

# Lo sviluppo dell'encefalo

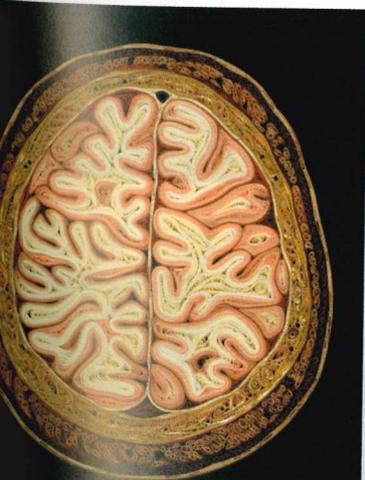
«Quella che forse è la domanda più intrigante di tutte è se l'encefalo sia abbastanza efficiente da risolvere il problema della propria formazione.» Così si esprimeva Gregor Eichele nel 1992. La costruzione di un organo che percepisce, pensa, ama, odia, ricorda, cambia, inganna se stesso e coordina i processi coscienti e inconsci del nostro organismo è senza dubbio il più stimolante di tutti gli enigmi della biologia dello sviluppo. Una combinazione di approcci genetici, cellulari e sistemici ci sta finalmente fornendo una comprensione ancora molto preliminare di come venga organizzata l'anatomia di base dell'encefalo.

Il differenziamento del tubo neurale nelle varie regioni dell'encefalo e del midollo spinale avviene simultaneamente su tre differenti livelli. A livello anatomico, il tubo neurale e il suo lume si rigonfiano e si restringono per formare le vescicole cerebrali e midollari. A livello tissutale, le popolazioni cellulari della parete del tubo neurale si organizzano nelle diverse regioni funzionali dell'encefalo e del midollo spinale. Infine, a livello cellulare, le cellule neuroepiteliali si differenziano nei numerosi tipi di cellule nervose (**neuroni**) e nelle cellule loro associate (**glia**) presenti nell'organismo. In questo capitolo ci concentreremo in generale sullo sviluppo dell'encefalo dei mammiferi e più in particolare su quello umano, considerando che è proprio quest'organo a renderci esseri umani.

## Neuroanatomia dello sviluppo del sistema nervoso centrale

L'encefalo contiene circa 170 miliardi di cellule e un numero eguale di neuroni e cellule gliali a essi associate (Azevedo et al. 2009). Esiste un'ampia varietà di *tipi cellulari* gliali e neuronali, da cellule relativamente piccole (per esempio, le cellule dello strato dei granuli) a cellule al confronto enormi (come i neuroni del Purkinje). Tutta questa diversità ha inizio dalle cellule neuroepiteliali multipotenti del tubo neurale.

**La complessità di essere umani: quanto profondamente si ripiega?**



### ● PER FARE IL PUNTO

L'accrescimento dell'encefalo ha inizio con l'espansione del tubo neurale appena costituito lungo l'asse apico-basale, all'interno di tre regioni: la zona ventricolare, il mantello o zona intermedia e la zona marginale. Le cellule staminali denominate glia radiale si distendono attraverso questo neuroepitelio, proliferando e dando origine a cellule progenitrici e neuroni. Nuovi neuroni utilizzano le fibre della glia radiale orientate radialmente per migrare verso la zona marginale. Nella corteccia cerebrale, un gradiente della proteina Reelin ad alta concentrazione basale è in grado di regolare la stratificazione ordinata "dall'interno verso l'esterno" dei neuroni migratori. La glia di Bergmann svolge un ruolo simile alla glia radiale, ma agisce nel cervelletto per generare i neuroni del Purkinje. Il potenziale di autorinnovamento e quello neurogenico di queste cellule staminali sono influenzati da numerosi fattori, tra cui l'orientamento del fuso mitotico, l'ereditarietà del centriolo parentale e del cilio, la diversificazione dei segnali Notch, e i fattori mitogeni provenienti dal fluido cerebro-spinale. L'encefalo umano, grande e complesso, si è evoluto attraverso la modifica dei meccanismi che controllano la neurogenesi cerebellare, vale a dire l'espansione delle popolazioni progenitrici della glia radiale e l'espressione differenziale di geni specifici per la neurogenesi. Quest'ultima non termina alla nascita, ma rimane attiva in modi diversi per tutta la vita.

- Le cellule del sistema nervoso centrale in via di sviluppo

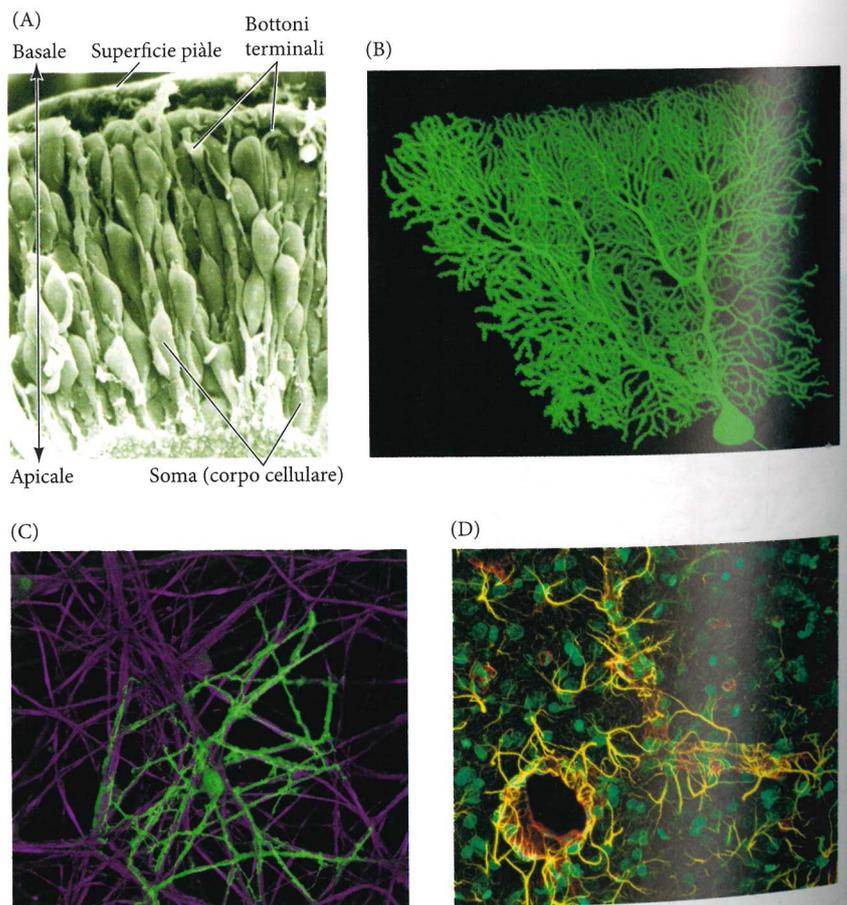
**Le cellule staminali dell'embrione** Le cellule neuroepiteliali sono le prime cellule staminali neuronali multipotenti dell'embrione. Costituiscono la piastra neurale e il tubo neurale iniziale e, in quanto cellule epiteliali, sono polarizzate lungo il loro asse apico-basale (Figura 14.1A). Una volta che la piastra si chiude per formare il tubo neurale, la superficie apicale del neuroepitelio confinerà con la cavità interna del tubo, che sarà riempita dal fluido cerebro-spinale. La superficie basale di ciascuna cellula termina con un **bottone terminale** o rigonfiamento della sua membrana basale in corrispondenza della superficie esterna del tubo neurale. La superficie del SNC è definita anche **superficie piàle**, in ragione della pia madre che rappresenta le membrane fibrose che circondano i tessuti nervosi. In quanto cellule staminali, le cellule neuroepiteliali proliferano molto rapidamente, generando cellule progenitrici per i primi tipi cellulari neuronali e gliali del tubo neurale (Turner e Cepko 1987).

Le cellule neuroepiteliali sono presenti soltanto nell'embrione a stadi iniziali dello sviluppo e si trasformano alla fine in **cellule ventricolari (ependimali)** e **cellule gliali radiali**, o della **glia radiale**. Le cellule ependimali permangono come componente integrale del rivestimento del tubo neurale e secerneranno il fluido cerebrospinale. La glia radiale<sup>1</sup> mantiene una morfologia polarizzata che si estende lungo l'asse apico-basale del sistema nervoso centrale (SNC) e svolge due funzioni primarie. In primo luogo, le cellule della glia radiale agiscono come principali cellule staminali neuronali nel corso di tutto lo sviluppo embrionale e fetale, mostrando capacità di autorinnovamento e di generazione multipoten-

<sup>1</sup> Numerose e crescenti prove indicano come la glia radiale rappresenti una popolazione eterogenea di cellule staminali e cellule progenitrici neuronali.

