diluito in TTBS (anticorpo monoclonale anti-nestina 1:1000 e anticorpo policlonale anti-GAD1 1:2000, Chemicon; anticorpo monoclonale anti-GFAP 1:2000, anticorpo monoclonale anti-β actina 1:2000 e anticorpo monoclonale anti-RhoA 1:500, Santa Cruz Biotechnology; anticorpo policlonale anti-MMP-2 1:1000 ed anticorpo policlonale anti-MMP-9 1:1000, Biomol International, Vinci-Biochem, Vinci, Firenze, Italia). Il giorno seguente le membrane sono state lavate tre volte per 5 minuti con TTBS e sono state incubate con anticorpo secondario monoclonale o policlonale coniugati a perossidasi (1:5000, Santa Cruz Biotechnology) per 1 ora. Successivamente la membrana è stata lavata per 3 volte per 5 minuti con TTBS ed una volta per 10 minuti con TBS. La

membrana è stata sviluppata con il reattivo ECL (Amersham Bioscience) per circa 5 minuti. La chemiluminescenza risultante è stata acquisita con il software Quantity One su uno strumento ChemiDoc XRS (Bio-Rad).

ALLESTIMENTO DI COLTURE PRIMARIE

Il tessuto striatale fetale, isolato in condizioni di sterilità da feti di 9-12 settimane di gestazione, è stato lavato più volte in PBS sterile a 4°C ed incubato con collagenasi di tipo I 2 mg/ml per 15 minuti a 37°C. Dopo l'incubazione il materiale è stato frammentato con una pipetta da 200 µl e centrifugato a 1200 rpm per 5 minuti. Il pellet è stato quindi risospeso in terreno Coon's F12 supplementato con 10% FBS, 2 mM glutammina, 100 U/ml penicillina e 100 µg/ml streptomicina, piastrato in una piastra petri da 100 mm di diametro e mantenuto a 37°C in atmosfera umidificata (95% aria e 5% CO₂). Le cellule sono state mantenute in terreno Coon's F12 supplementato con 10% FBS, 2 mM glutammina, 100 U/ml penicillina e 100 µg/ml streptomicina e staccate dalla piastra con utilizzo di tripsina 0,05% e EDTA 0,02% in PBS quando subconfluenti.

Per gli esperimenti della presente tesi è stata utilizzata esclusivamente una coltura primaria ottenuta da tessuto striatale fetale di 9,6 settimane di gestazione. Per effettuare i trattamenti sono state piastrate circa 10⁵ cellule per pozzetto in multiwell da 6 oppure 4x10⁵ cellule in piastre da 100 mm di diametro; il giorno dopo sono state incubate in solo terreno di starvazione (Coon's F12 supplementato 2 mM glutammina, 100 U/ml penicillina e 100 µg/ml streptomicina) o in terreno contenente 50 ng/ml di BDNF (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) per 18 ore. Successivamente le cellule sono state processate per immunocitochimica, western blotting e zimografia.

SAGGI DI MIGRAZIONE SU MATRIGEL

I saggi di migrazione sono stati effettuati con camere di Boyden modificate (Nucleopore Inc., Pleasanton, CA, USA) fornite di filtri di 13 mm di diametro e con pori di 8 µm di policarbonato privo di polivinilpirrolidone. I filtri sono stati ricoperti con collagene umano di tipo I 20 µg/ml (Sigma-Aldrich) per 30 minuti a 37°C. Colture primarie di nucleo caudato fetale sono state piastrate sui filtri (4x10⁴ cellule per ogni camera di Boyden). Nel compartimento inferiore della camera di Boyden è stato inserito terreno senza siero (controllo) o terreno senza siero contenente 50 ng/ml di BDNF. Le camere di Boyden sono state poi incubate per 18 ore a 37°C in 5% CO₂. Dopo l'incubazione le

cellule migrate dall'altra parte del filtro, verso il compartimento inferiore della camera, sono state fissate in 96% metanolo e colorate con ematossilina di Harris. L'esperimento è stato effettuato in triplicato e la chemiotassi è stata valutata contando il numero di cellule migrate in 10 campi per ogni filtro.

ZIMOGRAFIA

Il mezzo condizionato di colture primarie di nucleo caudato fetale di 9,6 settimane di gestazione, piastrate in multiwell da 6 rivestiti di matrigel 20 µg/ml e contenenti terreno senza siero o terreno senza siero supplementato con 50 ng/ml di BDNF, è stato raccolto dopo 18 ore di trattamento, è stato concentrato 20 volte mediante centrifugazione su filtri con cut off di 10 kDa ed è stato utilizzato per valutare l'attività delle gelatinasi Metalloproteasi-2 (MMP-2) e Metalloproteasi-9 (MMP-9) tramite zimografia. 15 µl di tale soluzione sono stati diluiti in tampone 4X (Tris HCl 252 mM, Glicerolo 40%, SDS 20%, blu di bromofenolo 0.01%) ed applicati su un gel di poliacrilammide all'8% contenente 0.1% di gelatina in presenza di SDS. Dopo l'elettroforesi i gel sono stati lavati due volte per 15 minuti in 2.5% di Triton X-100 ed incubati per tutta la notte a 37°C in 50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, pH 7.4. Successivamente i gels sono stati colorati per 30 minuti in una soluzione costituita da 30% metanolo, 10% acido acetico, 0.5% Coomassie Brilliant Blue R-250 e decolorati in una soluzione composta da 30% metanolo e 10% acido acetico. A questo punto erano visibili delle bande chiare su sfondo scuro che rappresentavano le aree di gelatinolisi e quindi corrispondevano all'attività delle gelatinasi. Nel gel è stato caricato anche un pozzetto contenente il mezzo condizionato di cellule di fibrosarcoma umano HT-1080 come controllo positivo dell'attività di MMP-2 e MMP-9.

RISULTATI

RISULTATI PRELIMINARI AL TRAPIANTO

PREPARAZIONE DEL TESSUTO STRIATALE FETALE

Al fine di ottimizzare la modalità di preparazione e conservazione del tessuto fetale, sono stati analizzati 9 campioni di striato appartenenti a feti di età gestazionale compresa tra le 9 e le 12 settimane. Il tessuto striatale è stato suddiviso in tre parti e processato a fresco, dopo conservazione a breve termine a 4°C, oppure criopreservato in azoto liquido. In particolare per la valutazione a fresco il tessuto, immediatamente dopo dissociazione meccanica, è stato sottoposto a test di vitalità (Trypan Blu e test della 7-Actinomicina D). Per la conservazione a breve termine i test sono stati effettuati dopo la suddivisione del tessuto in frammenti di circa 1 mm³ e la conservazione per cinque giorni a 4°C in tampone Hank's supplementato con 5% di albumina. Per la crioconservazione frammenti di circa 1 mm³ sono stati immersi in tampone Hank's + 10% albumina + 10% DMSO, criopreservati in vapori di azoto liquido ad una temperatura inferiore a -140°C per almeno 10 giorni e poi sottoposti alle suddette valutazioni.

I test di vitalità hanno dimostrato che dal tessuto processato a fresco si ottenevano sempre valori superiori all' 80% (tra 85% ed il 97%). Per quanto riguarda le altre due preparazioni, invece, il range di vitalità variava tra il 65% ed il 90%. Dati questi risultati, abbiamo deciso di utilizzare per il trapianto esclusivamente tessuto striatale fetale fresco, poichè la vitalità risultava maggiore e meno variabile rispetto alle altre modalità di preparazione.

Per caratterizzare il tessuto striatale fetale ed escludere contaminazioni di altre popolazioni cellulari, ogni campione è stato sottoposto a valutazione immunofenotipica tramite citofluorimetria a flusso (FACS) (Urbani et al., 2006). In particolare è stata valutata l'espressione proteica di CD45 (marker di cellule ematopoietiche), CD133 (marker di cellule staminali), CD271, CD90 e CD166 (markers neuronali) (Sato et al., 2002; Pruszek et al., 2007; Kuçi et al., 2009). Il CD45 risultava espresso in basse percentuali in tutti i campioni analizzati, confermando l'assenza di contaminazioni da parte di cellule ematopoietiche. Il CD133 ed i markers di cellule nervose, invece, erano sempre abbondantemente espressi, ad indicare sia la presenza di una parte di cellule staminali che un fenotipo commissionato in senso nervoso (Tab.1).

CD 45	CD 90	CD 133	CD 271	CD 166
0,4	97,0	69,0	93,0	85,0

Tabella 1. Espressione percentuale di alcuni antigeni di membrana in tessuto striatale fetale di 10,3 settimane di gestazione valutata tramite FACS.

CARATTERIZZAZIONE DEL TESSUTO STRIATALE FETALE

Per la caratterizzazione del tessuto striatale fetale sono state effettuate valutazioni di real time RT-PCR, immunocitochimica e western blotting.

Tramite real time RT-PCR è stata dosata l'espressione di un pannello di 21 geni nel tessuto striatale fetale (riportati nel grafico i valori di un feto di 10,3 settimane di gestazione) e nel nucleo caudato di un individuo adulto sano di 33 anni morto per cause accidentali. I geni sono stati suddivisi in tre gruppi in base alla loro funzione. Nel primo gruppo sono stati riuniti markers di cellule staminali e precursori di cellule nervose, come nanog, CD15, nestina, CD133 e CD117, ma anche markers di cellule già commissionate in senso neuronale (β tubulina III) oppure gliale (GFAP) (Pruszek et al., 2009; Dunnet & Rosser, 2007b; Ko et al., 2005; De Coppi et al., 2007). Da notare che tutti i geni venivano espressi sia nel tessuto fetale che in quello adulto, tuttavia i markers associati ad un fenotipo cellulare più immaturo venivano espressi maggiormente nel tessuto fetale (Fig.11a). Nel secondo gruppo sono stati riuniti geni riconducibili ad un differenziamento cellulare in senso striatale, tra i quali i recettori della dopamina D1 e D2, GAD1 (Glutammato decarbossilasi 1, enzima fondamentale per la sintesi del neurotrasmettitore GABA) e AchE (acetilcolina esterasi, proteina implicata nella degradazione dell'acetilcolina a livello sinaptico) oltre che calbindina 1 e DARPP-32 (dopamine and cyclic AMP-associated receptor phosphoprotein, marker specifico dai neuroni a spine medie), caratteristici markers di neuroni striatali. Il tessuto fetale esprimeva tutti questi geni indicando quindi un corretto commissionamento cellulare (fig.11b). Nel terzo gruppo sono stati riuniti geni coinvolti nella sopravvivenza e differenziamento neuronale; tra essi i fattori di crescita CNTF, GDNF e BDNF, i recettori del BDNF (il recettore ad alta affinità TrkB e quello a bassa affinità p75) e la proteina huntingtina, la cui funzione è alterata nella MH (Fig.11c).

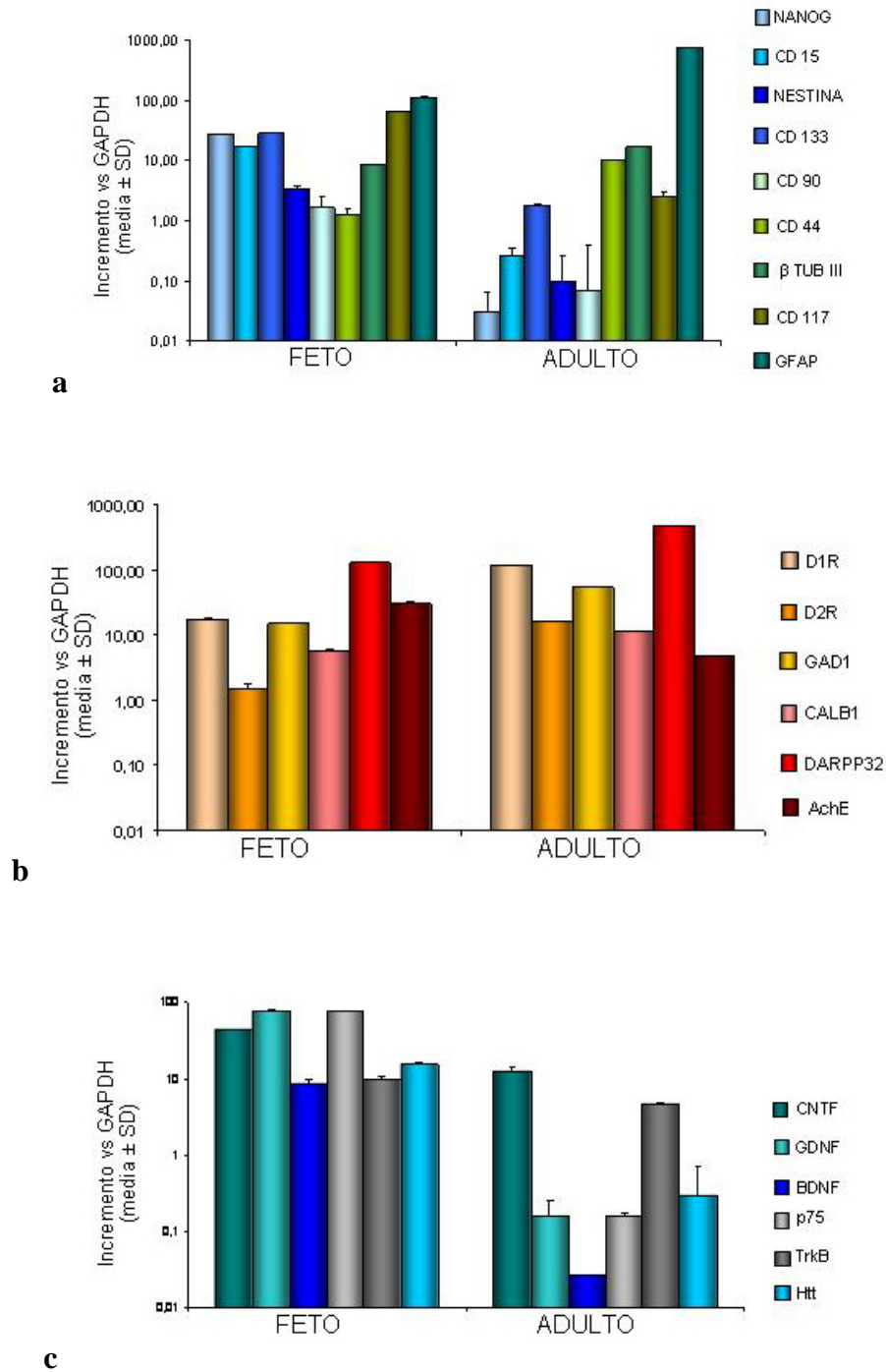


Figura 11. Espressione genica in tessuto striatale fetale di 10,3 settimane di gestazione e nel nucleo caudato di un individuo adulto, normalizzata rispetto al gene housekeeping GAPDH. I geni sono stati suddivisi in tre gruppi in base alla loro funzione: a) markers di cellule staminali e precursori di cellule nervose, b) markers di differenziamento in senso striatale, c) geni coinvolti nel mantenimento delle cellule nervose.

Utilizzando tecniche di immunofluorescenza abbiamo confermato la presenza di alcuni markers citoplasmatici di cellule neuronali e gliali. In particolare la sospensione cellulare, ottenuta dalla dissociazione delle eminenze ganglionari di feti di 9-12 settimane di gestazione, esprimeva la proteina citoscheletrica nestina, l'enzima GAD1 e la proteina citoscheletrica GFAP (Glio-fibrillary acid protein) (Fig.12).