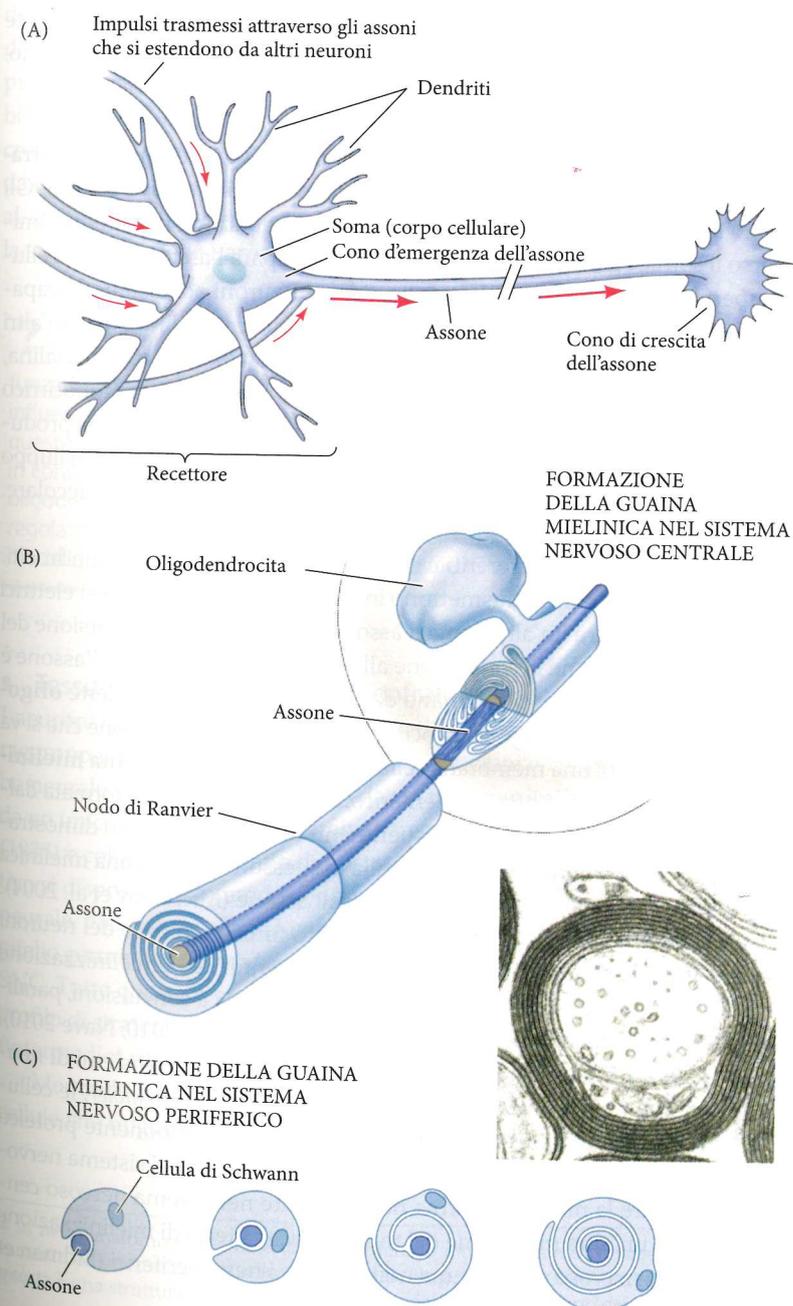
**FIGURA 14.1** Tipi cellulari del sistema nervoso centrale (SNC).

(A) Immagine al microscopio elettronico a scansione del tubo neurale neoformato nel pollo, in cui si osservano cellule a stadi differenti del ciclo cellulare, che si estendono per tutta la larghezza dell'epitelio. B) Un neurone di Purkinje con i suoi elaborati processi dendritici. Se si osserva con attenzione, quei dendriti non sono fuori fuoco: sono le protrusioni delle membrane postsinaptiche, chiamate spine e difficilmente visibili, a generare l'effetto ottico. (C) Un unico oligodendrocita (in verde), estratto dall'ippocampo di topo, avvolto intorno a molteplici assoni (in viola) in co-cultura. (D) Corteccia cerebrale di ratto con i bottoni astrogliali (in giallo), avvolti intorno ai vasi sanguigni (in rosso). I nuclei delle cellule sono in turchese. (A, per gentile concessione di K. Tosney; B, per gentile concessione di Boris Barbour; C, tratta da Fields 2013, per gentile concessione di Doug Fields; D, microfotografia di Madelyn May, Menzione speciale, Concorso fotografico del 2011, Olympus BioScapes Digital Imaging Competition.)



te delle cellule neuronali e gliali (Doetsch et al. 1999; Kriegstein e Alvarez-Buylla 2009). In secondo luogo, esse fungono da impalcatura per la migrazione delle altre cellule progenitrici e dei neuroni di nuova formazione (Bentivoglio e Mazzarello 1999). Queste due funzioni rappresentano il meccanismo fondamentale che guida l'accrescimento dell'encefalo.

**Neuroni e nervi** I neuroni sono cellule che conducono potenziali elettrici e trasformano gli impulsi elettrici in segnali capaci di coordinare le nostre funzioni corporee, i pensieri, le sensazioni e la nostra percezione del mondo. I sottili prolungamenti ramificati del neurone, impiegati per ricevere impulsi elettrici provenienti da altre cellule, prendono il nome di **dendriti** (Figura 14.2A). Alcuni neuroni sviluppano soltanto pochi dendriti, mentre altri (come le cellule del Purkinje, vedi Figura 14.1B) formano, ramificandosi, un'ampia **arborizzazione dendritica**. Nei neuroni corticali si osservano alla nascita pochissimi dendriti, ma uno degli eventi sorprendenti del primo anno di vita dell'uomo è l'aumento numerico di



**FIGURA 14.2** Neurotrasmissione e mielinizzazione. (A) Un neurone motore. Gli impulsi elettrici (indicati dalle frecce rosse) sono ricevuti dai dendriti, e il neurone stimolato trasmette impulsi al tessuto bersaglio mediante l'assone (che può avere una lunghezza anche di 60-90 centimetri). L'assone è un prolungamento cellulare, o processo, attraverso il quale il neurone invia i suoi segnali. Il cono di crescita dell'assone è un apparato sia di locomozione che sensoriale; esso esplora attivamente l'ambiente e raccoglie indicazioni sulla direzione da prendere. Alla fine, formerà una sinapsi con il tessuto bersaglio. (B, C) Nel sistema nervoso periferico, le cellule di Schwann si avvolgono attorno all'assone; nel sistema nervoso centrale, la mielinizzazione è attuata da espansioni degli oligodendrociti. La microfotografia elettronica mostra un assone circondato dalla guaina mielinica prodotta da una cellula di Schwann. (Fotografia per gentile concessione di C. S. Raine.)

questi prolungamenti di ricezione degli stimoli. In questo primo anno, ogni neurone corticale sviluppa una superficie dendritica che può stabilire fino a 100 000 connessioni (**sinapsi**) con altri neuroni. In media, un neurone della corteccia cerebrale umana, altamente sviluppata, si connette con altre 10 000 cellule nervose, mettendo in condizioni il cervello di agire come centro dell'apprendimento e del ragionamento.

Un'altra importante caratteristica del neurone in via di sviluppo è il suo **assone** (talora detto anche **neurite**). Mentre i dendriti sono spesso numerosi e non si estendono molto lontano dal corpo cellulare, o **soma**, del neurone, gli assoni possono raggiungere una lunghezza fino a 60-90 centimetri (vedi Figura 14.2A). Per esempio, i recettori dolorifici del vostro alluce devono trasmettere l'informazione lungo tutto il tragitto fino al midollo spinale. Uno dei concetti fondamentali della neurobiologia è che l'assone è un'estensione continua del corpo cellulare neuronale. Il processo attraverso il quale si stabiliscono connessioni neuronali tra i corpi cellulari da soma a soma attraverso gli assoni è stato uno dei fenomeni più studiati nello sviluppo del sistema nervoso. Come descriveremo nel Capitolo 15, per "mettere in circuito" l'encefalo embrionale, gli assoni si estendono dal corpo cellulare facendosi guidare da un cono mobile di accrescimento sulla punta, che utilizza il carico informativo dell'ambiente per dirigersi verso il suo bersaglio, per stabilire la connessione sinaptica.

**Segnalazione neuronale** Una varietà di molecole differenti, note come **neurotrasmettitori**, sono importanti nella generazione di molti potenziali d'azione. Gli assoni sono specializzati per la secrezione di specifici neurotrasmettitori chimici attraverso il sottile spazio (**fessura sinaptica**) che separa l'assone di una cellula dalla superficie della sua cellula bersaglio. Alcuni neuroni acquistano la capacità di sintetizzare e secernere, fra i neurotrasmettitori, acetilcolina, mentre altri sviluppano le vie enzimatiche per produrre e secernere, fra gli altri, adrenalina, noradrenalina, octopamina, glutammato, serotonina, acido  $\gamma$ -amminobutirrico (GABA), o dopamina. Ogni neurone deve attivare i geni responsabili della produzione degli enzimi capaci di sintetizzare il proprio neurotrasmettitore. Lo sviluppo dei neuroni comporta quindi un differenziamento sia strutturale che molecolare.

**Le cellule gliali** Esistono tre differenti categorie di cellule gliali: oligodendrociti, astroglia e microglia. I neuroni trasmettono informazioni tramite impulsi elettrici da una regione del corpo a un'altra lungo l'assone. Per impedire la dispersione del segnale elettrico e facilitarne la conduzione alla cellula di destinazione, l'assone è isolato da prolungamenti che si originano da un tipo di cellule gliali dette **oligodendrociti** (Figura 14.1C). L'oligodendrocita si avvolge attorno all'assone che si va sviluppando e forma poi una membrana cellulare specializzata, la **guaina mielinica** (Figura 14.2B). Nel sistema nervoso periferico, la guaina mielinica è formata dalle **cellule di Schwann** (Figura 14.2C). Esperimenti di trapianto hanno dimostrato che l'assone, e non la cellula gliale, controlla lo spessore della guaina mielinica attraverso la quantità di neuregulina-1 secreta dall'assone (Michailov et al. 2004).

La guaina mielinica è essenziale per un corretto funzionamento dei neuroni e determina anche la sopravvivenza assonale per decenni. La demielinizzazione (perdita della guaina mielinica) delle fibre nervose si associa a convulsioni, paralisi e gravi patologie debilitanti come la sclerosi multipla (Emery 2010; Nave 2010). Sono state osservate mutazioni nel topo a causa delle quali sottoinsiemi di neuroni sono scarsamente mielinizzati. Nei topi con la mutazione *trembler*, le cellule di Schwann non sono capaci di produrre un particolare componente proteico della guaina mielinica; ne deriva un difetto di mielinizzazione nel sistema nervoso periferico, mentre la mielina si forma normalmente nel sistema nervoso centrale. Viceversa, in un'altra mutazione del topo, *jimpy*, il difetto di mielinizzazione riguarda il sistema nervoso centrale, ma non colpisce i nervi periferici (Sidman et al. 1964; Henry e Sidman 1988).

Le **cellule astrogliali** (astroglia) rappresentano una classe diversa di cellule gliali che comprendono la glia radiale e vari sottotipi differenziati di astrociti (per esempio di tipo I, di tipo II e astrociti reattivi) (Figura 14.1D). Gli astrociti furono originariamente così chiamati per via dell'aspetto a stella (astro) che assumono quando vengono posti in una piastra di coltura; storicamente, gli astrociti sono sempre stati ritenuti il tessuto connettivo del sistema nervoso, ovvero il suo "collante". Tuttavia, studi più recenti hanno rivelato come gli astrociti svolgano una serie di funzioni importanti per il sistema nervoso degli adulti. Queste funzioni comprendono la formazione della barriera emato-encefalica, la risposta all'infiammazione nel SNC e (soprattutto) il supporto all'omeostasi sinaptica e alla neurotrasmissione.