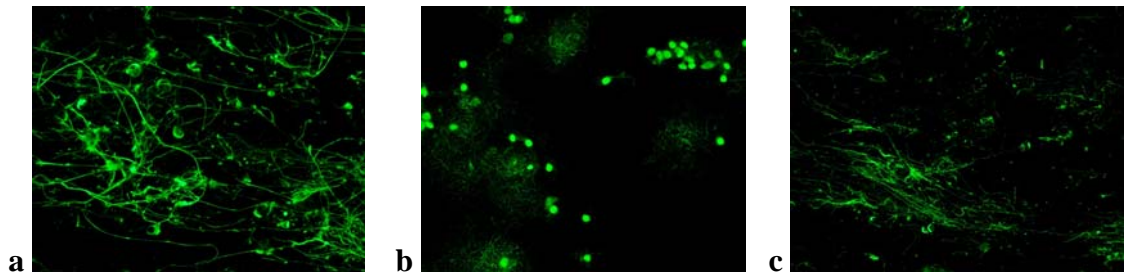


Figura 12. Immagine rappresentativa dell'immunopositività del tessuto striatale fetale di 9-12 settimane per nestina (a), GAD1 (b) e GFAP (c) (obiettivo x20).

Esperimenti di western blotting, effettuati su sospensioni cellulari ottenute da tessuto striatale fetale, hanno confermato l'espressione proteica di nestina, GAD1 e GFAP e la migrazione su gel di poliacrilammide in corrispondenza dei pesi molecolari appropriati (200-220 kDa, 65-67 kDa e 50 kDa, rispettivamente). In figura 13 l'espressione di tali markers nel tessuto fetale è stata confrontata con quella presente in un tessuto adulto sano utilizzato come controllo. Si può notare che nel feto la proteina nestina, marker di cellula nervosa non ancora matura, veniva espressa in maniera significativa, mentre nel tessuto adulto risultava praticamente assente. Per quanto riguarda GAD1 e GFAP si può notare che erano maggiormente espressi nel tessuto adulto. La loro presenza a livello fetale dimostrava ancora una volta come in questo tessuto fosse già presente un commissionamento delle cellule in senso neuronale o gliale.

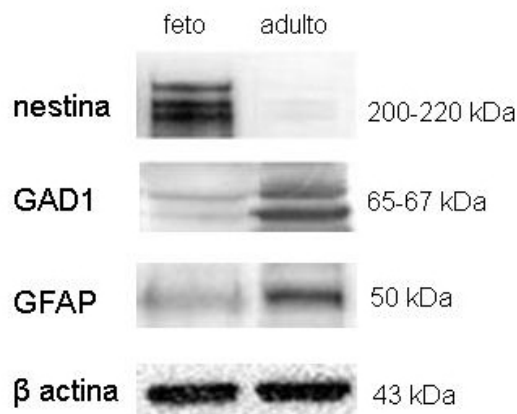


Figura 13. Immagine rappresentativa dell'espressione proteica di nestina, GAD1 e GFAP in tessuto fetale di 9-12 settimane di gestazione e nel nucleo caudato di un adulto sano, valutata tramite western blotting. L'anticorpo β actina è stato utilizzato per la normalizzazione del segnale.

IL TRAPIANTO

A tutt'oggi il nostro protocollo di lavoro ha coinvolto 12 pazienti affetti da MH, sottoposti bilateralmente a trapianto caudato putaminale di tessuto striatale fetale. In questo studio sono stati descritti i risultati ottenuti in quattro pazienti. Si tratta di soggetti (due maschi e due femmine) di età compresa tra i 33 ed i 53 anni i cui profili clinici sono riassunti in tabella 2.

Paziente	Sesso	Ripetiz CAG	Età di inserimento nel trial	Durata malattia (anni)	Età di insorgenza dei sintomi motori	Età di insorgenza dei sintomi psichiatrici
1	M	21 - 57	33	8	23 disartria	25 disturbi della memoria.
2	F	18 - 42	51	6	45 coreoatetosi orofaciale	42 disordine ossessivo compulsivo
3	M	20 - 47	53	5	49 distonia, corea faciale	44 disturbi della memoria, depressione
4	F	24 - 49	39	7	28 disgrafia	30 disturbi della memoria, depressione

Tabella 2. Profilo clinico dei pazienti.

Il tempo di follow up relativo ai quattro pazienti descritti è compreso tra i 18 ed i 34 mesi; gli interventi non hanno mai mostrato alcuna complicazione. Il paziente 4 ha sviluppato un ascesso come conseguenza dell'immunosoppressione, ma non sono stati tuttavia osservati ulteriori eventi avversi.

Nella seguente tabella sono inoltre riportate le caratteristiche dei donatori fetali per ognuno dei pazienti esaminati (Tab.3).

PROPRIETA' DEI DONATORI	Paziente 1		Paziente 2		Paziente 3		Paziente 4	
	destra	sinistra	destra	sinistra	destra	sinistra	destra	sinistra
numero di feti	1	1	1	1	1	1	1	1
età dei feti (settimane)	12	11,1	12	10,1	10,5	11,6	9	9,3
volume di infusione (µl)	350	350	400	400	450	500	250	200
vitalità (%)	90	93	92	94	95	91	90,5	90

Tabella 3. Proprietà dei donatori fetali: numero di feti per ogni trapianto, età gestazione di ogni donatore, volume di infusione e vitalità della sospensione cellulare utilizzata per l'intervento.

RISULTATI CLINICI

Il paziente 1 ha dimostrato un progressivo miglioramento dell'attenzione e della memoria a partire dal sesto mese dopo il trapianto. Per quanto riguarda i sintomi motori, è stata osservata una stabilizzazione già 24h dopo l'intervento, associata ad una riduzione della distonia e della disartria, ed un miglioramento nella deambulazione e nella postura (Tab.4).

Il paziente 2 ha mostrato una evidente riduzione dei movimenti coreici nella parte del corpo controlaterale rispetto all'emisfero interessato dal trapianto ed un miglioramento dal punto di vista cognitivo nei due mesi successivi. A 18 mesi dall'intervento sia i sintomi motori che quelli cognitivi sono risultati marcatamente ridotti (Tab.4).

Il paziente 3, 18 mesi dopo l'intervento, ha mostrato una marcata riduzione dei movimenti involontari della parte controlaterale del corpo e nel distretto orofaciale. Il paziente ha sviluppato depressione e dimagrimento 8 mesi dopo il trapianto, come conseguenza dello scarso rispetto della terapia farmacologica proposta; successivamente, con l'istituzione di un'adeguata assistenza, ha mostrato un miglioramento generalizzato a livello psicologico e motorio (Tab.4).

Il paziente 4 si è mostrato neurologicamente stabile per 20 mesi dopo l'intervento. Un mese più tardi ha mostrato febbre, perdita di peso e peggioramento della corea a causa di un ascesso alla coscia sinistra, che risolto chirurgicamente ha ristabilito le precedenti condizioni (Tab.4). A 34 mesi dall'intervento il paziente ha mostrato riduzione della corea e miglioramento delle capacità cognitive, anche se accompagnati da peggioramento della distonia del tronco e della deambulazione.

Pazienti	Score motorio				Score comportamentale				Score funzionale			
	Pre	3m	12m	24m	Pre	3m	12m	24m	Pre	3m	12m	24m
1	71	71	67	67	0	4	2	4	13	11	4	8
2	75	71	68	73	16	11	13	4	1	5	1	1
3	42	32	30		11	10	2		18	18	14	
4	68	73	66	66	16	8	11	21	7	6	8	0

Tabella 4. Score UHDRS (Unified Huntington's Disease Rating Scale). pre= fino ad una settimana prima dell'intervento, m= mesi. Dal punto di vista motorio e comportamentale un aumento dello score indica il peggioramento dei sintomi. Dal punto di vista funzionale una diminuzione dello score indica il peggioramento dei sintomi.

IMAGING

Le analisi MRI effettuate 3-7 giorni dopo ciascun intervento hanno mostrato la mancanza di complicazioni. Le tracce stereotassiche dell'ago neurochirurgico hanno seguito le prestabilite traiettorie e sono visibili nelle immagini MRI come linee di segnale ipointenso (Fig.14A-b). I graft di tessuto trapiantato sono invece risultati nelle immagini T2 come aree con intensità intermedia di segnale a livello delle regioni target (Fig.14B-a). A partire dal quarto mese dopo l'intervento è stata osservata in 6 degli 8 casi la crescita macroscopica di strutture di tessuto neo-generato, mentre negli altri due casi non sono stati osservati cambiamenti, se non quelli correlati al passaggio dell'ago neurochirurgico.

Nel paziente 1 il primo graft (emisfero di destra) non è cresciuto, mentre il secondo ha dato luogo ad una struttura ovoidale a livello della testa del nucleo caudato, del putamen pre-commissurale e del nucleo accumbens, separati da una sottile lamina di sostanza bianca (Fig.14). In particolare, ricostruzioni RMN 3D hanno mostrato che 6 giorni dopo l'intervento (Fig.14A-b) era presente un segnale ipointenso dovuto al passaggio dell'ago neurochirurgico diretto verso il nucleo caudato (freccia gialla tratteggiata) ed il putamen (freccia gialla), mentre 22 mesi dopo l'intervento (Fig.14A-c) era presente tessuto neo-generato a livello del nucleo caudato (freccia gialla tratteggiata) e del putamen pre-commissurale (freccia gialla). Il nuovo tessuto era cresciuto anche nella sostanza grigia del lobo frontale e connetteva, seguendo la traccia neurochirurgica, lo striato con la corteccia (Fig.14A-c, freccia bianca); una nuova struttura è stata evidenziata anche a livello dello striato ventrale nel nucleo accumbens (Fig.14A-c, freccia blu). La trattografia, ottenuta 22 mesi dopo il trapianto, ha mostrato lo spostamento posteriore del tratto cortico-pontino ad opera del tessuto neo-generato, senza tuttavia infiltrazione e distorsione anatomica (Fig.14A-d). Immagini RM T2 hanno indicato, 6 giorni dopo il trapianto di sinistra, iperintensità del segnale in corrispondenza del sito di deposito del materiale fetale (Fig.14B-a, freccia gialla); 24 mesi dopo il trapianto di destra e 22 dopo quello di sinistra nel putamen di destra il segnale era analogo a quello precedente al trapianto (Fig.14B-b), tranne che in una piccola area iperintensa corrispondente al sito di deposito del materiale (freccia rossa); nel caudato (freccia gialla tratteggiata) e nel putamen (freccia gialla) di sinistra era presente tessuto neo-generato che si estendeva verso la corteccia (freccia bianca) ed il nucleo accumbens (freccia blu). Nelle immagini ¹⁸FDG-PET ottenute prima dell'intervento (Fig.14C-a) e 6 mesi dopo l'intervento di destra e 4 dopo quello di sinistra (Fig.14C-b) era evidente un marcato ipometabolismo.

Dodici mesi dopo il trapianto di destra è stato osservato un aumento del metabolismo nel caudato e nel putamen di sinistra (Fig.14C-c), che persisteva anche dopo 18 mesi (Fig.14C-d).

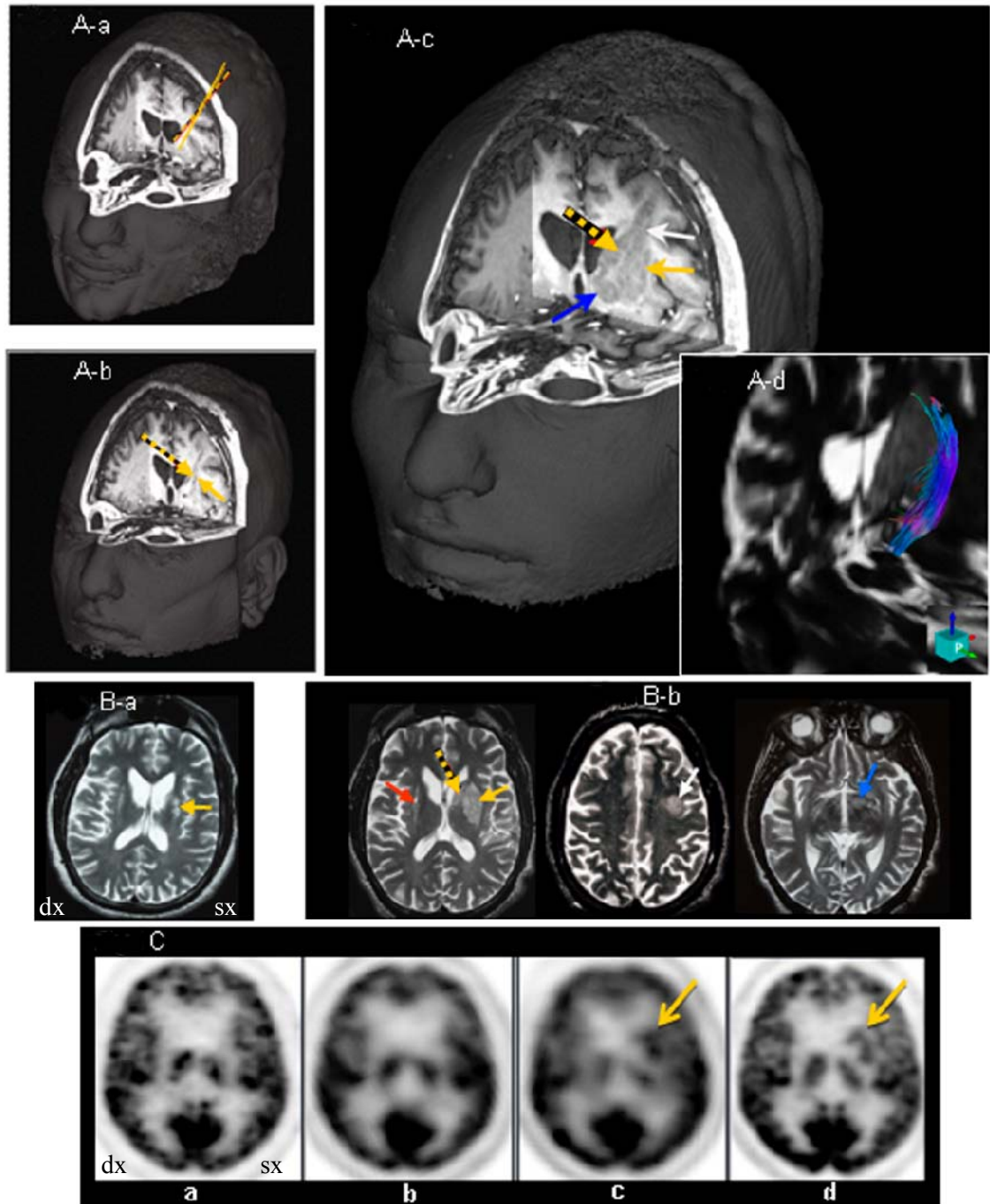


Figura 14. Imaging del paziente 1. A) Ricostruzione RMN 3D: a) pianificazione delle tracce stereotassiche prima dell'intervento, b) immagine ottenuta 6 giorni dopo l'intervento di sinistra, c) immagine ottenuta 22 mesi dopo l'intervento di sinistra, d) trattografia ottenuta 22 mesi dopo il trapianto di sinistra. B) Immagini RM T2: a) 6 giorni dopo il trapianto di sinistra, b) 24 mesi dopo il trapianto di destra e 22 dopo quello di sinistra. C) Immagini ^{18}F FDG-PET: a) prima dell'intervento, b) 4 mesi dopo l'intervento di sinistra, c) 10 mesi dopo il trapianto di sinistra, d) 16 mesi dopo il trapianto di sinistra.

Nel paziente 2 invece i grafts trapiantati sono cresciuti bilateralmente: nell'emisfero di destra il tessuto neo-generato si è mantenuto entro i limiti anatomici dello striato, mentre a sinistra ha dato luogo ad una massa circolare, sporgente nel ventricolo, nella quale non era presente una separazione tra nucleo caudato e putamen (Fig.15). In particolare, immagini RM, ottenute 24 mesi dopo l'intervento di destra e 22 dopo quello di sinistra, hanno evidenziato la presenza di tessuto neo-generato con segnale analogo a quello della sostanza grigia a livello dello striato di destra (Fig.15A, freccia rossa). A sinistra è stata osservata una crescita marcata del tessuto trapiantato in cui non era distinguibile la separazione tra caudato e putamen (Fig.15A, freccia gialla) e la presenza di tessuto neo-generato anche a livello della corteccia frontale (Fig.15A, freccia bianca). Valutazioni ^{18}F FDG-PET effettuate prima dell'intervento hanno evidenziato un marcato ipometabolismo dello striato (Fig.15B-a), mentre 12 mesi dopo l'intervento di destra e 10 dopo quello di sinistra è stato osservato un ipermetabolismo nello striato (Fig.15B-b, frecce gialle) e nella corteccia frontale di sinistra (Fig.15B-b, freccia bianca). Dopo 16 mesi dal trapianto, il metabolismo nello striato di sinistra si è mantenuto elevato (Fig.15B-c, freccia gialla), mentre è diminuito a livello corticale (Fig.15B-c, freccia bianca); immagini ottenute 22 mesi dopo il trapianto, hanno dimostrato la riduzione dell'ipermetabolismo sia nello striato di sinistra (Fig.15B-d, freccia gialla) che a livello corticale (Fig.15B-d, freccia bianca). Inoltre, valutazioni ^{123}I BZM-SPECT, effettuate 24 mesi dopo il trapianto di destra e 22 dopo quello di sinistra, hanno evidenziato un aumento nell'uptake di IBZM a livello dei nuclei della base di sinistra (Fig.15C-a, freccia gialla). Co-registrazioni tra ^{123}I BZM-SPECT e RM T1 hanno dimostrato che questo incremento corrispondeva con la porzione posteriore del tessuto neo-generato a livello dello striato (Fig.15C-b, freccia gialla).

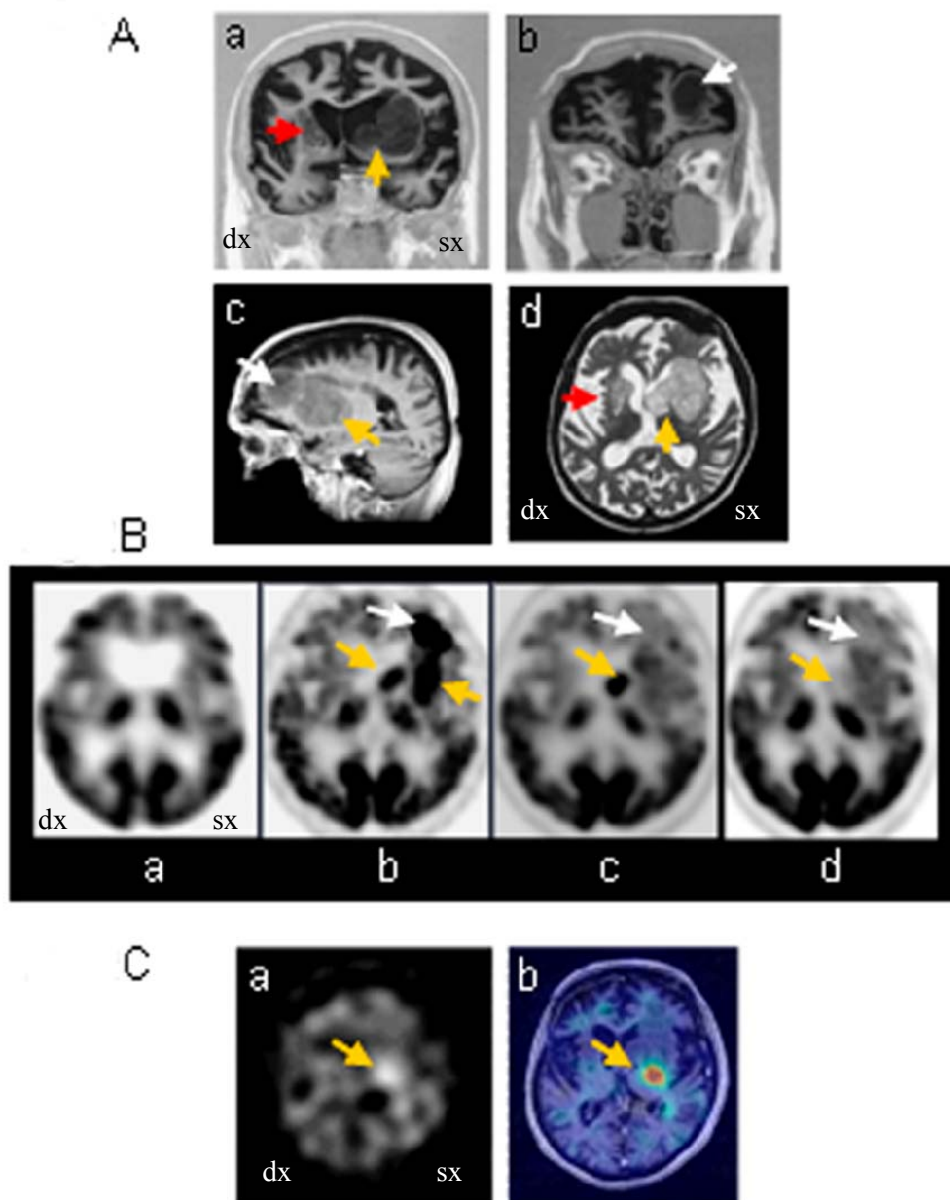


Figura 15. Imaging del paziente 2. A) Immagini RM ottenute 24 mesi dopo il trapianto di destra e 22 dopo quello di sinistra. B) Immagini ^{18}F FDG-PET: a) Prima dell'intervento, b) 12 mesi dopo l'intervento di destra e 10 mesi dopo l'intervento di sinistra, c) 18 mesi dopo l'intervento di destra d) 24 mesi dopo l'intervento di destra. C) a) ^{123}I IBZM-SPECT 24 mesi dopo il trapianto di destra, b) Co-registrazione ^{123}I IBZM-SPECT e RM T1 24 mesi dopo il trapianto di destra.

Anche nel paziente 3 è stata osservata una crescita bilaterale dei grafts. La risonanza magnetica T2 effettuata 18 mesi dopo il trapianto di destra e 16 dopo quello di sinistra ha evidenziato nell'emisfero di sinistra la crescita di due strutture, con segnale analogo a quello della sostanza grigia, a livello del nucleo caudato e del putamen e separate da una sottile lamina di sostanza bianca (Fig.16A-a, freccia gialla); a destra invece era evidente del tessuto neo-generato a livello del putamen, con segnale leggermente iperintenso (Fig.16A-a-b, freccia rossa). Valutazioni ^{18}F FDG-PET hanno dimostrato 9 mesi dopo

l'intervento di destra un aumento bilaterale del metabolismo striatale (Fig.16B-b, frecce rossa e gialla), che rimaneva stabile anche 12 mesi dopo l'intervento (Fig.16B-c), mentre 6 mesi più tardi aumentava leggermente a livello dello striato di sinistra (Fig.16B-d, freccia gialla). Inoltre era evidente un aumento bilaterale della funzionalità dei recettori D2, valutato tramite $^{123}\text{IBZM-SPECT}$, a livello dello striato (Fig.16C-b, frecce rossa e gialla).

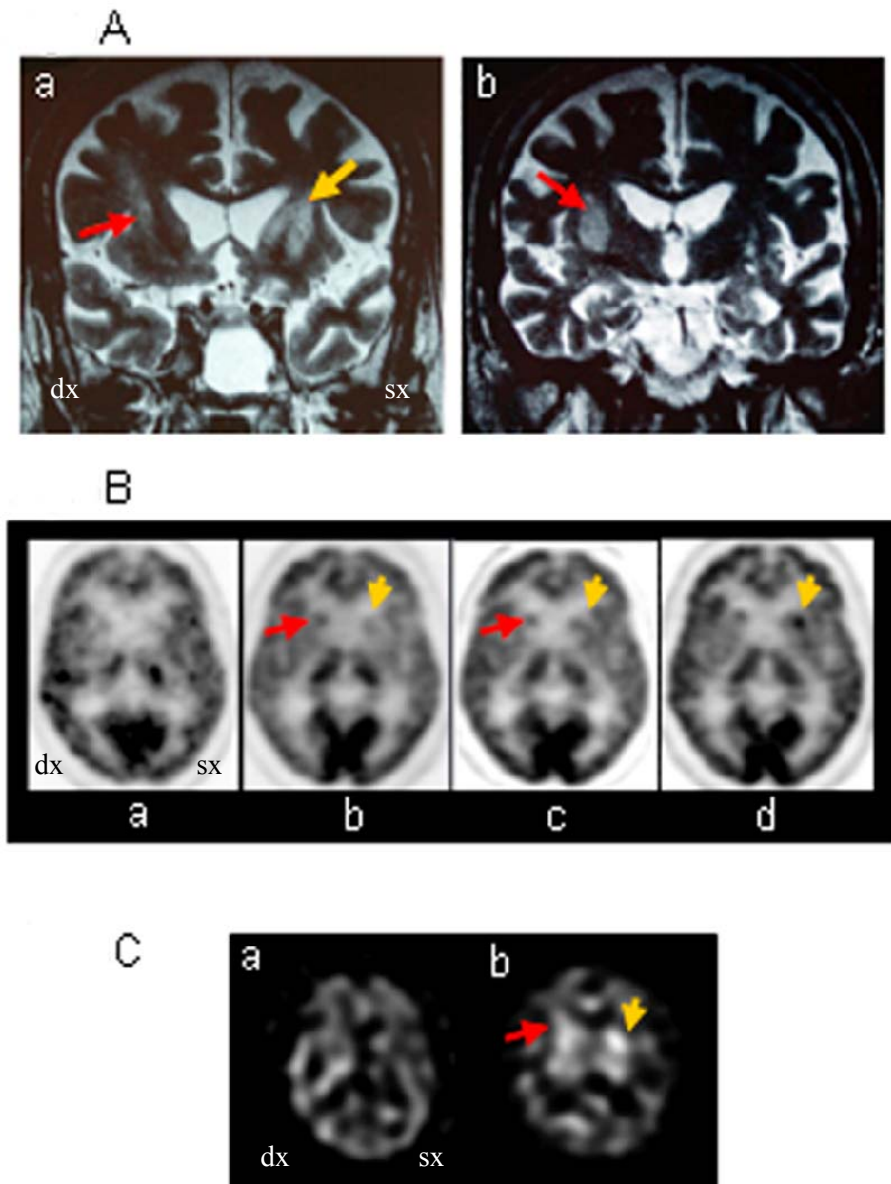


Figura 16. Imaging del paziente 3. A) Immagini RM T2 ottenute 18 mesi dopo il trapianto di destra e 16 dopo quello di sinistra. B) Immagini ^{18}F FDG-PET: a) Prima dell'intervento, b) 9 mesi dopo l'intervento di destra, c) 12 mesi dopo l'intervento di destra, d) 18 mesi dopo l'intervento di destra. C) Immagini ^{123}I IBZM-SPECT: a) Prima dell'intervento, b) 18 mesi dopo l'intervento di destra.

Nel paziente 4 il graft di destra ha mostrato una crescita evidente, mentre quello di sinistra non è cresciuto (Fig.17). In particolare, valutazioni RM effettuate 7 mesi dopo il primo trapianto hanno mostrato nello striato di destra la formazione di due noduli di tessuto con segnale analogo a quello della sostanza grigia a livello della testa del nucleo caudato (Fig.17A, freccia tratteggiata rossa) e del putamen pre-commissurale (Fig.17A, freccia rossa), ed un nodulo a livello della corteccia frontale (Gallina et al., 2008a). Nella nuova morfologia assunta dai nuclei della base, il corno ventricolare frontale destro è stato rimodellato dalla crescita del tessuto neo-generato, mentre la capsula interna e la capsula esterna sono state ben preservate. La freccia gialla (Fig.17A) indica la traccia dell'ago neurochirurgico durante l'intervento nell'emisfero sinistro. Immagini RM ottenute 34 mesi dopo il trapianto di destra e 32 dopo quello di sinistra hanno confermato la presenza di tessuto neo-generato a livello della testa del nucleo caudato (Fig.17B, freccia tratteggiata rossa), del putamen pre-commissurale (Fig.17B, freccia rossa) e della corteccia frontale (Fig.17B-c, freccia bianca). Valutazioni ¹⁸FDG-PET effettuate 9 mesi dopo il trapianto di destra hanno mostrato un'attività metabolica molto elevata a livello del caudato di destra rispetto ai livelli osservati prima dell'intervento; durante i mesi successivi (12 e 15 mesi dall'intervento di destra) è stata osservata una riduzione progressiva dell'ipermetabolismo, anche se l'uptake di glucosio si è mantenuto comunque più elevato rispetto ai valori precedenti all'intervento (Gallina et al., 2008a). Anche a livello del nodulo corticale, dopo l'ipermetabolismo visibile a 9 mesi dall'intervento, è stata osservata una riduzione progressiva del segnale (Gallina et al., 2008a). Valutazioni ¹⁸FDG-PET, effettuate 25 mesi dopo l'intervento di destra, hanno dimostrato la persistenza dell'uptake di FDG in corrispondenza del tessuto neo-generato dello striato e della corteccia (Fig.17B-d) nell'emisfero destro, ed immagini ¹²³IBZM-SPECT hanno evidenziato una tendenza all'aumento della funzionalità dei recettori D2, senza tuttavia raggiungere i valori di un controllo sano (Fig.17C).