Il marcatore principale dell'astroglia è una proteina dei filamenti intermedi denominata proteina fibrillare acida gliale (Gfap). Le mutazioni nel gene umano *gfap* che inducono un erroneo ripiegamento proteico possono portare alla malattia di Alexander, una malattia neurodegenerativa causata da aggregati proteici fibrosi che compromettono molteplici funzioni del sistema nervoso (Brenner et al. 2001; Hagemann et al. 2006).

Le cellule della **microglia** sono spesso considerate le "cellule immunitarie" del sistema nervoso centrale, in quanto agiscono per fagocitare neuroni morti o disfunzionali e glia. Come suggerisce il nome, le cellule della microglia sono più piccole rispetto agli altri tipi cellulari del sistema nervoso. Sono anche molto mobili, con comportamenti che ricordano i macrofagi; in effetti, le cellule della microglia non hanno origine nel sistema nervoso, ma sono generate in primo luogo da cellule progenitrici dei macrofagi derivate dal sacco del tuorlo (Wieghofer et al. 2015). Questi progenitori circolanti microgliali si radicano nel SNC prima della formazione della barriera emato-encefalica.

■ **UNO SGUARDO ALLO SVILUPPO 14.1**   
Per apprendere di più sulla glia, guarda questo filmato introduttivo in cui sono descritti i differenti tipi di cellule gliali.

### ? DOMANDE DELLO SVILUPPO

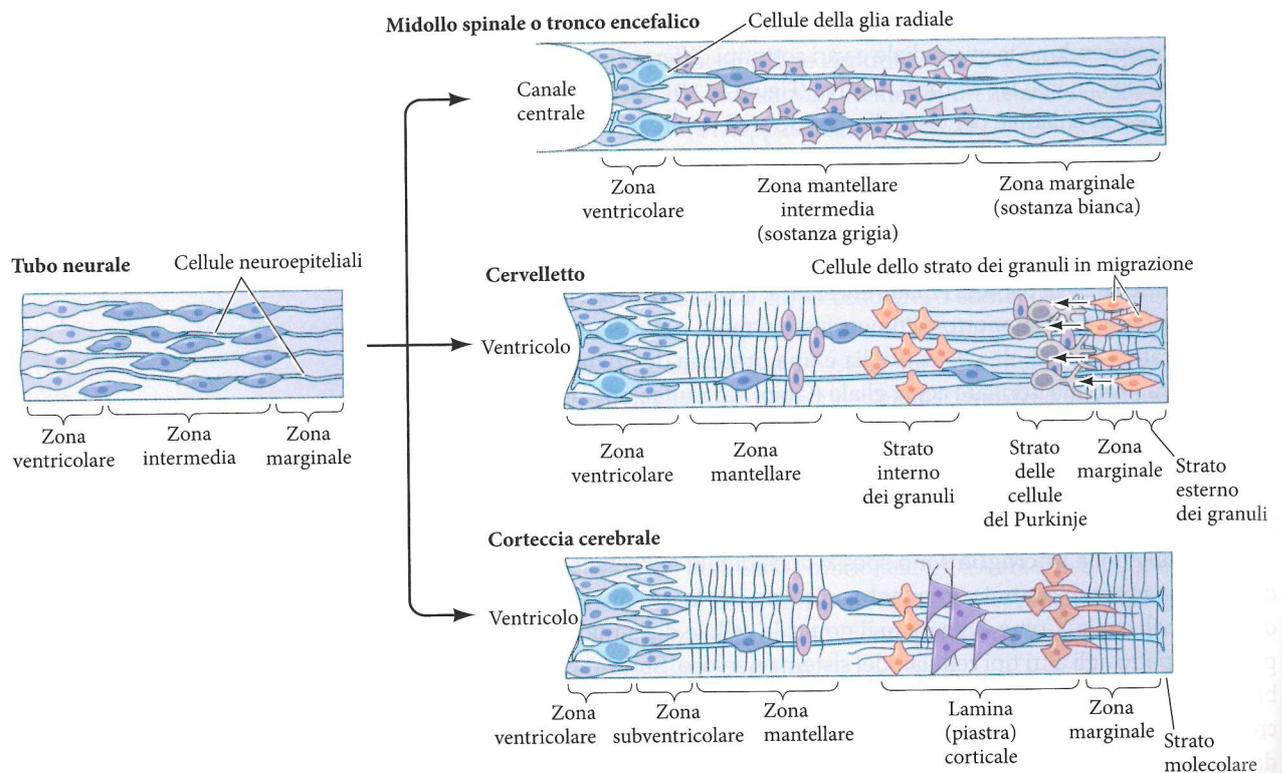
*Glia: più di un semplice collante?* Un riflettore acceso di recente sulla funzione delle cellule gliali ha rivelato le numerose modalità con cui queste cellule influenzano la fisiologia del sistema nervoso, sebbene i meccanismi alla base di queste funzioni durante lo sviluppo del SNC non siano ancora note. Prendete in considerazione alcune di queste domande: l'abbraccio avvolgente di un oligodendrocita è necessario per la sopravvivenza neuronale? Le cellule astrogliali regolano la cellula bersaglio di un partner sinaptico? La microglia favorisce la modellatura dell'encefalo durante lo sviluppo?

### • Tessuti del sistema nervoso centrale

I neuroni dell'encefalo sono organizzati in modo da formare strati (**lamine**) o raggruppamenti (**nuclei**)<sup>2</sup>, ciascuno con funzioni e connessioni differenti. Il tubo neurale originario è composto da un **neuroepitelio germinativo**, costituito da un unico strato di cellule staminali neurali che si dividono velocemente. Sauer (1935) e collaboratori hanno dimostrato che tutte le cellule dell'epitelio germinativo si dispongono in modo continuo dal lato luminale a quello esterno del tubo neurale. Nel corso dell'evoluzione, diversi adattamenti hanno portato il neuroepitelio germinativo a produrre diverse regioni altamente complesse all'interno del SNC. Tutte queste regioni, tuttavia, altro non sono che elaborazioni dello stesso profilo di stratificazione: strato ventricolare (prossimo al lume), strato mantellare (intermedio) e strato marginale (esterno) (Figura 14.3).

Mentre le cellule staminali nella **zona ventricolare** continuano a dividersi, le cellule che migrano formano un secondo strato intorno al tubo neurale. Questo

<sup>2</sup> In neuroanatomia, il termine *nucleo* si riferisce a un insieme di neuroni separato anatomicamente all'interno del cervello e che svolge, in genere, una funzione specifica. Ovviamente questa è una struttura completamente distinta dal "nucleo cellulare" dei neuroni.

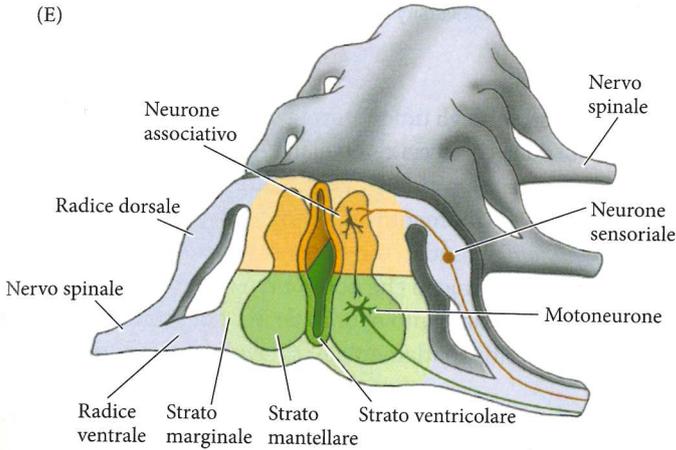
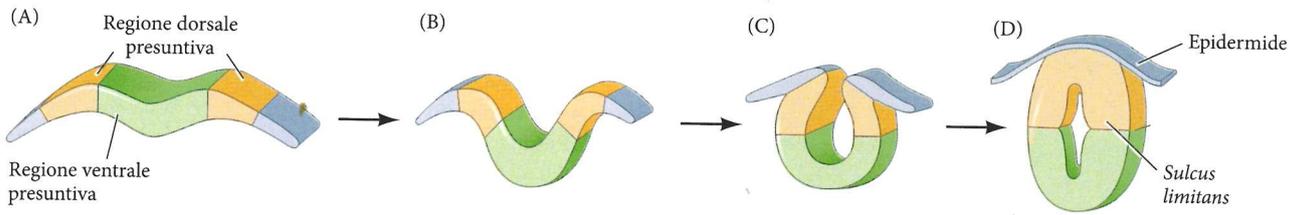


**FIGURA 14.3** Differenziamento delle pareti del tubo neurale. Una sezione di tubo neurale umano a 5 settimane (a sinistra) rivela l'esistenza di tre zone: ventricolare (ependimale), intermedia (mantellare) e marginale. Nel midollo spinale e nel tronco encefalico (in alto a destra) la zona ventricolare resta l'unica fonte di neuroni e di cellule gliali. Nel cervelletto (al centro a destra) si forma un secondo strato mitotico, lo strato granulare esterno, nella regione più lontana dalla zona ventricolare. Neuroblasti di questo strato migrano all'indietro nella zona intermedia a formare lo strato granulare interno. Nella corteccia cerebrale (in basso a destra) neuroblasti e glioblasti migranti formano una lamina corticale di sei strati. (Tratta da Jacobson 1991.)

strato diviene progressivamente più spesso via via che vengono aggiunte altre cellule dal neuroepitelio germinativo. Questo nuovo strato è il **mantello (zona mantellare o intermedia)**. Le cellule della zona mantellare si differenziano sia in neuroni che in cellule gliali. I neuroni stabiliscono connessioni tra loro e inviano assoni nella direzione opposta al lume, formando così una **zona marginale** povera di corpi cellulari neuronali. Alla fine, gli oligodendrociti rivestono molti degli assoni della zona marginale con una guaina mielinica, che conferisce loro un aspetto biancastro. Per questo motivo, lo strato marginale costituito da assoni è spesso indicato come **sostanza bianca** mentre la zona mantellare, che contiene i corpi cellulari dei neuroni, è spesso indicata come **sostanza (o materia) grigia** (vedi Figura 14.3). L'epitelio germinativo della zona ventricolare si assottiglierà successivamente per divenire l'ependima che riveste la cavità cerebrale.

Qui ci concentreremo sull'architettura associata a midollo spinale e tronco encefalico, cervelletto e cervello propriamente detto.

**Organizzazione del midollo spinale e del tronco encefalico** Il modello a tre zone, con uno strato ventricolare (ependimale), uno mantellare e uno marginale, viene conservato per tutto lo sviluppo. Se osservata in sezione trasversale, la sostanza grigia (strato mantellare) diviene gradualmente una struttura a forma di farfalla, circondata dalla sostanza bianca; all'esterno vengono entrambe rivestite da tessuto connettivo. Con la maturazione differenziativa del tubo neurale, compare un solco longitudinale, il **sulcus limitans**, che lo suddivide in una metà dorsale e in una ventrale. La parte dorsale riceve stimoli da neuroni sensoriali, mentre quella



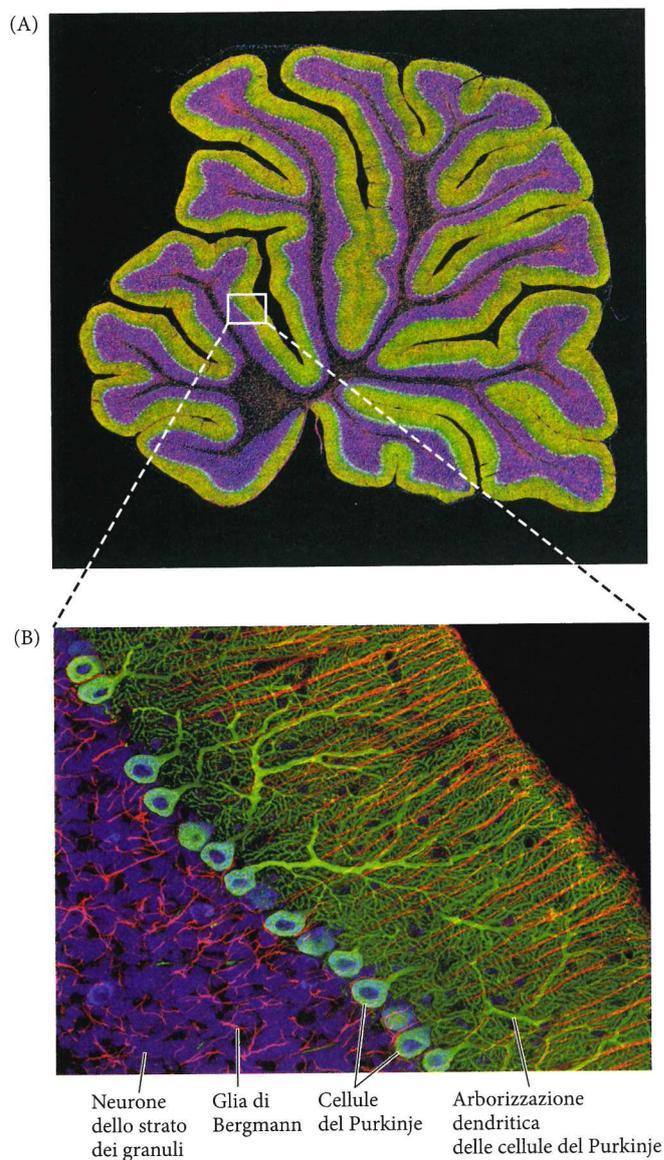
**FIGURA 14.4 Sviluppo del midollo spinale nell'uomo.** (A-D) Il tubo neurale è suddiviso, dal punto di vista funzionale, in una regione dorsale e una ventrale separate dal *sulcus limitans*. Mentre le cellule dei somiti adiacenti formano le vertebre, il tubo neurale si differenzia negli strati ventricolare (ependimale), mantellare e marginale, e nelle due lamine tegmentale (del tetto) e del pavimento. (E) Un segmento del midollo spinale con le sue radici sensoriali (dorsali) e motrici (ventrali). (Tratta da Larsen 1993.)

ventrale è responsabile di varie funzioni motorie (Figura 14.4). Questa anatomia embrionale getta le basi della fisiologia del tronco encefalico e del midollo spinale (come nell'arco riflesso).

**Organizzazione del cervelletto** Nel cervelletto la migrazione cellulare, la proliferazione differenziale dei neuroni e la morte cellulare selettiva determinano modificazioni del modello a tre zone descritto nella Figura 14.3. Lo sviluppo del cervelletto dà luogo a una corteccia altamente ripiegata (regione esterna) composta da neuroni del Purkinje e neuroni granulari integrati in "nuclei" che controllano le funzioni di bilanciamento e trasmettono informazioni dalla corteccia cerebellare ad altre regioni dell'encefalo; in questo sviluppo, un evento cruciale sembra essere la migrazione delle cellule progenitrici neuronali fino alla superficie esterna del cervelletto in via di sviluppo. Qui formano una nuova zona germinativa, lo **strato granulare esterno** in prossimità del limite esterno del tubo neurale.

Al limite periferico dello strato granulare esterno, che ha lo spessore di una o due cellule, i neuroblasti proliferano e prendono contatto con cellule che stanno secernendo fattori BMP. Le proteine BMP specificano la progenie post-mitotica di questi neuroblasti a divenire cellule particolari, dette **cellule dello strato dei granuli** (Alder et al. 1999). I granuli migrano all'indietro verso la zona ventricolare (ependimale), dove formano una regione detta **strato granulare interno** (vedi Figura 14.3). Allo stesso tempo, la zona ventricolare originaria del cervelletto genera un'ampia varietà di neuroni e cellule gliali, tra cui le caratteristiche e voluminose **cellule (o neuroni) del Purkinje**, il principale tipo cellulare del cervelletto (Figura 14.5). Le cellule del Purkinje secernono Sonic hedgehog, che sostiene la divisione dei precursori delle cellule dello strato dei granuli nello strato granulare esterno (Wallace 1999). Ogni cellula del Purkinje possiede un'enorme **arborizzazione dendritica**, che si ramifica al di sopra di un corpo cellulare globoso (vedi Figura 14.1B). Una tipica cellula del Purkinje può formare fino a 100 000 connessioni (sinapsi) con altri neuroni, più di qualunque altro tipo di neurone studiato. Inoltre, ogni cellula del Purkinje emette anche un sottile assone, che stabilisce connessioni con neuroni dei nuclei cerebellari profondi.

Le cellule del Purkinje hanno un'importanza cruciale nella conduzione elettrica del cervelletto. Tutti gli stimoli elettrici regolano infine l'attività di questi neuroni, i

**FIGURA 14.5** Organizzazione del cervelletto.

(A) Sezione sagittale di un cervelletto di ratto marcato con fluorescenza e fotografato usando il microscopio confocale a due fotoni. (B) Notevole ingrandimento di un'area di (A). Le cellule del Purkinje sono in azzurro, con i prolungamenti marcati in verde brillante. Le cellule della glia di Bergmann sono in rosso, mentre le cellule dello strato dei granuli sono in blu scuro. (Per gentile concessione di T. Deerinck e M. Ellisman, University of California, San Diego.)

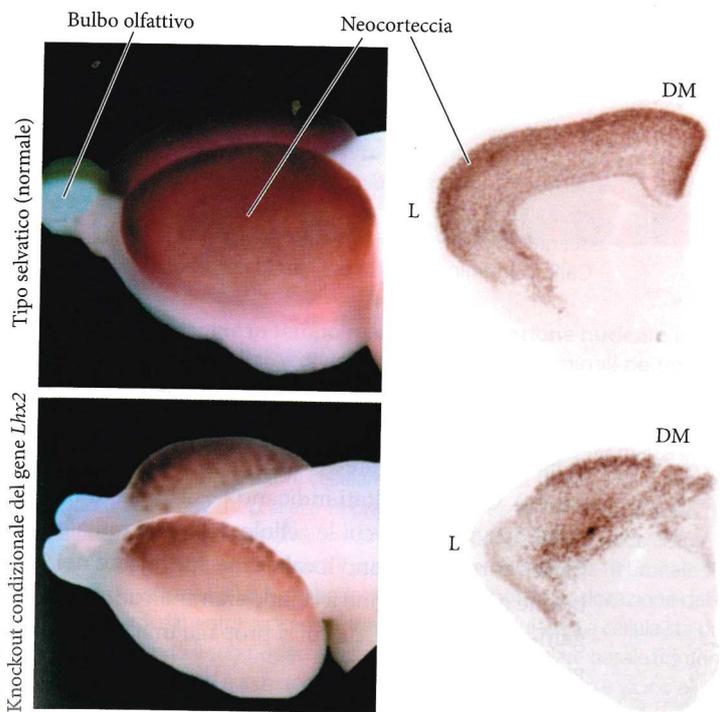
quali sono gli unici neuroni a emettere segnali in uscita dalla corteccia cerebellare. Affinché questo avvenga, cellule appropriate devono differenziarsi nella giusta sede e al momento opportuno. *Come si ottiene questo risultato?* Prenderemo in considerazione alcune ipotesi sui meccanismi che potrebbero controllare il profilo di differenziamento neuronale per poi ritornare a questa domanda fondamentale più avanti nel capitolo.

**Organizzazione del cervello propriamente detto** L'organizzazione del tubo neurale in tre zone distinte è presente, sebbene modificata, anche nel cervello, che è organizzato in due modi distinti. In primo luogo, come il cervelletto, è ordinato verticalmente in strati che interagiscono l'uno con l'altro. Certi neuroblasti dalla zona mantellare migrano sui prolungamenti gliali attraverso la sostanza bianca, dando origine a una seconda zona di neuroni sulla superficie esterna dell'encefalo (vedi Figura 14.3). Questo nuovo strato di sostanza grigia diventerà la **neocorteccia**, una caratteristica distintiva del cervello dei mammiferi. La specificazione della neocorteccia si realizza in gran parte attraverso il fattore di trascrizione *Lhx2*, che attiva numerosi altri geni cerebrali. Nel topo privo di *Lhx2*, la corteccia cerebrale non si forma (Figura 14.6; Mangale et al. 2008; Chou et al. 2009).

Alla fine, la neocorteccia si stratifica in sei strati costituiti dai corpi cellulari neuronali; essi completeranno la loro disposizione adulta soltanto a metà infanzia. Ogni strato della neocorteccia differisce dagli altri per proprietà funzionali, tipi di neuroni che vi si trovano, e serie di connessioni che questi stabiliscono (Figura 14.7). Per esempio, i neuroni dello strato 4 *ricevono* le loro afferenze principali dal talamo (una regione che si forma a partire dal diencefalo), mentre i neuroni dello strato 6 *inviando* di ritorno al talamo le loro principali efferenze.