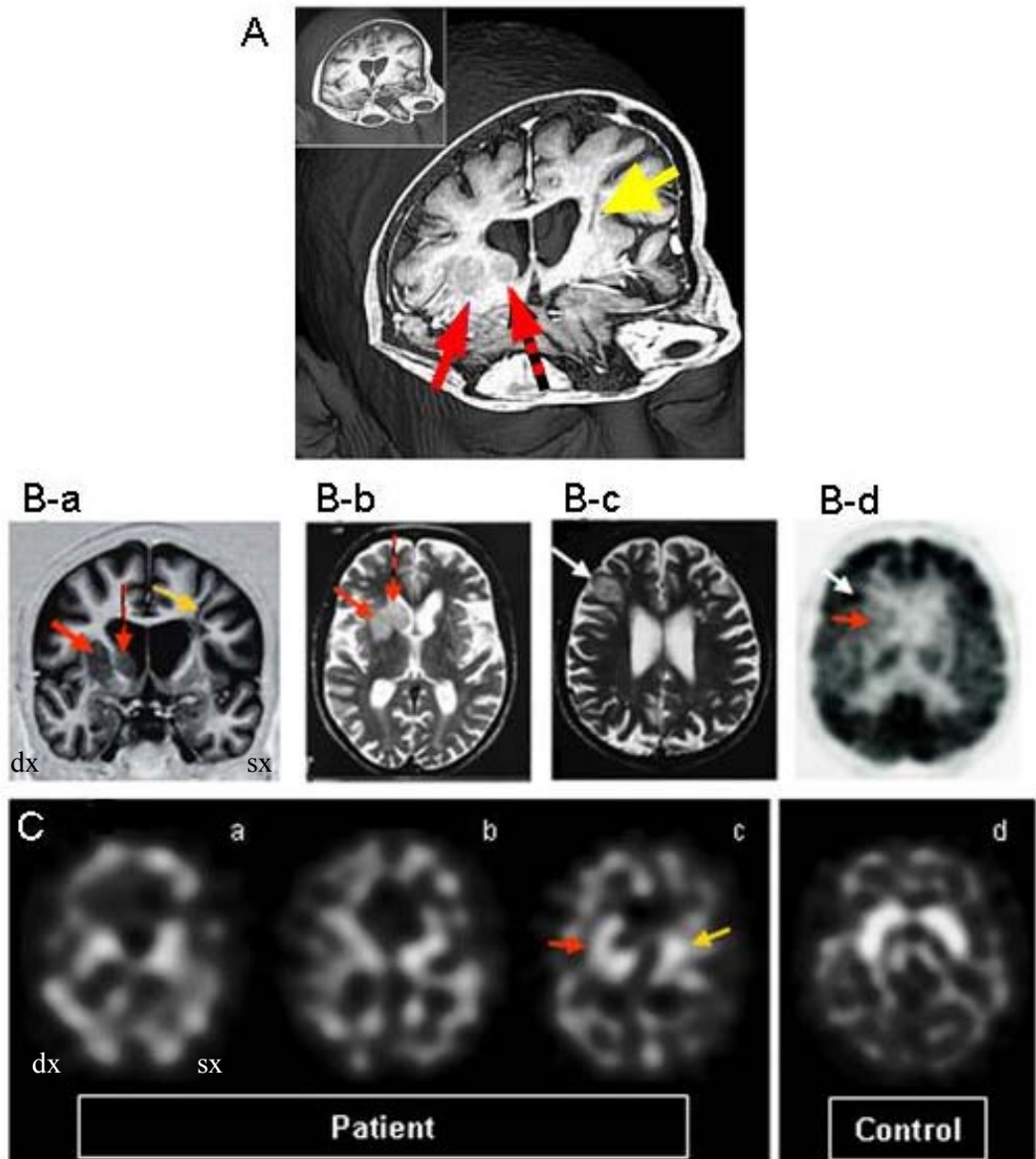


Figura 17. Imaging del paziente 4. A) Ricostruzione RMN 3D effettuata 7 mesi dopo il trapianto di destra, nell'inserto ricostruzione 3D effettuata prima dell'intervento. B) Immagini di RM T1 coronale (a) e T2 assiale (b,c) ottenute 34 mesi dopo l'intervento di destra e 32 mesi dopo quello di sinistra; d) immagine ^{18}F FDG-PET ottenuta 25 mesi dopo il trapianto di destra. C) Immagini ^{123}I IBZM-SPECT ottenute 9 mesi (a), 12 mesi (b), 24 mesi (c) dopo il trapianto di destra; d) Immagine ^{123}I IBZM-SPECT di un controllo sano.

In tutti i pazienti il tessuto neo-generato ha mostrato un segnale T1 analogo e T2 leggermente iper-intenso rispetto a quello della sostanza grigia. La crescita dei grafts si è fermata circa 9-10 mesi dopo il trapianto. Da notare inoltre che in tutti i pazienti il tessuto neo-generato non è cresciuto solo a livello dello striato, ma anche a livello della corteccia e, in un caso, dello striato ventrale (Fig.14, Fig.15, Fig.16A, Fig.17). La trattografia delle fibre ha mostrato uno spostamento posteriore del tratto cortico-pontino da parte delle masse di tessuto neo-generato, senza tuttavia alcun segno di infiltrazione (Fig.14A-d).

Le valutazioni ^{18}F FDG-PET hanno evidenziato la presenza di un'attività metabolica nel tessuto neo-generato; in particolare, aree con ipermetabolismo sono state identificate a 6-9 mesi in due pazienti ed a 12 mesi negli altri due, ma nelle valutazioni successive è stata osservata una riduzione di tale ipermetabolismo in tutti i casi, rimanendo comunque l'uptake di FDG superiore rispetto ai livelli pre-operatori. La funzionalità dei recettori D2, valutata con ^{123}I IBZM-SPECT, non è migliorata nel paziente 1, mentre è aumentata nel paziente 3 (44% nel caudato di destra, 18% nel putamen di destra, 20% nel caudato di sinistra ed 8% nel putamen di sinistra a 18 mesi) e nel paziente 4 (36% nel caudato di destra, 39% nel putamen di destra, 9% nel caudato di sinistra e 29% nel putamen di sinistra a 24 mesi) rimanendo comunque inferiore a quella del controllo sano (Tab. 5). Il paziente 2 ha mostrato un aumento della IBZM ratio, simile ai valori di un controllo sano, solo a livello della regione lenticolocapsulare sinistra, 24 mesi dopo il trapianto, corrispondente alla parte posteriore della massa di tessuto neo-generato (Tab.5).

Regione Anatomiche		Pre intervento	Post intervento			
			9 m	12 m	18 m	24 m
Paziente 1	n. caudato destra	0.94	--	0.96	--	--
	putamen destra	1.08	--	1.05	--	--
	n. caudato sinistra	0.95	--	0.93	--	--
	putamen sinistra	1.22	--	1.01	--	--
Paziente 2	Reg. lenticolocapsulare sin.	--	--	--	1.66	
Paziente 3	n. caudato destra	0.89	--	--	1.28	--
	putamen destra	1.08	--	--	1.28	--
	n. caudato sinistra	1.09	--	--	1.31	--
	putamen sinistra	0.99	--	--	1.07	--
Paziente 4	n. caudato destra	--	0.89	0.98	--	1.21
	putamen destra	--	0.99	1.13	--	1.38
	n. caudato sinistra	--	0.85	0.91	--	0.93
	putamen sinistra	--	1.08	1.16	--	1.39
Controllo	media n. caudato (SD)	1.67 (0.06)				
	media putamen (SD)	1.64 (0.08)				

Tabella 5. Ratio IBZM.

PROFILO IMMUNOGENETICO

Il siero del paziente 1, prelevato 12 mesi dopo il trapianto di destra, è risultato debolmente positivo per DQ7, sia con test ELISA che con Luminex (Tab.6). Il siero dei pazienti 2 e 3 è risultato invece negativo, mentre quello del paziente 4, prelevato 17 mesi dopo il trapianto di destra, ha mostrato il 18% ed il 19% PRA (ELISA) rispettivamente per gli antigeni di classe I e II. Sono infatti stati identificati anticorpi specifici anti-B17 ed anti-DR7 (R=0.7) (Tab.6).

Paziente 1	tipizzazioneHLA	HLA-A	HLA-A	HLA-B	HLA-B	DRB1	DRB1
	paziente	A2	A26	B35	B55	DR1	DR14
	graft destra	A29	A30	B45	B53	DR4	DR15
	graft sinistra	A2		B39	B51	DR11	
Profilo anticorpale 12 mesi dopo il trapianto di destra							
Patient Ab	CDC CL1	CDC CL2	ELISA CL1	ELISA CL2	LUMINEX		
	negative	negative	negative	DQ7	positive		
Paziente 2	tipizzazioneHLA	HLA-A	HLA-A	HLA-B	HLA-B	DRB1	DRB1
	paziente	A24	A32	B44	B63	DR13	
	graft destra	A2	A11	B35	B41	DR3	DR11
	graft sinistra	A1	A68	B49	B52	DR4	DR11
Profilo anticorpale 12 mesi dopo il trapianto di destra							
Patient Ab	CDC CL1	CDC CL2	ELISA CL1	ELISA CL2	LUMINEX		
	negative	negative	negative	negative	negative		
Paziente 3	tipizzazioneHLA	HLA-A	HLA-A	HLA-B	HLA-B	DRB1	DRB1
	paziente	A24		B44		DR7	DR16
	graft destra	A1	A11	B35	B57	DR7	DR16
	graft sinistra	A2	A25	B8	B35	DR1	DR3
Profilo anticorpale 12 mesi dopo il trapianto di destra							
Patient Ab	CDC CL1	CDC CL2	ELISA CL1	ELISA CL2	LUMINEX		
	negative	negative	negative	negative	negative		
Paziente 4	tipizzazioneHLA	HLA-A	HLA-A	HLA-B	HLA-B	DRB1	DRB1
	paziente	A2		B18	B56	DR11	
	graft destra	A3	A29	B13	B17	DR7	DR13
	graft sinistra	A11	A30	B18	B55	DR03	DR7
Profilo anticorpale 17 mesi dopo il trapianto di destra							
Ab paziente	CDC CL1	CDC CL2	ELISA CL1	ELISA CL2			
	positivo	positivo	B17, A32	DR7			

Tabella 6. Profilo immunogenetico dei pazienti: in corsivo antigeni ed anticorpi specifici dei donatori; in grassetto antigeni HLA condivisi dai due donatori.

ESPRESSIONE GENICA DEI DONATORI

È stata valutata, tramite real time RT-PCR, l'espressione genica di un pannello di 21 geni nel tessuto striatale di ogni donatore fetale. Questa analisi ha confermato che la sospensione cellulare utilizzata per il trapianto esprimeva markers striatali, come DARPP-32, GAD1, AchE, calbindina ed i recettori dopaminergici D1 e D2. Questo tessuto, inoltre, mostrava geni propri di cellule staminali e di precursori di cellule

nervose come CD15 (Pruszek et al., 2009), CD133, nestina, β -Tubulina III (Dunnet & Rosser, 2007b) ed anche CD90, CD44 e GFAP, geni espressi da cellule neuronali e gliali mature (Ko et al., 2005). Da notare inoltre che tutti i grafts esprimevano l'antigene di superficie c-kit (CD117), recettore del SCF (stem cell factor) (De Coppi et al., 2007) e nanog (fattore di trascrizione della famiglia dei geni homeobox) (Silva et al., 2009). Dato che le neurotrofine supportano la sopravvivenza ed il differenziamento dei neuroni durante lo sviluppo (Skaper, 2008), è stata analizzata l'espressione di geni codificanti i fattori BDNF, CNTF e GDNF, oltre che altre proteine (Htt, p75 e TrkB) necessarie per il mantenimento delle cellule nervose. I 21 geni analizzati sono stati suddivisi in tre gruppi, come già specificato nella parte dei risultati relativa alla caratterizzazione del tessuto striatale fetale.

Nel paziente 1, 20 dei 21 geni analizzati sono risultati maggiormente espressi nel graft trapiantato a sinistra rispetto a quello di destra, ad esempio la β -tubulina III era 5 volte maggiore, il CD117 25 volte (Fig.18A) ed il GAD1 15 volte (Fig.18B). Nei pazienti 2 e 3, livelli di espressione più alti sono stati riscontrati nel graft di destra per la maggior parte dei geni codificanti le neurotrofine o altre proteine coinvolte nel mantenimento delle cellule nervose (Fig.18C). Nel paziente 4, 19 dei 21 geni sono risultati maggiormente espressi nel graft destro, soltanto il CNTF ed il GDNF erano maggiormente espressi a sinistra poichè praticamente assenti a destra (Fig.18C). Per schematizzare maggiormente le differenze di espressione genica, è stata calcolata la ratio, intesa come il rapporto tra l'espressione di ciascun gene nel graft di sinistra e quella nel graft di destra. Per il paziente 1 la ratio era >1 per ciascun gene, con una media 6 volte superiore nel graft di sinistra rispetto a quello di destra; nei pazienti 2 e 3 la ratio media era circa 1 (rispettivamente 0,91 e 0,86), mentre nel paziente 4, essendo molto più espressi i geni del graft di destra rispetto a quelli di sinistra, era sempre < 1 (Fig.19). Le ratio correlavano con lo sviluppo dei grafts: infatti nel paziente 1 era cresciuto solo il graft di sinistra, nei pazienti 2 e 3 entrambi i grafts e nel paziente 4 solo quello di destra.

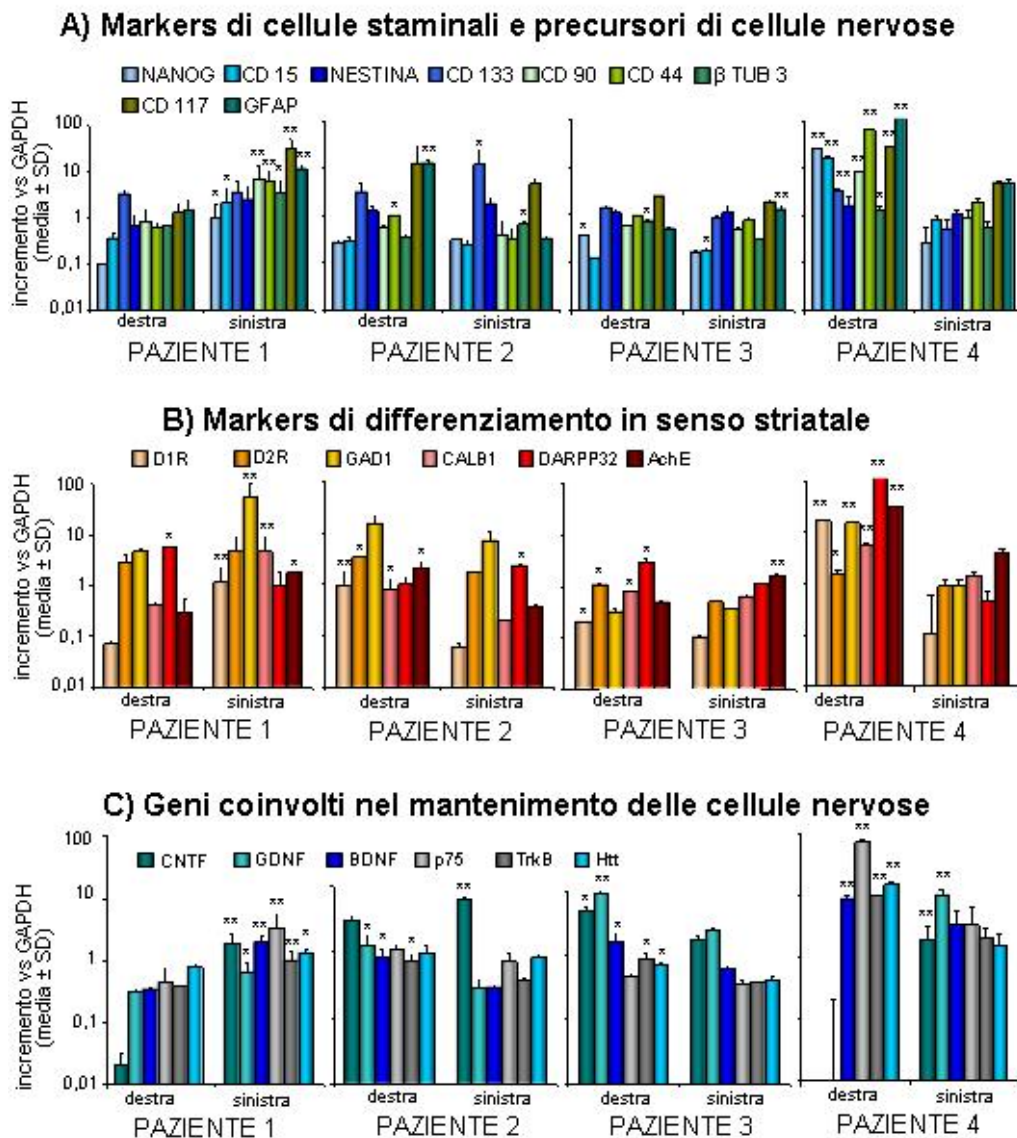


Figura 18. Espressione genica, valutata mediante real time RT-PCR, di un pannello di 21 geni in ogni tessuto fetale utilizzato per il trapianto. I valori di mRNA sono riportati, su una scala logaritmica, come incremento rispetto al gene costitutivo GAPDH (media \pm SD; * p < 0.05; ** p < 0.001).