Oltre ai sei strati verticali, la corteccia cerebrale è organizzata orizzontalmente in oltre 40 regioni, che regolano processi distinti dal punto di vista anatomico e funzionale. Per esempio, i neuroni dello strato 6 della corteccia visiva inviano assoni verso il nucleo genicolato laterale del talamo, che prende parte al processo della visione), mentre i neuroni dello strato 6 della corteccia uditiva (situata anteriormente rispetto alla corteccia visiva) inviano assoni al nucleo genicolato mediale del talamo, che partecipa alla funzione dell'udito.

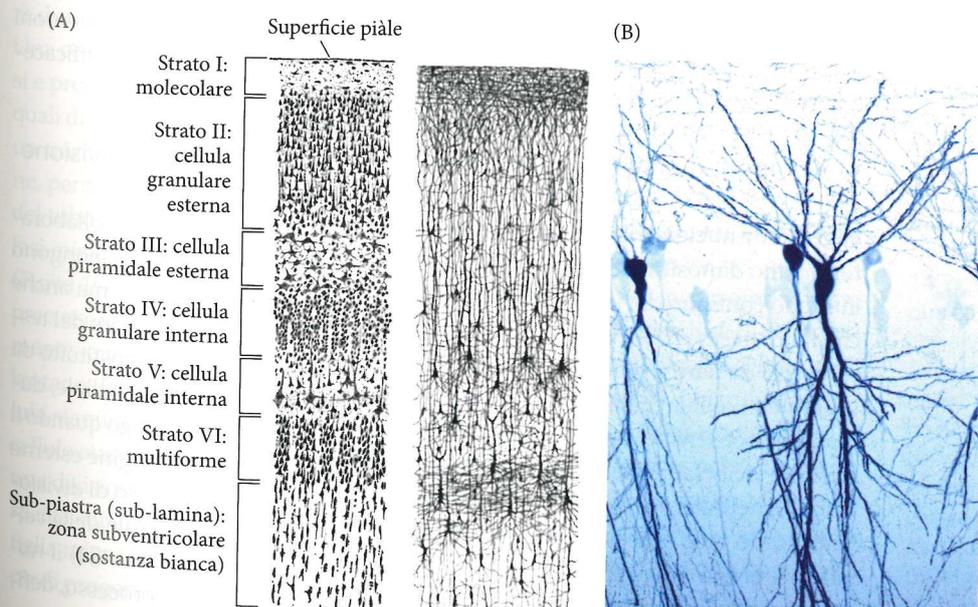
Una delle questioni più importanti nella biologia dello sviluppo è se le diverse regioni della corteccia cerebrale siano già specificate nella regione ventricolare, o se la specificazione si realizzi invece più tardi, grazie alle connessioni sinaptiche tra le varie regioni. La prova che la specificazione è precoce (e che potrebbe quindi esistere una qualche "proto-mappa" della corteccia cerebrale) è fornita da alcune mutazioni umane che distruggono le capacità funzionali e di stratificazione di

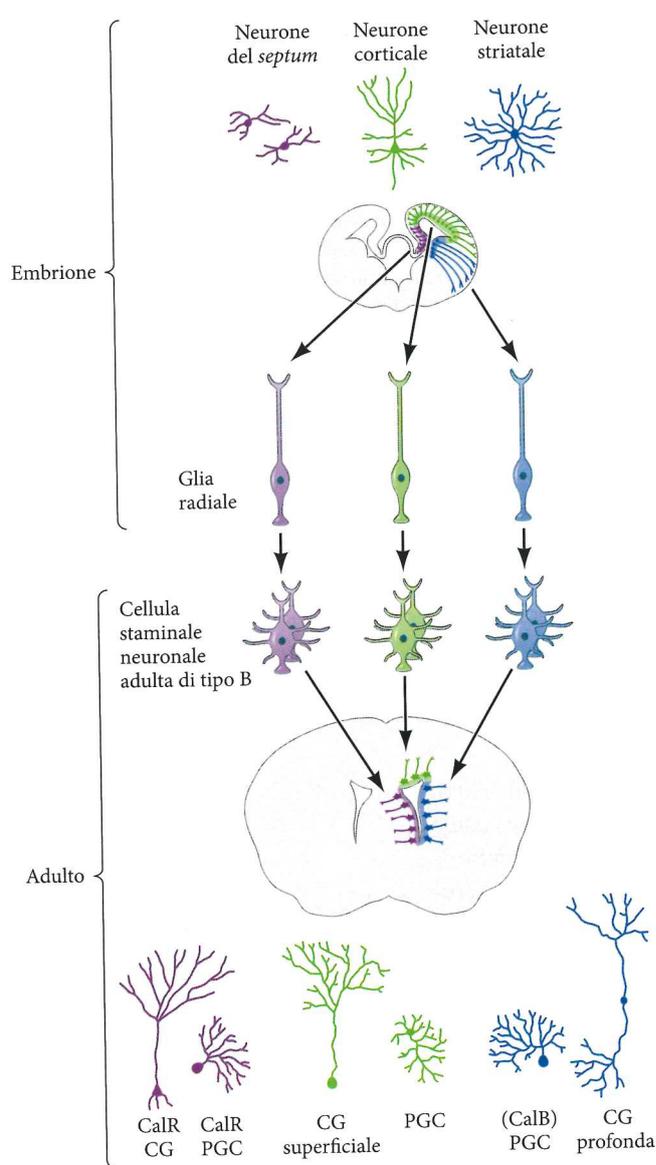


**FIGURA 14.6 Il gene *Lhx2* è necessario per lo sviluppo della neocorteccia.** Campioni di encefali integri e sezioni cerebrali coronali provenienti da topi di tipo selvatico (normali) e topi con knockout condizionale per il gene *Lhx2*, in cui le cellule staminali iniziali sono soggette a privazione di *Lhx2*. Il marcatore per la neocorteccia *Satb2* (in marrone) presenta un'elevata espressione sia nelle regioni dorso-mediali (DM) che in quelle laterali (L) della neocorteccia del topo di tipo selvatico, mentre in assenza di *Lhx2* livelli significativi d'espressione del marcatore *Satb2* si rinvenivano solo nella corteccia dorso-mediale. (Tratta da Chou et al. 2009.)

una sola parte della corteccia, lasciando intatte le altre regioni (Piao et al. 2004). Recentemente, Fuentealba e collaboratori (2015) sono riusciti a seguire le cellule della glia radiale ventricolare provenienti da diverse regioni del cervello embrionale del topo, fino all'identificazione dei loro diretti discendenti clonali nella corteccia adulta, utilizzando la tecnica del "codice a barre retrovirale", facendo quindi emergere prove più dirette dell'esistenza di una proto-mappa nella corteccia embrionale (Figura 14.8). Si è così scoperto che i neuroni differenziati della cor-

**FIGURA 14.7 Differenti tipi cellulari neuronali sono organizzati in sei strati corticali.** (A) Diverse "macchie" cellulari rivelano la stratificazione della neocorteccia in questi incredibili disegni a mano di Santiago Ramón y Cajal, estratti dal suo lavoro del 1899 intitolato "Studio comparativo delle aree sensoriali della corteccia umana". (B) Neuroni piramidali ippocampali di topo (giorno postnatale 7). (B, microfotografia di Joanna Szczurkowska, Menzione speciale, Concorso fotografico del 2014, Olympus BioScapes Digital Imaging Competition.)





**FIGURA 14.8** La specificazione regionale della glia radiale embrionale radiale si traduce in una derivazione limitata dei progenitori cellulari.

Questa illustrazione mostra le posizioni della glia radiale ventricolare nel cervello embrionale (in alto) e la derivazione clonale delle cellule staminali di tipo B e i neuroni differenziati loro associati nel cervello adulto (in basso) (CG, cellule dello strato dei granuli, PGC, cellula periglomerulare, CalB, calbindina, CalR, calretinina). (Tratta da Fuentealba et al. 2015.)

teccia discendono da cellule staminali che si trovano in aree corrispondenti dell'embrione (derivate esse stesse dalla glia radiale di aree comparabili della zona ventricolare). Questi risultati indicano l'esistenza di un modello di sviluppo in cui le cellule della glia radiale della zona ventricolare sono localmente specificate nell'embrione e danno origine a cellule staminali adulte analogamente specificate, da cui si propaga una progenie regionalmente limitata.

### I meccanismi dello sviluppo che regolano l'accrescimento del cervello

L'accrescimento del cervello dei vertebrati assomiglia molto alla costruzione di un edificio in mattoni a molti piani. In primo luogo, i mattoni devono essere prodotti e un numero appropriato di mattoni di vario tipo deve essere collocato nelle giuste posizioni. In secondo luogo, in tutta la struttura vengono utilizzate delle impalcature per trasportare i mattoni e portarli nelle giuste posizioni. L'edificio è costruito dal basso verso l'alto, e si accresce verso l'esterno nelle varie dimensioni spaziali per generare un'architettura sempre più complessa. Nello sviluppo del cervello, una precisa divisione cellulare di cellule

le staminali e progenitori genera i numeri e i tipi cellulari necessari (i "mattoni"). Le cellule della glia radiale non solo fungono da cellule staminali, ma forniscono anche l'impalcatura necessaria per il movimento di cellule progenitrici e neuroni neoformati verso gli strati sempre più superficiali, in modo da costruire efficacemente il cervello dall'interno verso l'esterno.