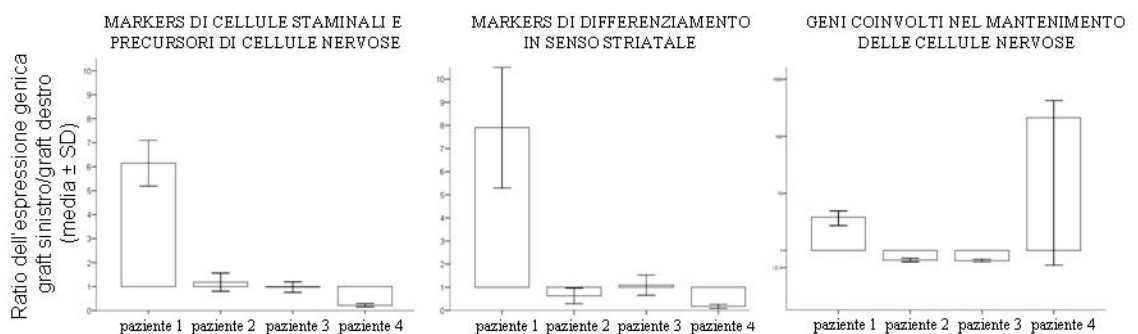


Figura 19. Ratio calcolata come media del rapporto tra l'espressione genica del graft di sinistra e quella del graft di destra.

COLTURE PRIMARIE DI NUCLEO CAUDATO FETALE

Dato che non tutti i grafts trapiantati hanno mostrato una crescita, in assenza di dati autoptici relativi ai nostri pazienti, sono state allestite colture cellulari di nucleo caudato fetale di 9-12 settimane, allo scopo di valutare il comportamento di queste cellule e l'eventuale effetto di alcuni fattori su proliferazione, migrazione e differenziamento. Tra i vari fattori di crescita abbiamo rivolto la nostra attenzione al BDNF, neurotrofina importante per la sopravvivenza di numerosi tipi neuronali, tra i quali i neuroni striatali. Evidenze sperimentali hanno dimostrato che il mancato apporto di BDNF a livello dello striato gioca un ruolo importante nella patogenesi della MH (Zuccato & Cattaneo, 2007). Zuccato e collaboratori (Zuccato et al., 2008) hanno osservato una diminuzione significativa dell'mRNA e della proteina BDNF nella corteccia di 20 individui affetti da MH, confrontati con 17 controlli sani; nello stesso studio è stato inoltre dimostrato che nella MH i livelli dell'mRNA di TrkB, recettore ad alta affinità del BDNF, sono ridotti rispetto al controllo a livello del nucleo caudato, ma non a livello della corteccia, suggerendo che ad un'alterata produzione del BDNF possa aggiungersi un danno a livello dei suoi recettori. Date queste premesse, nel presente studio siamo andati a valutare l'effetto del BDNF su colture cellulari primarie ottenute da dissociazione di nucleo caudato fetale di 9,6 settimane di gestazione (Fig.20), per poter valutare un eventuale ruolo di questo fattore neurotrofico in particolare sul differenziamento e sulla migrazione.

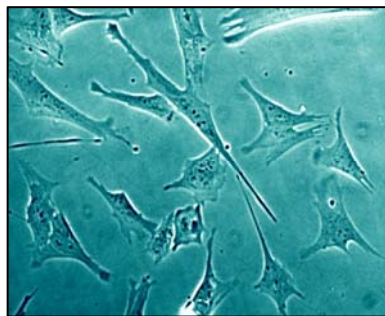


Figura 20. Coltura primaria di nucleo caudato fetale di 9,6 settimane di gestazione. Aspetto morfologico delle cellule al passaggio 8 (obiettivo 10x).

CARATTERIZZAZIONE DELLE COLTURE PRIMARIE DI NUCLEO CAUDATO FETALE

Al fine di determinare da quali popolazioni cellulari fosse costituita la coltura primaria, sono stati effettuati esperimenti di immunocitochimica. Questi studi hanno dimostrato che la coltura primaria era costituita sia da cellule differenziate in senso gliale e

nervoso, che da cellule più immature. Infatti le cellule esprimevano il marker gliale GFAP e il marker GAD1, proprio dei neuroni GABAergici (Fig.21). Una piccola percentuale di cellule mostrava inoltre la co-espressione dei due markers (Fig.21). Alcune cellule risultavano inoltre positive per il marker di precursore di cellula nervosa nestina (Fig.21).

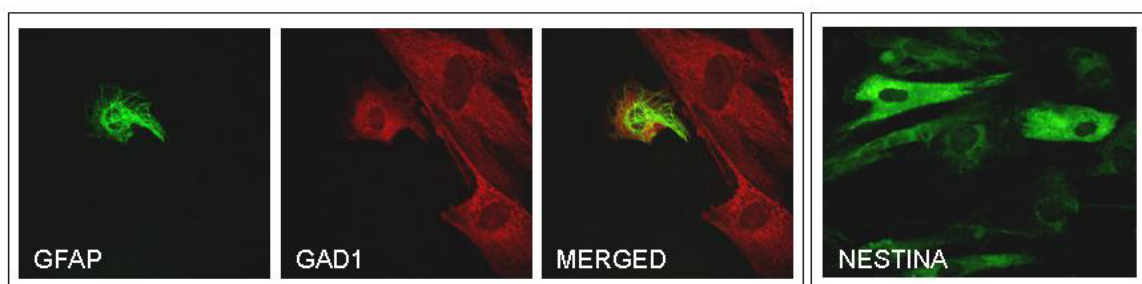


Figura 21. Immunopositività per GFAP e GAD1, affiancata dall'immagine merged dei due marcatori (obiettivo 63x). Immunopositività per nestina (obiettivo 20x).

TRATTAMENTO CON BDNF

Il passo successivo è stato quello di andare a valutare l'effetto del BDNF (50 ng/ml) sia sul differenziamento cellulare che sulla capacità migratoria, osservando come prima cosa eventuali cambiamenti nella morfologia cellulare. A tale scopo sono state effettuate valutazioni tramite microscopio a contrasto di fase e sono state contate per ogni campo le cellule che avevano emesso neuriti rispetto al numero di cellule totali (10 campi per ogni vetrino, 3 vetrini per ogni trattamento). I dati ottenuti hanno mostrato un aumento statisticamente significativo ($p < 0,05$, test t-Student) delle cellule che avevano emesso neuriti nei vetrini trattati con BDNF rispetto a quelli di controllo ($39,3 \pm 2,7\%$ vs $24,2 \pm 3,6\%$ rispettivamente) (Fig.22), indicando un differenziamento di queste cellule in senso nervoso.

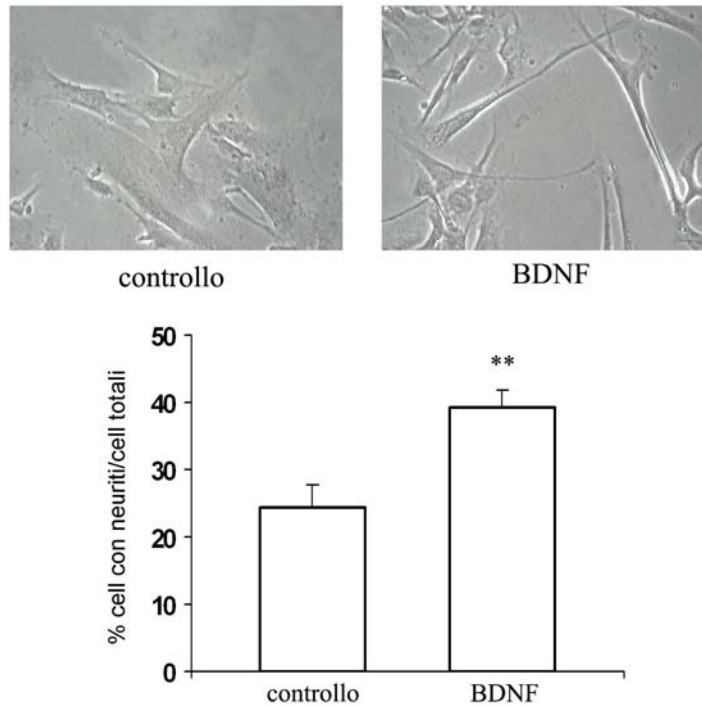


Figura 22. Valutazione dell'emissione di neuriti in cellule di controllo e cellule trattate con BDNF (obiettivo 20x). Nel grafico sono indicate le percentuali di cellule che avevano mostrato emissione di neuriti rispetto alle cellule totali. Da notare un aumento di percentuale nei vetrini trattati con BDNF (** $p < 0,05$ controllo vs BDNF).

Queste osservazioni sono state confermate da esperimenti di immunocitochimica utilizzando un anticorpo specifico diretto verso GAP-43 (Growth Associated Protein 43), proteina espressa dai neuroni prevalentemente a livello dei prolungamenti assionali e dei terminali pre-sinaptici. Tramite questa marcatura è stato possibile osservare una modificazione nella morfologia cellulare delle cellule trattate con BDNF rispetto alle cellule non trattate, la formazione di prolungamenti e protrusioni di membrana ed il raggiungimento di un fenotipo più differenziato (Fig.23).

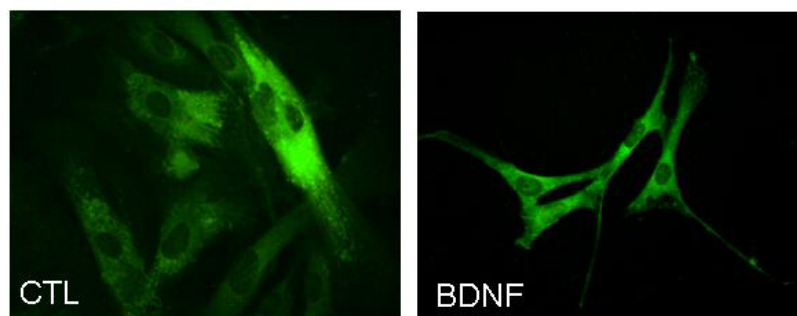


Figura 23. Immunopositività per GAP-43 (obiettivo 20x).

Successivamente siamo andati a valutare eventuali modifiche a livello del citoscheletro actinico. Infatti, le cellule non muscolari contengono fibre da stress, cioè fasci di actina e miosina, che rappresentano i principali mediatori della contrazione cellulare e che possono essere paragonati a quelli acto-miosinici delle cellule muscolari. La formazione, contrazione e riarrangiamento di queste fibre sono meccanismi coinvolti nella motilità cellulare (Pellegrin & Mellor, 2007). Al fine di valutare l'organizzazione delle fibre da stress, le cellule sono state marcate con falloidina, una tossina capace di legarsi in maniera specifica all'actina filamentosa (Fig.24). Tramite questa marcatura è stato osservato che nel controllo le cellule mostravano un evidente network di fibre actiniche altamente organizzate; dopo trattamento con BDNF le cellule andavano incontro a riarrangiamento del citoscheletro actinico con formazione di filopodi, lamellipodi ed increspature della membrana, associabili all'acquisizione di un fenotipo migratorio (Fig.24).

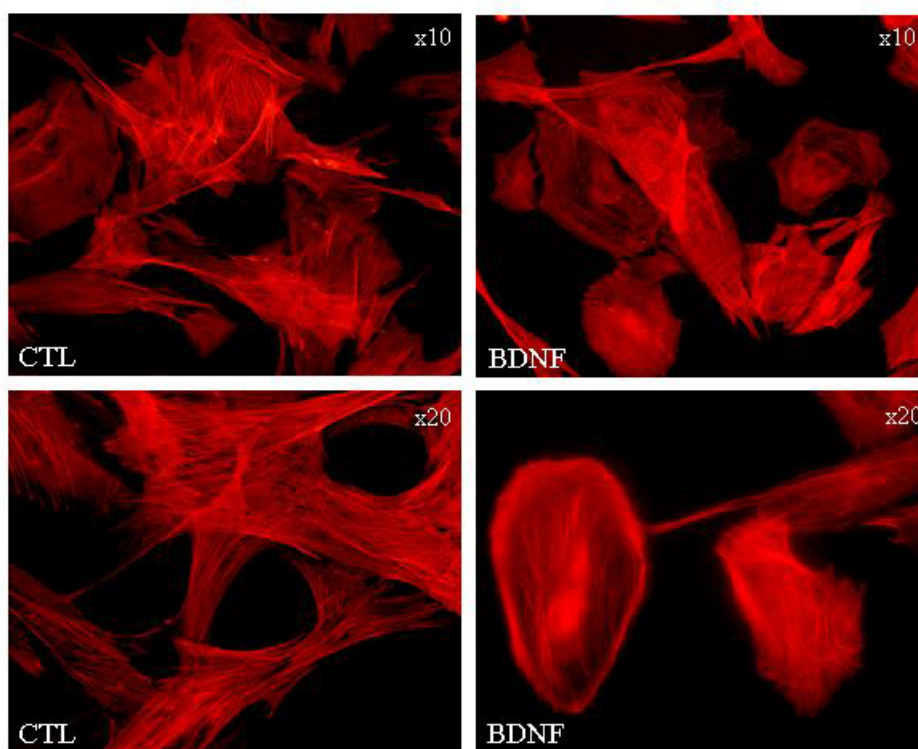


Figura 24. Marcatura delle fibre da stress mediante falloidina rodaminata: da notare come il citoscheletro actinico subisca delle modificazioni in conseguenza a trattamento con BDNF (obiettivo 10x e 20x).

È noto che le proteine appartenenti alla famiglia delle GTP-asi Rho sono in grado di regolare la morfologia cellulare tramite il rimodellamento del citoscheletro actinico, promuovendo la migrazione cellulare (Etienne-Manneville & Hall, 2002). Pertanto, dopo aver osservato che il BDNF era in grado di modulare le fibre da stress, abbiamo voluto valutare se questo meccanismo potesse essere mediato dall'attivazione di RhoA,

una delle proteine appartenenti alla famiglia Rho. Dato che l'attivazione di RhoA avviene tramite la sua traslocazione dal citosol alla membrana, abbiamo effettuato esperimenti di immunocitochimica con doppia marcatura nei quali la membrana plasmatica è stata rilevata con la lectina rodaminata WGA, mentre RhoA è stato marcato con anticorpo specifico evidenziato da fluorescenza verde. La co-localizzazione tra i due marcatori, indice di traslocazione di RhoA a membrana, era presente nelle colture primarie di nucleo caudato fetale trattate con BDNF (indicata da fluorescenza di colore giallo), mentre nelle cellule di controllo mantenute in solo terreno di starvazione si osservava una totale separazione tra i due segnali (Fig.25).

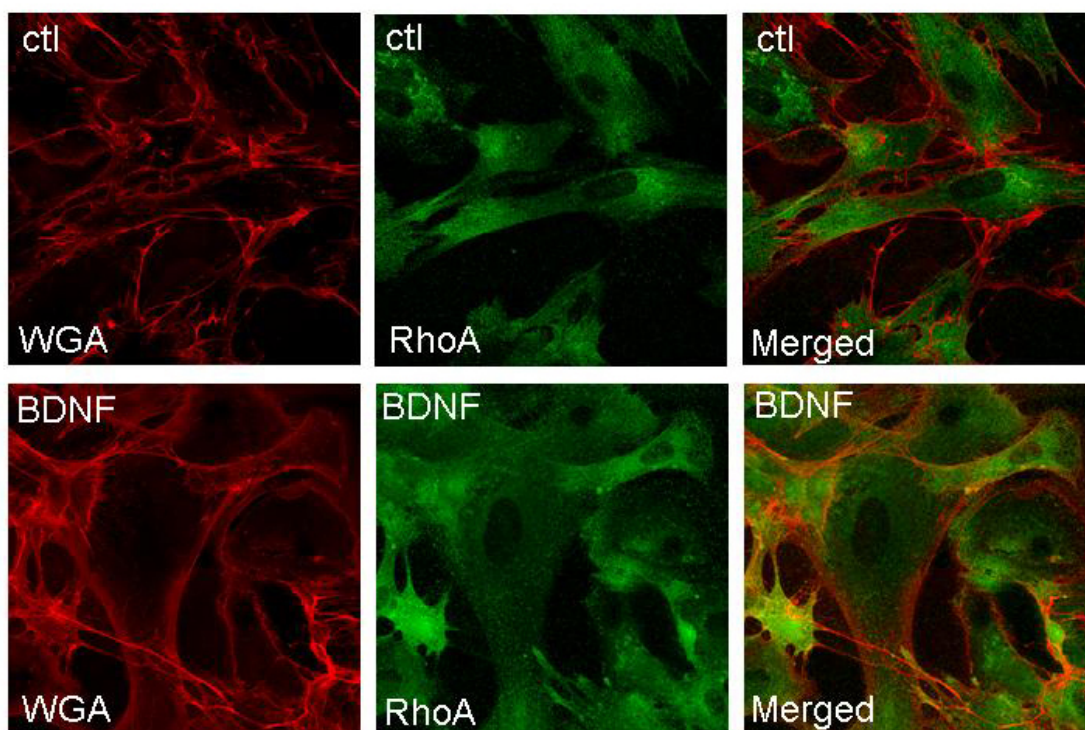


Figura 25. Immunocitochimica con doppia marcatura: in rosso la lectina WGA presente a livello della membrana plasmatica, in verde la proteina RhoA. Obiettivo 63x.

A conferma di questo dato, esperimenti di western blotting, effettuati dopo separazione della frazione citosolica da quella di membrana, hanno mostrato un aumento del segnale di RhoA a membrana dopo trattamento con BDNF (Fig. 26).

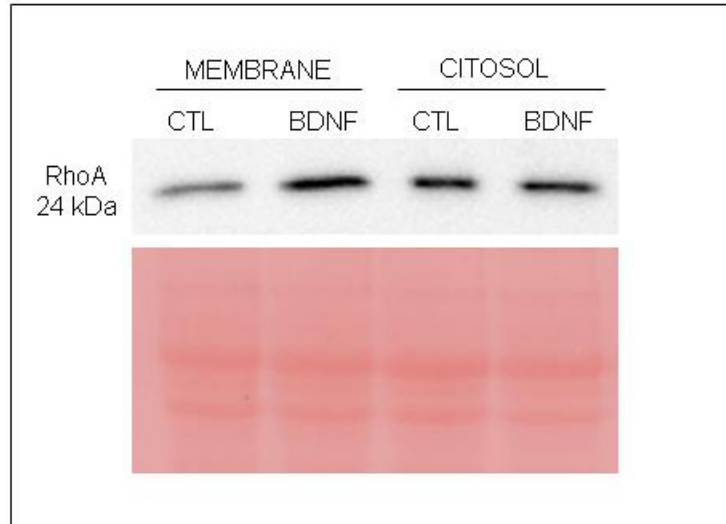


Figura 26. Western blotting della frazione di membrana e della frazione citosolica di cellule di nucleo caudato sviluppato con l'anticorpo RhoA. In basso la colorazione rosso ponceau indica la presenza di una uguale quantità di proteine in ogni pozzetto.

Una ulteriore valutazione della migrazione cellulare è stata effettuata utilizzando la camera di Boyden, che permette di determinare la chemiotassi verso una determinata sostanza. Come atteso, lo stimolo con BDNF 50 ng/ml è stato in grado di promuovere in maniera significativa la migrazione delle cellule verso il compartimento inferiore della camera di Boyden contenente il trattamento. In particolare è stato osservato che nel controllo il numero di cellule che erano migrate nel compartimento inferiore era $3,5 \pm 2,7$ per filtro (3 filtri, 10 campi per ogni filtro), mentre nel caso di trattamento con BDNF queste ultime risultavano $78,3 \pm 8,2$ per filtro (3 filtri, 10 campi per ogni filtro) ($p < 0,01$ controllo vs BDNF, test t-Student) (Fig.27).

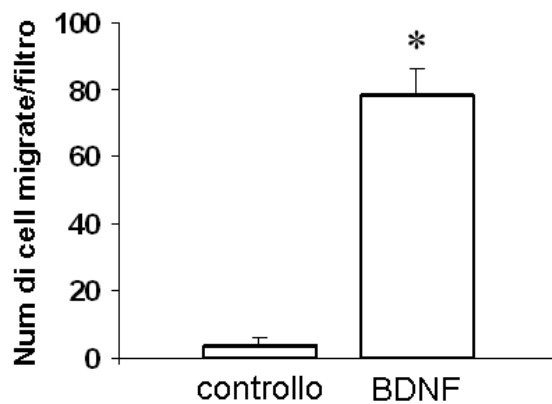


Figura 27. Valutazione della migrazione cellulare tramite camere di Boyden: numero di cellule migrate nel compartimento inferiore per ogni filtro ($*p < 0,01$ controllo vs BDNF). L'esperimento è stato condotto in triplicato e sono stati contati 10 campi per ogni filtro.

Dato che la migrazione necessita del rimodellamento della matrice extracellulare, siamo andati a valutare l'eventuale modulazione dell'espressione e dell'attività delle metalloproteasi della matrice (MMP) ad opera del BDNF. Infatti, le MMP sono una famiglia di enzimi che, secreti dalle cellule, sono in grado di digerire proteine della matrice come collagene di tipo IV, laminina e fibronectina e di conseguenza sono importanti nella migrazione di numerosi tipi cellulari. In particolare, nel cervello la MMP-2 (gelatinasi A) e la MMP-9 (gelatinasi B) sono state ampiamente studiate a causa del loro importante ruolo nei danni e nella riparazione dei tessuti cerebrali (come distruzione della barriera emato-encefalica, angiogenesi, neurogenesi, rimodellamento della lamina basale, demielinizzazione ed apoptosi) (Rosenberg, 2009). Nel presente studio è stata quindi analizzata l'espressione e l'attività di MMP-2 ed MMP-9.

Il mezzo condizionato di cellule di controllo e di cellule trattate con BDNF, analizzato tramite western blotting, presentava una lieve positività per MMP-9, di cui la forma attiva (84 kDa) era maggiormente espressa nelle cellule trattate. Invece, MMP-2 risultava downregolata sia nella forma attiva (64 kDa) che in quella inattiva (72 kDa) dal trattamento con la neurotrofina (Fig.28).

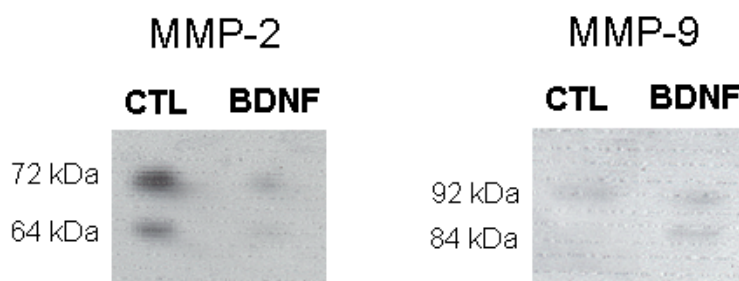


Figura 28. Western blotting del mezzo condizionato di cellule di controllo e cellule trattate con BDNF: entrambe le MMP sono espresse e secrete nel terreno di coltura.

Successivamente, l'attività delle MMP-2 e -9 è stata valutata tramite zimografia, grazie alla loro capacità di digerire la gelatina polimerizzata all'interno del gel di poliacrilammide nel quale sono stati inseriti i campioni. Da questa analisi è emerso che nelle cellule di nucleo caudato era presente l'attività gelatinasica della sola MMP-2, mentre era assente quella di MMP-9. Inoltre il trattamento con BDNF provocava una diminuzione dell'attività di MMP-2 rispetto alle cellule di controllo. Il mezzo condizionato di cellule di fibrosarcoma umano HT-1080 è stato affiancato ai nostri

campioni ed utilizzato come controllo positivo per l'attività di entrambe le MMP (Fig.29).

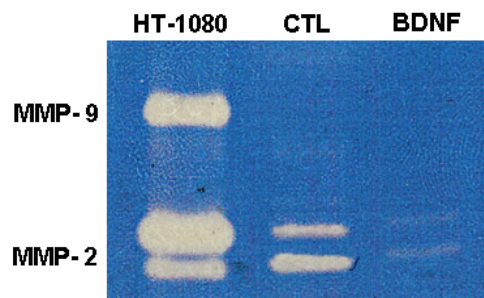


Figura 29. Zimografia effettuata sul mezzo condizionato di cellule di nucleo caudato fetale e cellule HT-1080 di fibrosarcoma umano utilizzate come controllo positivo

DISCUSSIONE

La ricostruzione di strutture e circuiti nervosi tramite trapianto di tessuto fetale è stata proposta negli ultimi anni come una nuova strategia terapeutica per la cura di alcune patologie neurodegenerative (Tuszynski, 2007). Questo approccio si basa sul principio che il primordium fetale possa ricapitolare la sua ontogenesi nell'ospite, pur in assenza dei fattori provenienti dall'ambiente fetale, ma in presenza di quelli provenienti dal cervello adulto in cui viene trapiantato.

Negli ultimi anni si sono sviluppati a livello internazionale alcuni trials clinici basati sul trapianto di tessuto striatale fetale in pazienti affetti da MH. Questi studi hanno dimostrato la sopravvivenza e la crescita dei graft trapiantati anche dopo dieci anni dall'intervento, anche se con una scarsa interconnessione con il tessuto dell'ospite, ed alcuni benefici dal punto di vista clinico (Kopyov et al., 1998; Bachoud-Lévi et al., 2006; Hauser et al., 2002; Rosser et al., 2002; Capetian et al., 2009).

Il nostro studio ha contribuito a supportare questa nuova strategia terapeutica poiché il tessuto striatale trapiantato si è sviluppato nel nucleo striato dei pazienti ed i neuroblasti fetali sono migrati, rispetto alla sede in cui era stato depositato il tessuto, raggiungendo appropriati target anatomici a breve e lunga distanza. Sono inoltre stati osservati miglioramenti clinici, anche notevoli, nella maggior parte dei pazienti sottoposti a trapianto (Gallina et al., 2008a; Gallina et al., 2009).

La natura del nuovo tessuto cresciuto nel cervello dell'ospite non è ancora stata stabilita con certezza, data la mancanza di decessi tra i pazienti del nostro studio e quindi l'assenza di studi autoptici. È stata considerata l'ipotesi della crescita neoplastica, resa plausibile dal non completo differenziamento del tessuto trapiantato; tuttavia questa ipotesi è risultata improbabile, dato che le immagini di risonanza magnetica hanno mostrato il mantenimento della barriera emato-encefalica nelle aree dove si osservava la crescita del tessuto trapiantato e la presenza di un segnale analogo a quello della sostanza grigia. Inoltre il graft trapiantato, dopo un iniziale periodo di rapida proliferazione, ha mostrato un arresto nella crescita ed il raggiungimento di dimensioni limitate nel tempo e nello spazio. Associato a questo fenomeno è stato osservato un decremento dell'attività metabolica, che comunque è rimasta più elevata rispetto alle analisi effettuate prima del trapianto, oppure ha raggiunto i livelli delle regioni cerebrali circostanti, indicando la presenza di tessuto vitale. Infine, la trattografia delle fibre, effettuata in alcuni pazienti, ha dimostrato l'assenza di infiltrazioni nell'adiacente tratto

cortico-pontino. Tutti questi elementi non supportano l'ipotesi della crescita aberrante e sono in linea con i risultati autoptici presenti in letteratura che escludono la crescita neoplastica del tessuto trapiantato (Freeman et al., 2000; Keene et al., 2007; Keene et al., 2009; Capetian et al., 2009; Cicchetti et al., 2009).

I risultati del nostro studio dimostrano che la crescita dei grafts possa essere la conseguenza di una sopravvivenza, differenziazione e migrazione dei neuroblasti fetali. In un recente articolo (Gallina et al., 2008a) abbiamo dimostrato che il tessuto striatale trapiantato è in grado di svilupparsi nel cervello adulto e di generare un nuovo tessuto vitale con le caratteristiche di imaging del tessuto striatale e con un aumento della funzionalità dei recettori dopaminergici D2 a 15 mesi dall'intervento. Nello stesso paziente analisi ¹²³IBZM-SPECT hanno mostrato a 24 mesi un ulteriore aumento della funzionalità dei recettori D2, suggerendo una progressione del differenziamento in senso striatale (Gallina et al., 2009). Reuter e collaboratori (Reuter et al., 2008) sono giunti a conclusioni analoghe; infatti hanno descritto la sopravvivenza e lo sviluppo del graft trapiantato in un paziente a 5 anni dall'intervento, utilizzando tecniche di ¹¹C-raclopride PET. Tuttavia, sempre in accordo con Reuter (Reuter et al., 2008), l'assenza di incremento nella funzionalità dei recettori D2 osservato in alcuni dei nostri pazienti anche in presenza di sviluppo dei grafts, può essere spiegato come un bilancio in senso negativo tra i recettori D2 del tessuto neo-generato e quelli persi con il progredire della patologia. È inoltre possibile che la proliferazione dei neuroblasti fetali sia una condizione necessaria ma non sufficiente per la maturazione delle strutture nervose.

In alcuni dei nostri pazienti è stata evidenziata la crescita di noduli di tessuto neo-generato anche a livello della corteccia frontale. Questo fenomeno può essere spiegato come un rilascio di materiale durante il passaggio dell'ago nella procedura neurochirurgica oppure come una migrazione dei neuroblasti dallo striato verso la corteccia. A supporto della seconda ipotesi nei pazienti 1, 2 e 3, è stato osservato un *continuum* di tessuto neo-generato che collega lo striato alla corteccia frontale; inoltre il profilo immunofenotipico del tessuto trapiantato in questi pazienti esprimeva elevati livelli di markers coinvolti nella migrazione delle cellule nervose, come CD117, CD15 e GFAP (Mai et al., 1999; Doetsch, 2003; Bantubungi et al., 2008). È stato ipotizzato che i neuroblasti abbiano utilizzato le traiettorie neurochirurgiche attraverso la sostanza bianca degenerata per giungere fino alla corteccia. Tuttavia, nel paziente 1 è stata osservata anche una migrazione verso lo striato ventrale, in una zona non raggiunta

dall'ago neurochirurgico; questo suggerisce che i neuroblasti siano in grado di muoversi attraverso la sostanza bianca, indipendentemente dalla lesione provocata dall'intervento. La continuità di tessuto neo-generato osservata tra striato e corteccia può rappresentare il preludio della costruzione di nuove connessioni anatomiche. Se questa ipotesi fosse vera, il potenziale ricostruttivo di questo tessuto sarebbe enorme.