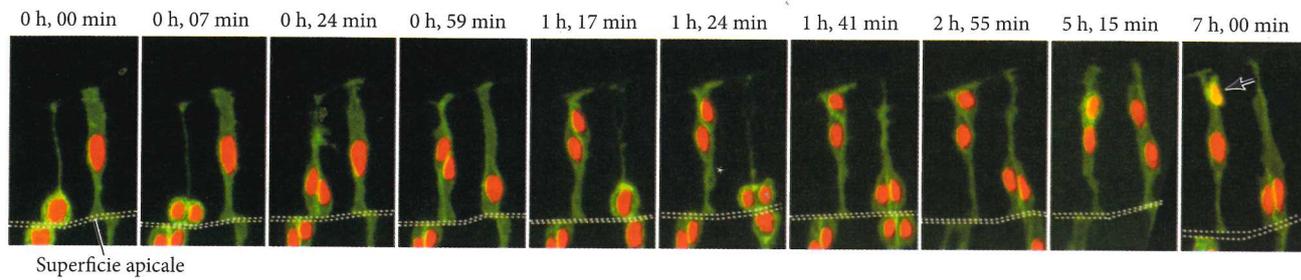
- Comportamenti delle cellule staminali neuronali durante la divisione

**Migrazione nucleare intercinetica durante la divisione** Sauer (1935) e collaboratori hanno dimostrato che tutte le cellule dell'epitelio germinativo si dispongono in modo continuo dal lato luminale a quello esterno del tubo neurale, ma anche che i loro nuclei cellulari si trovano ad altezze differenti lungo lo spessore del tessuto, così da dare a prima vista l'impressione che il tubo neurale sia costituito da più strati di cellule (Figura 14.1A). I nuclei si muovono all'interno delle cellule, durante il procedere del ciclo cellulare. La sintesi del DNA (fase S) ha luogo quando il nucleo è vicino all'estremità basale della cellula in prossimità del margine esterno del tubo neurale, e si sposta verso il lato apicale man mano che il ciclo di divisione procede. Alla mitosi (fase M), il nucleo si trova all'estremità apicale della cellula, nei pressi della superficie ventricolare in seguito alla mitosi (fase G1) il nucleo si sposta lentamente in direzione basale (Figura 14.9). Questo processo, defi-

#### TUTORIAL

##### La neurogenesi nella corteccia cerebrale

Il Dr. Michael J. F. Barresi descrive i processi cellulari e molecolari che governano lo sviluppo dall'interno verso l'esterno della corteccia cerebrale.



**FIGURA 14.9** Immagine in tempo reale della migrazione nucleare intercinetica delle cellule neuroepiteliali e divisione delle cellule staminali neuronali nel romboencefalo embrionale di zebrafish. Due cellule progenitrici quasi adiacenti nell'epitelio germinativo sono state filmate per 7 ore. Le cellule sono marcate per mostrare le membrane cellulari (in verde) e i nuclei (in rosso). Un gene reporter marca in modo specifico i neuroni (in giallo). Il progenitore cellulare sulla sinistra ha subito una divisione asimmetrica, generando un neurone (freccia alla 7ª ora) e un altro progenitore (al di sotto del neurone). La cellula a destra ha subito una divisione simmetrica, dando luogo a due cellule progenitrici. L'asterisco a 1 ora e 24 minuti indica il punto in cui la cellula figlia neuronale si è distaccata dalla superficie apicale (linee bianche tratteggiate). Si noti la traslocazione del nucleo in una cellula progenitrice mentre procede attraverso il ciclo cellulare. La cellula sta duplicando il DNA (fase S) quando il suo nucleo è vicino all'estremità cellulare basale (lontano dalle linee bianche tratteggiate) ed è in mitosi (fase M) quando il suo nucleo è vicino all'estremità cellulare apicale. (Tratta da Alexandre et al. 2010.)

nito **migrazione nucleare intercinetica**, si osserva anche nelle cellule della glia radiale e avviene in una vasta gamma di vertebrati (Alexandre et al. 2010; Meyer et al. 2011; Spear ed Erickson 2012). I meccanismi coinvolti non sono completamente conosciuti, ma microtubuli e proteine motrici sembrano svolgere un ruolo. Quando in zebrafish un gene per una proteina motrice, importante per la separazione del fuso mitotico, viene mutato, le cellule gliali radiali possono dare il via con successo alla migrazione nucleare intercinetica, ma non riescono a completare la mitosi e i loro corpi cellulari si accumulano nel tempo a livello luminale (apicale) (Johnson et al. 2016).

**Simmetria della divisione** Quando le cellule neuroepiteliali o della glia radiale si dividono, quali opzioni hanno? Ricordiamo dal Capitolo 5 le descrizioni della divisione in altre cellule staminali (vedi Figura 5.1). Una cellula staminale si può dividere simmetricamente per produrre due copie di se stessa, aumentando così il pool delle cellule staminali. In alternativa, la divisione simmetrica può produrre due cellule figlie che si differenziano, riducendo il pool delle cellule staminali. Una cellula staminale si può anche dividere asimmetricamente per autorinnovarsi e produrre al contempo una cellula figlia che si differenzia. Come si può capire quali di queste divisioni si verificano nel neuroepitelio? La marcatura cellulare con un tracciante come la timidina radioattiva, incorporata solo in cellule in divisione, permetterebbe di tracciare le linee cellulari di discendenza. Quando le cellule del tubo neurale dei mammiferi vengono marcate con timidina radioattiva nelle fasi iniziali dello sviluppo, il 100% di esse incorporerà questa base nel suo DNA (Fujita 1964). Subito dopo, tuttavia, alcune cellule cessano di incorporare questo precursore del DNA, indicando così che non stanno più dividendosi. Successivamente, queste cellule migrano e si differenziano in cellule nervose e cellule gliali lontano dal lume del tubo neurale (Fujita 1966; Jacobson 1968). Quando una cellula staminale del neuroepitelio è pronta per generare neuroni (anziché ulteriori cellule staminali neurali), il piano di divisione cellulare si sposta per dare il via a una divisione asimmetrica (freccia nella Figura 14.9). La cellula che resta connessa alla superficie luminale permane come cellula staminale, mentre l'altra cellula figlia migra (asterisco, Figura 14.9) e si differenzia in un neurone o in un altro tipo di progenitore (Chenn e McConnell 1995; Hollyday 2001).

#### ■ UNO SGUARDO ALLO SVILUPPO 14.2

Guarda i comportamenti cellulari associati alla migrazione nucleare intercinetica di cellule della glia radiale durante lo sviluppo cerebrale in zebrafish e pollo.

#### ? DOMANDE DELLO SVILUPPO

Si dice che un'immagine vale mille parole; se è vero, un film deve valerne un milione. Seguendo i filmati della migrazione nucleare intercinetica (vedi Uno sguardo allo sviluppo 14.2), ti sfidiamo a non scoprire qualcosa di nuovo ogni volta che li vedi. Nascoste in questi film troverai le risposte a molte domande: perché la citocinesi ha luogo sulla superficie apicale del neuroepitelio? Quale ruolo svolgono i centrosomi, strutture chiave di organizzazione dei microtubuli e della mitosi, in questa migrazione nucleare?

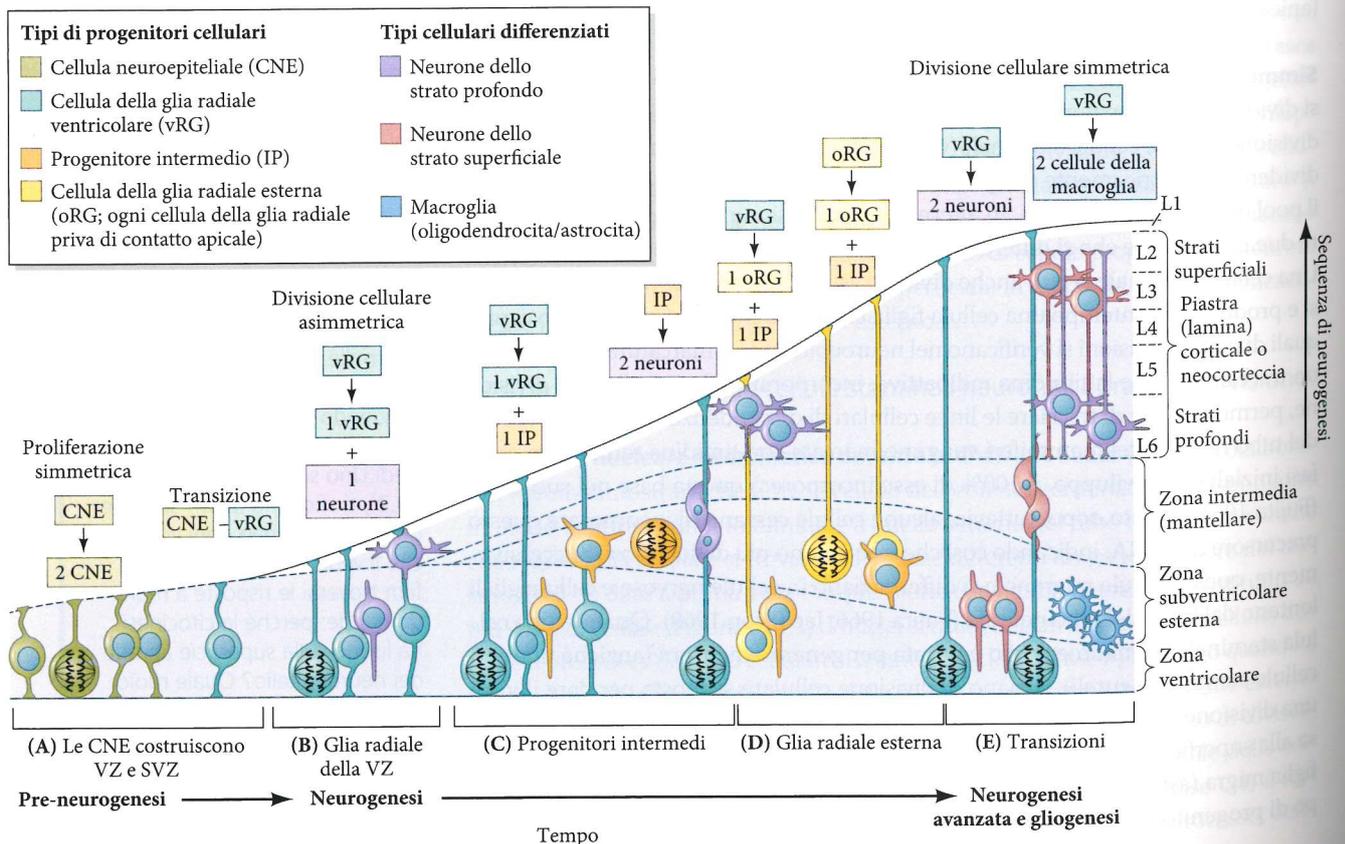
- La neurogenesi: una costruzione dal basso verso l'alto (o dall'interno verso l'esterno)

In una pubblicazione del 2008, Nicholas Gaiano riassume così il concetto di neurogenesi:

*La costruzione della neocorteccia nei mammiferi è probabilmente il più complesso processo biologico che avviene in Natura. Un pool di cellule staminali apparentemente omogeneo subisce prima un'espansione proliferativa, seguita da un'onda di diversificazione; solo dopo inizia la produzione delle successive coorti di neuroni. Non appena questi neuroni sono stati generati, si stabiliscono nella nascente lamina corticale dove si integrano all'interno del circuito neocorticale che si sta sviluppando. Il coordinamento spaziale e temporale della generazione neuronale, della migrazione e del differenziamento è strettamente regolato, ed è di fondamentale importanza per la generazione di un cervello maturo, capace cioè sia di elaborare e di reagire agli stimoli sensoriali provenienti dall'ambiente sia di un pensiero consapevole.*

Man mano che il tubo neurale matura, la progenie delle cellule staminali neuroepiteliali si trasforma in cellule radiali gliali. Solo da poco studi sulle discendenze cellulari hanno dimostrato come le cellule staminali neuronali siano soggette a divisioni simmetriche e asimmetriche (Malatesta et al. 2000, 2003; Miyata et al. 2001; Noctor et al. 2001; Anthony et al. 2004, Casper e McCarthy 2006; Johnson et al. 2016). Le divisioni della glia radiale avvengono nella **zona ventricolare** (la zona che riveste internamente il lume del ventricolo e quindi è a contatto con il fluido cerebro-spinale). Nel cervello, non appena le cellule progenitrici si delaminano dalla zona ventricolare, formano una **zona subventricolare** (o **sottoventricolare**) nella regione basale. Queste zone formano nel complesso gli strati germinali che generano i neuroni in grado di migrare nella piastra corticale e formare gli strati dei neuroni neocorticali (Figura 14.10A,B; Frantz et al. 1994, per rassegne esaurienti vedi Kriegstein e Alvarez-Buylla 2009; Lui et al. 2011; Kwan et al. 2012; Paridaen e Huttner 2014).

**FIGURA 14.10** Schema riassuntivo della neurogenesi nella corteccia cerebrale. (SVZ, zona subventricolare; VZ, zona ventricolare). (Modello basato su Kriegstein e Alvarez-Buylla 2009; Kwan et al. 2012; Paridaen e Huttner 2014.)



Una singola cellula staminale nello strato ventricolare dà quindi luogo a neuroni (e cellule gliali) in ogni strato della corteccia (Walsh e Cepko 1988). Esistono tre principali tipi di progenitori cellulari negli strati germinativi: le cellule della **glia radiale ventricolare** (*ventricular radial glia*, **vRG**), le cellule della **glia radiale esterna** (*outer radial glia*, **oRG**) e i **progenitori intermedi (IP)**. Durante le prime fasi dello sviluppo del SNC, le cellule neuroepiteliali si trasformano in cellule gliali radiali ventricolari che, come indica il loro stesso nome, si mantengono a contatto con la superficie luminale. Le cellule vRG agiscono come cellule staminali parentali e, oltre a generare direttamente i neuroni, daranno luogo a entrambi i tipi cellulari oRG e IP (**Figura 14.10C,D**). Le divisioni simmetriche autorinnovanti dominano la neurogenesi iniziale al fine di espandere il pool di progenitori, il cui differenziamento è governato più tardi dalle divisioni asimmetriche.

Le cellule oRG mantengono sempre un contatto tra il loro processo basale e la superficie piaiale; tuttavia, non sono più ancorate alla superficie apicale, e i loro somati si trovano nella zona subventricolare, rimanendo quindi in una posizione "esterna" rispetto alla vRG (Lui et al. 2011; Wang et al. 2011). Sia le cellule vRG che le oRG possono dividersi per produrre cellule IP (vedi Figura 14.10C,D). Le cellule IP hanno una capacità proliferativa limitata, e normalmente sono in grado di andare incontro a un solo ciclo di divisione; tuttavia, durante la neurogenesi, svolgono un ruolo cruciale come popolazione progenitrice per la espansione specifica di particolari linee cellulari. Si pensa che generalmente la potenzialità del tipo cellulare (cioè i tipi cellulari cui un progenitore può dar luogo) diventi più limitata nel passaggio da vRG a oRG, con le cellule IP che mostrano la maggiore restrizione di discendenza (Noctor et al. 2004; Lui et al. 2011).

**PARLANO GLI SCIENZIATI 14.1**   
 Segui la conferenza web del Dr. Arnold Kriegstein sulle cellule oRG e lo sviluppo della neocorteccia.

#### ● La glia come impalcatura per la stratificazione del cervelletto e della neocorteccia

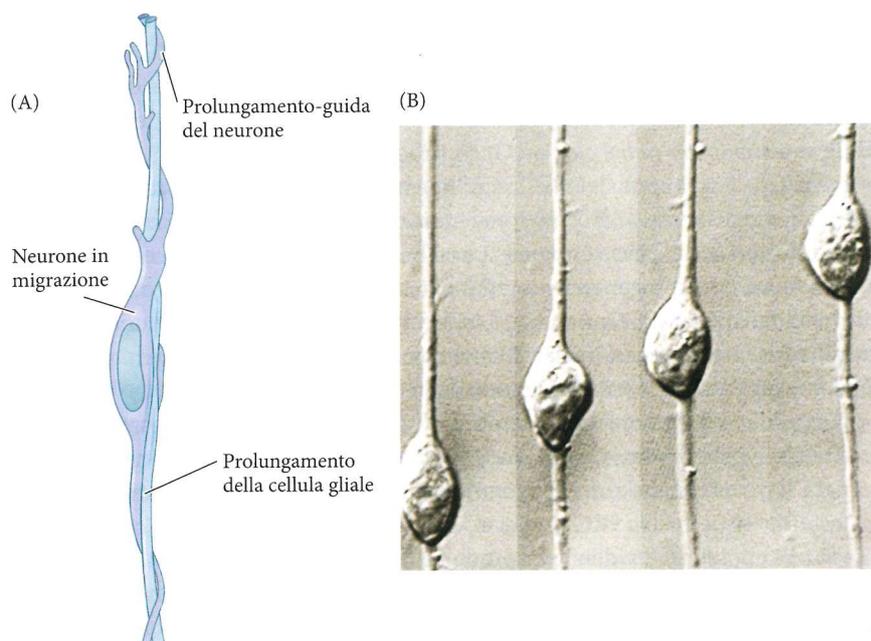
Tipi differenti di neuroni e cellule gliali hanno origine in momenti differenti. La marcatura delle cellule a tempi diversi durante lo sviluppo del cervello mostra come le cellule nate prima migrino per distanze più brevi; quelle di genesi più recente migrano invece più avanti in direzione apicale, per formare le regioni più superficiali della corteccia cerebrale. Il successivo differenziamento dipende dalle posizioni che i neuroni vanno a occupare una volta usciti dal neuroepitelio germinativo (Letourneau 1977; Jacobson 1991). Quali sono i meccanismi di sviluppo che governano questa evidente associazione fra la neurogenesi e il differenziamento lungo l'asse apico-basale del cervello?

È noto da lungo tempo che le cellule della glia radiale guidano i progenitori neurali dalla regione interna (lume) fino alle zone esterne del SNC (Rakic 1971). Quindi, le cellule progenitrici formatesi come progenie delle cellule della glia radiale utilizzano anche le connessioni delle cellule staminali loro "sorelle" tra le superfici luminali e quelle esterne per migrare nelle appropriate posizioni. Esamineremo i meccanismi della migrazione guidata dalla glia radiale nel cervelletto e nel cervello.

**La glia di Bergmann nel cervelletto** Un meccanismo che si ritiene sia importante nel determinare la posizione dei giovani neuroni nell'encefalo dei mammiferi in via di sviluppo è la **guida gliale** (Rakic 1972; Hatten 1990). In tutta la corteccia si osserva che i neuroni raggiungono le rispettive destinazioni spostandosi su una "monorotaia gliale". Nel cervelletto i precursori delle cellule dello strato dei granuli viaggiano sui lunghi prolungamenti della **glia di Bergmann**, un tipo di cellula gliale che estende uno o due sottili prolungamenti attraverso il neuroepitelio germinativo (vedi Figura 14.5B; Rakic e Sidman 1973; Rakic 1975). Come illustra la **Figura 14.11**, questa interazione tra neuroni e glia rappresenta una serie complessa e affascinante di eventi, che comporta il riconoscimento reciproco tra le cellule gliali e i neuroblasti (Hatten 1990; Komuro e Rakic 1992).

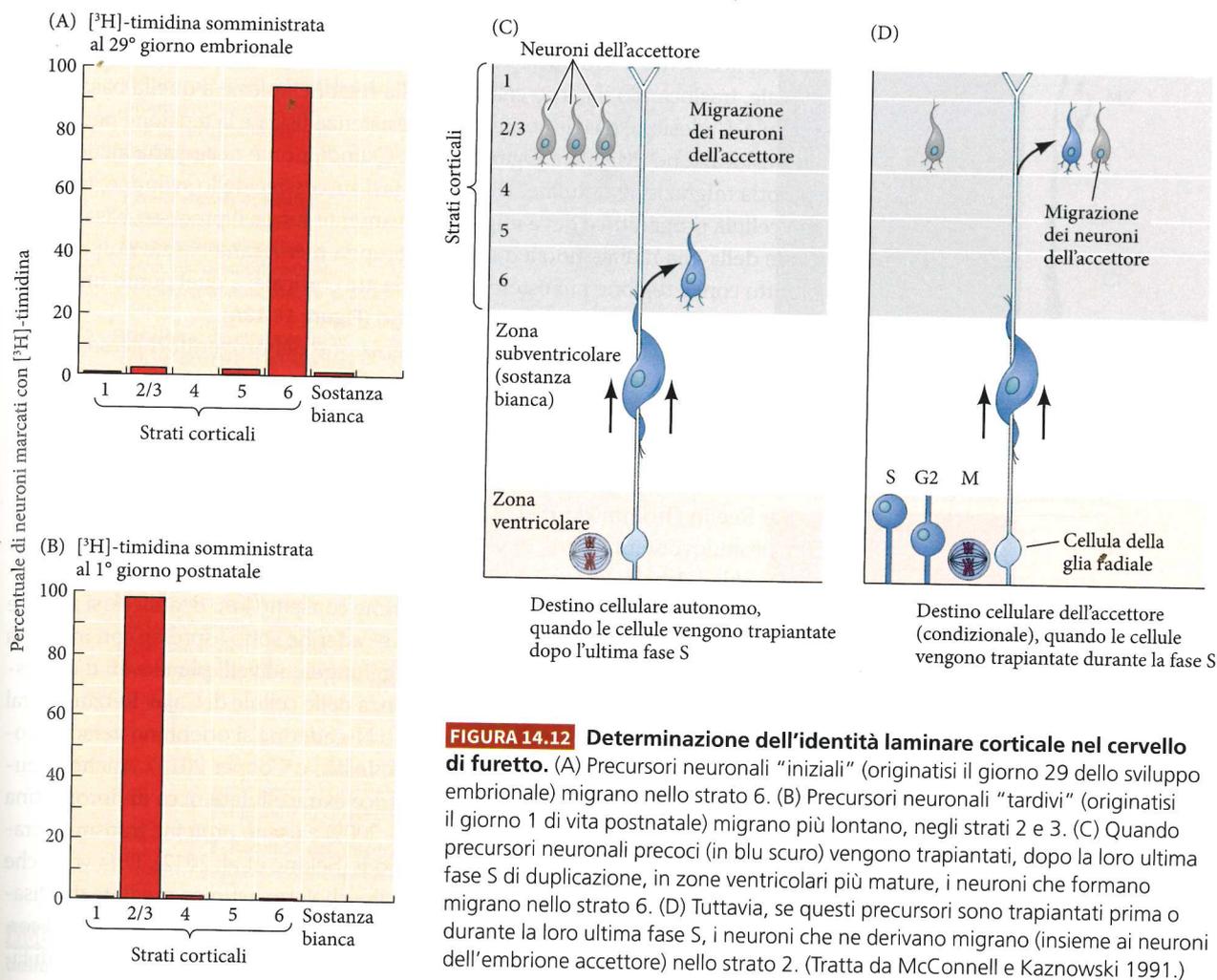
Sembra che la migrazione dei neuroni di nuova formazione comporti la per-