Nell'uomo non sono ancora presenti studi che dimostrano un completo differenziamento in senso striatale o una migrazione dei neuroblasti trapiantati, anche se sono presenti alcuni dati autoptici che indicano la capacità dei grafts di progredire nello sviluppo, di generare popolazioni mature di neuroni e cellule gliali e di ricevere fibre dopaminergiche e glutamatergiche dall'ospite (Freeman et al., 2000; Keene et al., 2007; Keene et al., 2009; Capetian et al., 2009; Cicchetti et al., 2009).

Le ragioni per cui sospensioni cellulari di tessuto striatale appartenente a feti di età gestazionale molto simile, trapiantate all'interno dello stesso individuo, utilizzando le medesime tecniche e procedure, sviluppino solo in uno dei due emisferi, ancora non sono state chiarite. Uno dei motivi chiamati in causa per spiegare questo fenomeno è stato la mancanza di compatibilità tra donatore e paziente. Precedenti studi hanno dimostrato che una alloimmunizzazione nei confronti dei donatori è coinvolta nella mancata crescita dei grafts trapiantati (Krystkowiak et al., 2007). Nel nostro caso il paziente 4 ha mostrato l'anticorpo anti-HLA di II classe DR7 condiviso dai due feti, che potrebbe aver impedito la crescita del secondo graft (Gallina et al., 2008a), anche se non è noto quando questi anticorpi si sono sviluppati. Invece, nel paziente 1, dove il secondo graft ha dato luogo ad una crescita consistente, alloanticorpi anti-DQ7, condivisi da entrambi i donatori, si sono sviluppati 10 mesi dopo il secondo trapianto, in assenza di alcun segno di rigetto. Il siero dei pazienti 2 e 3, il cui follow up è durato rispettivamente 12 e 13 mesi, non ha mostrato alloimmunizzazione nei confronti di antigeni HLA fetali, nonostante ad esempio che i donatori del paziente 2 condividessero l'antigene HLA di II classe DR11 e quelli del paziente 3 gli antigeni di I classe B35 e di II classe DQ5. Al momento quindi i nostri risultati indicano che l'istocompatibilità tra donatore e ospite non può spiegare le differenze nella crescita dei grafts osservate all'interno dello stesso paziente.

Il successo del trapianto dipende inoltre dall'ottenimento di cellule che si trovano all'interno di una definita finestra di sviluppo, caratterizzata da massime capacità proliferative e migratorie (Hammerman, 2005). In questo studio sono state utilizzate le eminenze ganglionari di feti di 9-12 settimane. La diversa crescita osservata all'interno

dello stesso paziente di grafts di età gestazionale molto simile, ma con patterns di espressione genica molto diversi, può indicare la presenza di differenze sostanziali tra i feti. Pertanto per ciascun donatore può essere presente una soggettiva finestra di sviluppo ottimale, che lo rende capace di svilupparsi o meno all'interno dell'ospite.

È inoltre ancora poco chiaro il ruolo del cervello adulto malato nello sviluppo del tessuto trapiantato. Nel presente studio, dato che in due dei quattro pazienti è stata osservata la crescita dei grafts in un solo emisfero, è stato ipotizzato che il tessuto adulto possa non avere un ruolo fondamentale nel limitare o favorire lo sviluppo del tessuto fetale.

Ulteriori studi sono quindi necessari per poter identificare alcuni markers in grado di predire un potenziale sviluppo del tessuto fetale, con lo scopo di poter permettere una sicura e riproducibile ricostruzione dello striato danneggiato.

In questo studio sono stati inoltre osservati alcuni miglioramenti dal punto di vista clinico; tuttavia, il numero limitato di pazienti ed il follow up relativamente breve non hanno permesso finora di giungere a conclusioni definitive sulla correlazione tra il comportamento del tessuto fetale trapiantato ed il decorso clinico. La presenza di un effetto placebo ed ancor più la possibile trattomia di proiezioni corticali durante l'intervento chirurgico potrebbero essere spiegazioni plausibili per la riduzione dei movimenti coreici nella parte controlaterale del corpo osservata immediatamente dopo il trapianto nei pazienti 2 e 3. In questi due pazienti è stato infatti effettuato un numero maggiore di tracce putaminali (Gallina et al., 2008b), che rappresenta una variante rispetto alle procedure riportate in letteratura (Kopyov et al., 1998 ; Bachoud-Lévi et al., 2000; Hauser et al., 2002; Rosser et al., 2002).

Inoltre, il rilascio di fattori di crescita da parte dei grafts può essere chiamato in causa come possibile spiegazione dei miglioramenti clinici osservati. La somministrazione di BDNF esogeno in modelli animali di MH, anche in presenza di bassi livelli del suo recettore TrkB, è in grado di migliorare i sintomi clinici, suggerendo che anche le molecole residue di tale recettore siano ancora capaci di trasdurre in maniera efficace il segnale del BDNF (Canals et al., 2004; Zuccato & Cattaneo, 2007; Clelland et al., 2008). Dato che nel presente studio è stata dimostrata un'elevata espressione genica di Htt, BDNF ed i suoi recettori (Fig.18), è stato ipotizzato che il BDNF, prodotto dal primordium in via di sviluppo, possa essere rilasciato nel cervello dell'ospite, rimediando in tal modo, anche se parzialmente, alla carenza di tale fattore di crescita e legandosi ai recettori dell'ospite rimasti. È così possibile che l'apporto di BDNF fetale

possa ristabilire alcuni pathway molecolari silenti nel cervello dell'ospite, dando luogo ai miglioramenti clinici osservati nei nostri pazienti. Allo stesso modo, il rilascio di CNTF e GDNF da parte dei grafts può avere un ruolo protettivo per il tessuto cerebrale e permissivo per l'azione del BDNF esogeno. Non è possibile al momento determinare se e per quanto tempo questo effetto verrà mantenuto, considerando comunque che, come osservato da Cicchetti e coll. (Cicchetti et al., 2009), i neuroni fetali trapiantati possono andare incontro ad una degenerazione come conseguenza dell'azione citotossica dell'innervazione glutamatergica che li raggiunge.

Numerosi studi hanno dimostrato che il BDNF, legandosi ai suoi recettori TrkB (alta affinità) e NGFR p75 (bassa affinità), riveste importanti ruoli a livello del sistema nervoso centrale sia durante lo sviluppo che durante la vita adulta. È noto ad esempio che tale neurotrofina promuove la sopravvivenza e la migrazione di numerosi tipi cellulari ed è in grado di regolarne la morfologia ed il differenziamento. Alcune evidenze sperimentali hanno inoltre correlato la mutazione dell'Htt con il mancato apporto di BDNF a livello dei nuclei della base, sede primaria della degenerazione neuronale nella MH (Zuccato & Cattaneo, 2007; Zuccato & Cattaneo, 2009).

Nel presente studio abbiamo dimostrato che neuroblasti fetali umani, ottenuti da tessuto striatale, sono in grado di rispondere in vitro allo stimolo con BDNF modificando il loro pattern citoscheletrico, migrando e progredendo nel differenziamento. Infatti, gli effetti biologici di tale neurotrofina su queste cellule hanno riguardato la crescita di neuriti, determinata anche dall'espressione della proteina GAP43, e la riorganizzazione del citoscheletro in senso migratorio, effetti che sono stati sostenuti dall'attivazione della proteina RhoA. Inoltre, l'attività dell'enzima MMP-2 è risultata significativamente modulata dal trattamento con BDNF, ad indicare un ruolo della neurotrofina nel rimodellamento della matrice extracellulare, necessario ai fini della migrazione.

I dati ottenuti da questo studio confermano l'importanza del BDNF nello sviluppo e nella differenziazione, anche in senso migratorio, delle cellule dello striato durante l'embriogenesi.

L'implicazione di Htt e BDNF nello sviluppo della MH ha fatto nascere l'ipotesi della possibile interazione funzionale tra queste due molecole. Numerosi studi hanno dimostrato che la produzione di BDNF è necessaria per la corretta attività delle sinapsi cortico-striatali e per la sopravvivenza dei neuroni GABAergici, tanto che la sua somministrazione è stata suggerita come una potenziale nuova strategia terapeutica nella MH (Zuccato & Cattaneo, 2007). Le conclusioni che si possono trarre dalle nostre

ricerche rafforzano l'ipotesi che il BDNF svolga un ruolo importante sui neuroni striatali e che l'alterazione dei suoi effetti biologici, dovuta alla mutazione dell'Htt, possa contribuire alla patogenesi della MH. Pertanto ulteriori studi saranno volti all'identificazione dei meccanismi molecolari e delle interazioni cellulari che sono alla base della MH.

In conclusione, i dati ottenuti da questo studio dimostrano che i grafts trapiantati hanno dato luogo nel cervello dell'ospite a nuovo tessuto, che da una parte può sostituire quello danneggiato, e dall'altra può rappresentare una fonte di fattori neurotrofici; in quest'ottica il trapianto può avere sia un potenziale ricostruttivo che una funzione protettiva. Anche se la procedura neurochirurgica è sicura, ulteriori dati sono necessari per ottenere una ricostruzione riproducibile dello striato e per dimostrare se questa procedura è veramente efficace per ridurre i sintomi e la progressione della MH.

BIBLIOGRAFIA

Altar C.A., Cai N., Bliven T., Juhasz M., Conner J.M., Acheson A.L., Lindsay R.M., Wiegand S.J. "Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain" *Nature* 1997; 389:856-860

Bachoud-Lévi A.C., Bourdet C., Brugières P., Nguyen J.P., Grandmougin T., Haddad B., Jény R., Bartolomeo P., Boissé M.F., Barba G.D., Degos J.D., Ergis A.M., Lefaucheur J.P., Lisovoski F., Pailhous E., Rémy P., Palfi S., Defer G.L., Cesaro P., Hantraye P., Peschanski M. "Safety and tolerability assessment of intrastriatal neural allografts in five patients with Huntington's disease" *Exp. Neurol.* 2000; 161:194-202

Bachoud-Lévi A.C., Gaura V., Brugières P., Lefaucheur J.P., Boissé M.F., Maison P., Baudic S., Ribeira M.J., Bourdet C., Remy P., Cesaro P., Hantraye P., Peschanski M. "Effect of fetal neural transplants in patients with Huntington's disease 6 years after surgery: a long-term follow-up study" *Lancet Neurol.* 2006; 5:303-309

Bantubungi K., Blum D., Cuvelier L., Wislet-Gendebien S., Rogister B., Brouillet E., Schiffmann S.N. "Stem cell factor and mesenchymal and neural stem cell transplantation in a rat model of Huntington's disease" *Mol. Cell. Neurosci.* 2008; 37:454-470

Baquet Z.C., Gorski J.A., Jones K.R. "Early striatal dendrite deficits followed by neuron loss with advanced age in the absence of anterograde cortical brain-derived neurotrophic factor" *J. Neurosci.* 2004; 24:4250-4258

Barker R.A., Fricker R.A., Abrous D.N., Fawcett J., Dunnett S.B. "A comparative study of preparation techniques for improving the viability of nigral graft using vital stains, in vitro cultures, and in vivo grafts" *Cell Transplant.* 1995; 4:173-200

Bloch J., Bachoud-Lévi A.C., Déglon N., Lefaucheur J.P., Winkel L., Palfi S., Nguyen J.P., Bourdet C., Gaura V., Remy P., Brugières P., Boisse M.F., Baudic S., Cesaro P., Hantraye P., Aebischer P., Peschanski M. "Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease, using polymer-encapsulated cells engineered to secrete human ciliary neurotrophic factor: results of a phase I study" *Hum. Gene Ther.* 2004; 15:968-975

Bjorklund A., Lindvall O. "Cell replacement therapies for central nervous system disorders" *Nat. Neurosci.* 2000; 3:537-544

Bjorklund A., Dunnett S.B., Brundin P., Stoessl A.J., Freed C.R., Breeze R.E., Levivier M., Peschanski M., Studer L., Barker R. "Neural transplantation for the treatment of Parkinson's disease" *Lancet Neurol.* 2003; 2:437-445

Brundin P., Isacson O., Björklund A. "Monitoring of cell viability in suspensions of embryonic CNS tissue and its use as a criterion for intracerebral graft survival" *Brain Res.* 1985; 4:173-200

Brundin P., Björklund A. "Survival, growth and function of dopaminergic neurons grafted to the brain" *Prog. Brain Res.* 1987; 71:293-308

Brunet J.F., Pellerin L., Magistretti P., Villemure J.G. "Cryopreservation of human brain tissue allowing timely production of viable adult human brain cells for autologous transplantation" *Cryobiology* 2003; 47:179-183

Canals J.M., Pineda J.R., Torres-Peraza J.F., Bosch M., Martin-Ibanez R., Munoz M.T., Mengod G., Ernfors P., Alberch J. "Brain-derived neurotrophic factor regulates the onset and severity of motor dysfunction associated with enkephalinergic neuronal degeneration in Huntington's disease" *J. Neurosci.* 2004; 24:7727-7739

Capetian P., Knoth R., Maciaczyk J., Pantazis G., Ditter M., Bokla L., Landwehrmeyer G.B., Volk B., Nikkhah G. "Histological findings on fetal striatal grafts in a Huntington's disease patient early after transplantation" *Neuroscience* 2009; 160:661-675

Caviston J.P., Holzbaur E.L. "Huntingtin as an essential integrator of intracellular vesicular trafficking" *Trends Cell. Biol.* 2009; 19:147-155

Cho S.R., Benraiss A., Chmielnicki E., Samdani A., Economides A., Goldman S.A. "Induction of neostriatal neurogenesis slows disease progression in a transgenic murine model of Huntington disease" *J. Clin. Invest.* 2007; 117:2889-2902

Cicchetti F., Saporta S., Hauser R.A., Parent M., Saint-Pierre M., Sanberg P.R., Li X.J., Parker J.R., Chu Y., Mufson E.J., Kordower J.H., Freeman T.B. "Neural transplants in patients with Huntington's disease undergo disease-like neuronal degeneration" *P.N.A.S.* 2009; 106:12483-12488

Clelland C.D., Barker R.A., Watts C. "Cell therapy in Huntington disease" *Neurosurg. Focus.* 2008; 24:E9

Deckel A.W., Robinson R.G., Coyle J.T., Sanberg P.R. "Reversal of long-term locomotor abnormalities in the kainic acid model of Huntington's disease by day 18 fetal striatal implants" *Eur. J. Pharmacol.* 1983; 93:287-288

De Coppi P., Bartsch G.Jr., Siddiqui M.M., Xu T., Santos C.C., Perin L., Mostoslavsky G., Serre A.C., Snyder E.Y., Yoo J.J., Furth M. E., Soker S., Atala A. "Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy" *Nat. Biotechnol.* 2007; 25:100-106

Dinsmore J., Ratliff J., Deacon T., Pakzaban P., Jacoby D., Galpern W., Isacson O. "Embryonic stem cells differentiated in vitro as a novel source of cells for transplantation" *Cell Transplant.* 1996; 5:131-143

Doetsch F. "The glia identity of neural stem cells" *Nat. Neurosci.* 2003; 6:1127-1134

Dunnett S.B., Bjorklund A., Lindvall O. "Cell therapy in Parkinson's disease-stop or go?" *Nat. Rev. Neurosci.* 2001; 2:365-369

Dunnett S.B., Carter R.J., Watts C., Torres E.M., Mahal A., Mangiarini L., Bates G., Morton A.J. "Striatal transplantation in a transgenic mouse model of Huntington's disease" *Exp. Neurol.* 1998; 154:31-40

Dunnett S.B. & Rosser A.E. "Cell transplantation in Huntington's disease. Should we continue?" *Brain Res. Bull.* 2007a; 72:132-147

Dunnett S.B. & Rosser A.E. "Stem cell transplantation for Huntington's disease" *Exp. Neurol.* 2007b; 203:279-292

Eriksson P.S., Perfilieva E., Björk-Eriksson T., Alborn A.M., Nordborg C., Peterson D.A., Gage F.H. "Neurogenesis in the adult human hippocampus" *Nat. Med.* 1998; 4:1313-1317

Etienne-Manneville S., Hall A. "Rho GTPases in cell biology" *Nature* 2002; 420:629-635

Ferrante R.J. "Mouse models of Huntington's disease and methodological considerations for therapeutic trials" *Biochim. Biophys. Acta.* 2009; 1792:506-520

Ferrer I., Goutan E., Marín C., Rey M.J., Ribalta T. "Brain derived neurotrophic factor in Huntington disease" *Brain Res.* 2000; 866:257-261

Freeman T.B., Cicchetti F., Hauser R.A., Deacon T.W., Li X.J., Hersch S.M., Nauert G.M., Sanberg P.R., Kordower J.H., Saporta S., Isacson O. "Transplanted fetal striatum in Huntington's disease: phenotypic development and lack of pathology" *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 2000; 97:13877-13882

Fricker R.A., Torres E.M., Hume S.P., Myers R., Opacka-Juffrey J., Ashworth S., Brooks D.J., Dunnett S.B. "The effects of donor stage on the survival of embryonic grafts. II Correlation between positron emission tomography and paw reaching behaviour" *Neuroscience* 1997; 79:711-72

Frodl E.M., Sauer H., Lindvall O., Brundin P. "Effects of hibernation or cryopreservation on the survival and integration of striatal grafts placed in the ibotenate-lesioned rat caudate-putamen" *Cell Transplant.* 1995; 4:571-577

Gallina P., Paganini M., Lombardini L., Saccardi R., Marini M., De Cristofaro M.T., Pinzani P., Salvianti F., Crescioli C., Di Rita A., Bucciantini S., Mechi C., Sarchielli E., Moretti M., Piacentini S., Gritti G., Bosi A., Sorbi S., Orlandini G., Vannelli G.B., Di Lorenzo N. "Development of human striatal anlagen after transplantation in a patient with Huntington's disease" *Exp. Neurol.* 2008a; 213:241-244

Gallina P., Paganini M., Di Rita A., Lombardini L., Moretti M., Vannelli G.B., Di Lorenzo N. "Human fetal striatal transplantation in Huntington's disease: a refinement of the stereotactic procedure" *Stereotact. Funct. Neurosurg.* 2008b; 86:308-313

Gallina P., Paganini M., Lombardini L., Mascalchi M., Porfirio B., Gadda D., Marini M., Pinzani P., Salvianti F., Crescioli C., Bucciantini S., Mechi C., Sarchielli E., Romoli A.M., Bertini E., Urbani S., Bartolozzi B., De Cristofaro M.T., Piacentini S., Saccardi R., Pupi A., Vannelli G.B., Di Lorenzo N. "Human striatal neuroblasts develop and build a striatal-like structure into the brain of Huntington's disease patients after transplantation" *Exp. Neurol.* 2009; Epub ahead of print

Gauthier L.R., Charrin B.C., Borrell-Pagès M., Dompierre J.P., Rangone H., Cordelières F.P., De Mey J., MacDonald M.E., Lessmann V., Humbert S., Saudou F. "Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules" *Cell* 2004; 118:127-138

Gil J.M., Rego A.C. "Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease" *Eur. J. Neurosci.* 2008; 27:2803-2820

Hammerman M.R. "Windows of opportunity for organogenesis" *Transpl. Immunol.* 2002; 15:1-8

Hauser R.A., Furtado S., Cimino C.R., Delgado H., Eichler S., Schwartz S., Scott D., Nauert G.M., Soety E., Sossi V., Holt D.A., Sanberg P.R., Stoessl A.J., Freeman T.B. "Bilateral human fetal striatal transplantation in Huntington's disease" *Neurology* 2002; 58:687-695

Hochstetter F. "Beitrage zur Entwicklungsgeschichte des menschlichen Gehirns" 1919, 1929. Deuticke, Vienna u. Leipzig

Huntington G. "On chorea" *Med. Surg. Rep.*, Philadelphia 1872, pp. 317–321

Hurelbrink C.B., Armstrong R.J., Barker R.A., Dunnett S.B., Rosser A.E. "Hibernated human fetal striatal tissue: successful transplantation in a rat model of Huntington's disease" *Cell Transplant.* 2000; 9:743-749

Keene C.D., Sonnen J.A., Swanson P.D., Kopyov O., Leverenz J.B., Bird T.D., Montine T.J. "Neural transplantation in Huntington disease: long-term grafts in two patients" *Neurology* 2007; 68:2093-2098

Keene C.D., Chang R.C., Leverenz J.B., Kopyov O., Perlman S., Hevner R.F., Born D.E., Bird T.D., Montine T.J. "A patient with Huntington's disease and long-surviving fetal neural transplants that developed mass lesions" *Acta Neuropathol.* 2009; 117:329-338

Kendall A.L., Rayment F.D., Torres E.M., Baker H.F., Ridley R.M., Dunnett S.B. "Functional integration of striatal allografts in a primate model of Huntington's disease" *Nat. Med.* 1998; 4:727-729

Kim M., Lee S., Chu K., Kim S.U. "Stem cell-based cell therapy for Huntington disease: a review" *Neuropathology* 2008; 28:1-9

Ko I.K., Kato K., Iwata H. "Antibody microarray for correlating cell phenotype with surface marker" *Biomaterials* 2005; 26:687-696

Kopyov O.V., Jacques D.S., Lieberman A., Duma C.M., Rogers R.L. "Outcome following intrastriatal fetal mesencephalic grafts for Parkinson's patients is directly related to the volume of grafted tissue" *Exp. Neurol.* 1997; 146:536-545

Kopyov O.V., Jacques S., Lieberman A., Duma C.M., Eagle K.S. "Safety of intrastriatal neurotransplantation for Huntington's disease patients" *Exp. Neurol.* 1998; 149:97-108

Krystkowiak P., Gaura V., Labalette M., Rialland A., Remy P., Peschanski M., Bachoud-Lévi A.C. "Alloimmunisation to donor antigens and immune rejection following foetal neural grafts to the brain in patients with Huntington's disease" *PLoS ONE* 2007; 2:e166

Kuçi S., Kuçi Z., Latifi-Pupovci H., Niethammer D., Handgretinger R., Schumm M., Bruchelt G., Bader P., Klingebiel T. "Adult stem cells as an alternative source of multipotential (pluripotential) cells in regenerative medicine" *Curr. Stem Cell. Res. Ther.* 2009; 4:107-117

Kurth M.C., Kopyov O., Jacques D.B. "Improvement in motor function after fetal transplantation in a patient with Huntington's disease" *Neurology* 1996; 46:22006

Lindvall O., Kokaia Z. "Stem cells for the treatment of neurological disorders" *Nature* 2006; 441: 1094-1096

Livak K.G., Schmittgen T.D. "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ " *Method. Methods* 2001; 25:402-408

Mai J.K., Krajewski S., Reifenberger G., Genderski B., Lensing-Höhn S., Ashwell K.W. "Spatiotemporal expression gradients of the arbohydate antigen (CD15) (Lewis X) during development of the human basal ganglia" *Neuroscience* 1999; 88:847-858

Mangiarini L., Sathasivam K., Sellar M., Cozens B., Harper A., Hetherington C., Lawton M., Trotter Y., Lehrach H., Davies S.W., Bates G.P. "Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice" *Cell* 1996; 87:493-506

McGill J.K., Beal M.F. "PGC-1alpha, a new therapeutic target in Huntington's disease?" *Cell* 2006; 127:465-468

Muller F., Snyder E.Y., Loring J.F. "Gene therapy: can neural stem cells deliver?" *Nature Rev. Neurosci.* 2006; 7:75-84

Negishi T., Ishii Y., Kawamura S., Kuroda Y., Yoshikawa Y. "Cryopreservation of brain tissue for primary culture" *Exp. Anim.* 2002; 51:383-390

Oliveira J.M., Jekabsons M.B., Chen S., Lin A., Rego A.C., Gonçalves J., Ellerby L.M., Nicholls D.G. "Mitochondrial dysfunction in Huntington's disease: the bioenergetics of isolated and in situ mitochondria from transgenic mice" *J. Neurochem.* 2007; 101:241-249

Pakzaban P., Deacon T.W., Burns L.H., Isacson O. "Increased proportion of acetylcholinesterase-rich zones and improved morphological integration in host striatum of fetal grafts derived from the lateral but not the medial ganglionic eminence" *Exp. Brain Res.* 1993; 97:13-22

Pellegrin S., Mellor H. "Actin stress fibres" *J. Cell. Sci.* 2007; 120:3491-3499

Peschanski M., Cesaro P., Hantraye P. "Rationale for intrastriatal grafting of striatal neuroblasts in patients with Huntington's disease" *Neuroscience* 1995; 2:273-285

Polidori M.C., Mecocci P., Browne S.E., Senin U., Beal M.F. "Oxidative damage to mitochondrial DNA in Huntington's disease parietal cortex" *Neurosci. Lett.* 1999; 272:53-56

Pruszek J., Sonntag K.C., Aung M.H., Sanchez-Pernaute R., Isacson O. "Markers and methods for cell sorting of human embryonic stem cell-derived neural cell populations" *Stem Cells* 2007; 25:2257-2266

Pruszek J., Ludwig W., Blak A., Alavian K., Isacson O. "CD15, CD24 and CD29 Define a Surface Biomarker Code for Neural Lineage Differentiation of Stem Cells" *Stem Cells* 2009; Epub ahead of print

Quinn N., Brown R., Craufurd D., Goldman S., Hodges J., Kiebertz K., Lindvall O., MacMillan J., Roos R. "Core Assessment Program for Intracerebral Transplantation in Huntington's Disease (CAPIT-HD)" *Mov. Disord.* 1996; 11:143-150

Reuter I., Tai Y.F., Pavese N., Chaudhuri K.R., Mason S., Polkey C.E., Clough C., Brooks D.J., Barker R.A., Piccini P. "Long-term clinical and positron emission tomography outcome of fetal striatal transplantation in Huntington's disease" *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2008; 79:948-951

Rosas H.D., Salat D.H., Lee S.Y., Zaleta A.K., Hevelone N., Hersch S.M. "Complexity and heterogeneity: what drives the ever-changing brain in Huntington's Disease?" *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2008; 1147:196-205

Rosenberg G.A. "Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases" *Lancet Neurol.* 2009; 8:205-216

Ross B.D., Hoang T.Q., Blüml S., Dubowitz D.J., Kopyov O.V., Jacques D.B., Lin A., Seymour K., Tan J. "*In vivo* magnetic resonance spectroscopy of human fetal neural transplants" *NMR Biomed.* 1999; 12:221-236

Rosser A.E., Barker R.A., Harrower T., Watts C., Farrington M., Ho A.K., Burnstein R.M., Menon D.K., Gillard J.H., Pickard J., Dunnett S.B. "Unilateral transplantation of human primary fetal tissue in four patients with Huntington's disease: NEST-UK safety report ISRCTN no 36485475" *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2002; 73:678-685

Rosser A.E., Barker R.A., Armstrong R.J., Elneil S., Jain M., Hurelbrink C.B., Prentice A., Carne C., Thornton S., Hutchinson H., Dunnett S.B. "Staging and preparation of human fetal striatal tissue for neural transplantation in Huntington's disease" *Cell Transplantation* 2003; 12:679-686

Sato C., Matsuda T., Kitajima K. "Neuronal differentiation-dependent expression of the disialic acid epitope on CD166 and its involvement in neurite formation in Neuro2A cells" *J. Biol. Chem.* 2002; 277:45299-305

Silva J., Nichols J., Theunissen T.W., Guo G., van Oosten A.L., Barrandon O., Wray J., Yamanaka S., Chambers I., Smith A. "Nanog is the gateway to the pluripotent ground state" *Cell* 2009; 138:722-737

Skaper S.D. "The biology of neurotrophins, signalling pathways, and functional peptide mimetics of neurotrophins and their receptors" *CNS Neurol. Disord. Drug. Targets* 2008; 7:46-62

Subramaniam S., Sixt K.M., Barrow R., Snyder S.H. "Rhes, a striatal specific protein, mediates mutant-huntingtin cytotoxicity" *Science* 2009; 324:1327-1330

Thajeb P., Ling Z.D., Potter E.D., Carvey P.M. "The effects of storage conditions and trophic supplementation on the survival of fetal mesencephalic cells" *Cell Transplantation* 1997; 6:297-397

The Huntington's Disease Collaborative Research Group "A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes" *Cell* 1993; 72:971-983

Tuszynski M.H. "Rebuilding the brain: resurgence of fetal grafting" *Nat. Neurosci.* 2007; 10:1229-1230

Urbani S., Caporale R., Lombardini L., Bosi A., Saccardi R. "Use of CFDA-SE for evaluating the in vitro proliferation pattern of human mesenchymal stem cells" *Cytherapy* 2006; 8:243-253

Van Dellen A., Deacon R., York D., Blakemore C., Hannan A.J. "Anterior cingulate cortical transplantation in transgenic Huntington's disease mice" *Brain Res. Bull.* 2001; 56:313-318

Zuccato C., Tartari M., Crotti A., Goffredo D., Valenza M., Conti L., Cataudella T., Leavitt B.R., Hayden M.R., Timmusk T., Rigamonti D., Cattaneo E. "Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes" *Nat. Genet.* 2003; 35:76-83

Zuccato C., Cattaneo E. "Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease" *Prog. Neurobiol.* 2007; 81:294-330

Zuccato C., Marullo M., Conforti P., MacDonald M.E., Tartari M., Cattaneo E. "Systematic assessment of BDNF and its receptor levels in human cortices affected by Huntington's disease" *Brain Pathol.* 2008; 18:225-238

Zuccato C., Cattaneo E. "Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases" *Nat. Rev. Neurol.* 2009; 5:311-322

Victorin K., Isacson O., Fischer W., Nothias F., Peschanski M., Björklund A. "Connectivity of striatal grafts implanted into the ibotenic acid-lesioned striatum--I. Subcortical afferents" *Neuroscience* 1988; 27:547-562

Victorin K. "Anatomy and connectivity of intrastriatal striatal transplants" *Prog. Neurobiol.* 1992; 38:611-39