**FIGURA 14.11 Interazione neurone-glia nel topo.** (A) Illustrazione della migrazione di un neurone corticale lungo il prolungamento di una cellula gliale. (B) Sequenza fotografica di un neurone che migra lungo un prolungamento gliale nel cervelletto. Il prolungamento con cui il neurone avanza presenta diversi filopodi. Nel viaggiare lungo il prolungamento gliale, il neurone può raggiungere una velocità di circa 40 mm/ora. (A, tratta da Rakic 1975; B, tratta da Hatten 1990, fotografie per gentile concessione di M. Hatten.)



*dita* di quelle molecole di adesione che associavano il neurone alle cellule del tessuto germinativo, e l'*acquisizione* di una serie di molecole di adesione che lo associano invece alla glia (Famulski et al. 2010). Le molecole coinvolte in questa adesione sono state identificate in un certo numero di topi mutanti che non erano in grado di mantenersi in equilibrio; a questi son stati assegnati nomi come *reeler*, *staggerer* e *weaver* (in italiano *zigzagante*, *barcollante*, *incespicante*) che riflettevano i loro problemi di movimento (Falconer 1951). Nel cervello *reeler*, le cellule gliali sono prive della proteina della matrice extracellulare Reelin, che consente ai neuroni di connettersi con loro. Un'altra proteina di adesione, l'astrotactina, è necessaria ai neuroni dello strato dei granuli per mantenersi adesi al processo gliale. Se si maschera l'astrotactina di un neurone mediante anticorpi specifici per questa proteina, il neurone non potrà più aderire ai prolungamenti gliali (Edmondson et al. 1988; Fishell e Hatten 1991). La direzione di questa migrazione è regolata da una complessa serie di eventi, orchestrati dal **fattore neurotrofico derivato dal cervello** (*brain-derived neurotrophic factor*, **BDNF**), un fattore paracrina che viene prodotto dallo strato granulare interno (Zhou et al. 2007).

**La glia radiale nella neocorteccia** Nel cervello in via di sviluppo, per la maggior parte i neuroni generati nella zona ventricolare migrano verso l'esterno, lungo i processi della glia radiale, per formare la **piastra corticale** nei pressi della superficie esterna del cervello, dove danno luogo ai sei strati della neocorteccia. Come nel resto dell'encefalo, i neuroni nati prima formano lo strato più vicino al ventricolo (**Figura 14.12A,B**). I neuroni più tardivi viaggiano invece a maggiore distanza, formando gli strati più superficiali della corteccia. Questo processo genera un gradiente di sviluppo "da dentro verso fuori" (*inside-out*, Rakic 1974). McConnell e Kaznowski (1991) hanno dimostrato che la determinazione dell'identità laminare (cioè, in quale strato una cellula migra) avviene durante l'ultima divisione cellulare. Precursori neoformati dei neuroni, trapiantati dopo quest'ultima divisione da cervelli giovani (in cui formerebbero lo strato 6) in cervelli un po' più maturi, i cui neuroni in migrazione stanno formando lo strato 2, sono già determinati verso il loro destino e migrano soltanto nello strato 6. Se però le cellule vengono trapiantate prima della loro ultima divisione (a metà della fase S), esse non sono determinate e possono migrare anche nello strato 2 (**Figura 14.12C,D**). Il destino dei precursori neuronali è quindi maggiormente determinato nei cervelli più maturi. Mentre i precursori cellulari dei neuroni che si formano precocemente nel corso



**FIGURA 14.12** Determinazione dell'identità laminare corticale nel cervello di furetto. (A) Precursori neuronali "iniziali" (originatisi il giorno 29 dello sviluppo embrionale) migrano nello strato 6. (B) Precursori neuronali "tardivi" (originatisi il giorno 1 di vita postnatale) migrano più lontano, negli strati 2 e 3. (C) Quando precursori neuronali precoci (in blu scuro) vengono trapiantati, dopo la loro ultima fase S di duplicazione, in zone ventricolari più mature, i neuroni che formano migrano nello strato 6. (D) Tuttavia, se questi precursori sono trapiantati prima o durante la loro ultima fase S, i neuroni che ne derivano migrano (insieme ai neuroni dell'embrione accettore) nello strato 2. (Tratta da McConnell e Kaznowski 1991.)

dello sviluppo hanno la potenzialità di divenire qualunque neurone (per esempio, sia dello strato 2 che dello strato 6), i precursori formati più tardi danno invece origine soltanto a neuroni posti a livelli superiori (strato 2) (Frantz e McConnell 1996). Si ritiene che, una volta arrivate a destinazione, le cellule producano particolari molecole di adesione che le organizzano come nuclei cerebrali (Matsunami e Takeichi 1995).

- Meccanismi di trasduzione del segnale che regolano lo sviluppo della neocorteccia

**Le cellule di Cajal-Retzius: "bersagli mobili" nella neocorteccia** In che modo i progenitori neuronali migranti vengono segregati nello strato appropriato? Come detto sopra, i neuroni generati per primi vanno a costituire gli strati più profondi e quelli generati successivamente formano gli strati più superficiali. *Pensateci bene*. Questo vuol dire che il cervello si accresce dall'interno verso l'esterno. Il risultato di un tale accrescimento direzionale è che per ogni nuovo strato che si espande, la superficie piale esterna si allontana dalla superficie ventricolare. Pertanto, la superficie piale costituisce un confine esterno in continua espansione e i neuroni che si muovono verso l'esterno devono viaggiare più a lungo rispetto ai loro predecessori. Queste importanti dinamiche influenzano in ultimo la stratificazione cerebrale (vedi Frotscher 2010).

Quando le superfici piali e luminale sono relativamente ravvicinate nelle prime fasi dello sviluppo della neocorteccia, un neurone di nuova genesi estende i suoi

filopodi basali verso la superficie piaie, stabilendo un contatto adesivo, e poi sposta semplicemente il suo nucleo e il citoplasma a esso associato verso la superficie piaie, traslocando il corpo cellulare dalla regione apicale a quella basale della cellula. L'adesione basale conferisce la resistenza fisica e la tensione necessarie alla traslocazione (Miyata e Ogawa 2007). Quindi, non è necessaria alcuna vera e propria migrazione cellulare. Durante le fasi successive dello sviluppo, tuttavia, ogni cellula progenitrice deve migrare attivamente lungo il processo basale delle cellule della glia radiale fino a quando la propria membrana basale non entra in contatto con la regione più esterna della piastra corticale: a quel punto una semplice traslocazione può completare il viaggio (Figura 14.13A).

Le cellule che influenzano questa migrazione dei progenitori verso l'esterno sono le **cellule di Cajal-Retzius**, che si trovano sotto la superficie piaie e secernono la proteina extracellulare Reelin, ossia la stessa proteina citata in precedenza come regolatrice della stratificazione cerebellare (D'Arcangelo et al. 1995, 1997). Le cellule progenitrici in traslocazione esprimono recettori transmembrana per Reelin (Trommsdorff et al. 1999) e quando questi recettori si legano a Reelin, promuovono una serie di vie di trasduzione del segnale mediate dall'enzima Disabled-1 (vedi Figura 14.13A, cellula 1). In conseguenza di ciò, le cellule incrementano l'espressione di N-caderina, il che consente loro di attaccarsi ad altre cellule anch'esse esprimenti N-caderina. Le caderine sono espresse con intensità crescente dalla zona ventricolare fino a raggiungere i livelli più elevati d'espressione nella zona marginale, in corrispondenza delle cellule di Cajal-Retzius. In tal modo, i neuroni neoformati che esprimono N-caderina si orientano verso regioni di maggior adesione (Franco et al. 2011; Jossin e Cooper 2011). Anche i neuroni estendono i loro filopodi verso la matrice extracellulare ricca di fibronectina che si trova sulla superficie piaie (Chai et al. 2009) e usano proteine transmembrana chiamate integrine per ancorarvi i filopodi (Sekine et al. 2012). Una volta che questi si sono ancorati, la regolazione del citoscheletro actinico mediata da Disabled-1 spinge la contrazione dei filopodi in un movimento a molla, tirando il corpo cellulare in avanti via via che l'estremità apicale della cellula si stacca (vedi Figura 14.13A, cellula 2; Miyata e Ogawa 2007).

Lo stesso segnale Reelin, che dà inizio a questa migrazione, innesca anche una retroazione negativa tale che a livelli di concentrazione più elevati di Reelin (nei pressi della zona marginale) i neuroni perdono le loro molecole di adesione e si integrano negli strati della piastra corticale in modo progressivo dall'interno verso l'esterno (vedi Figura 14.13A, cellula 2; Feng et al. 2007). La perdita di *Reelin*, dei suoi recettori o di *Disabled-1*, dà luogo a una inversione della stratificazione corticale: i neuroni di norma presenti negli strati interni (strati 4 e 5) si posizionano in prossimità della zona marginale (strato 1), mentre quando questi geni sono inattivati le cellule degli strati esterni (strati 2 e 3) si rinvengono presso la piastra (Figura 14.13B,C; Olson et al. 2006; Franco et al. 2011; Sekine et al. 2011).

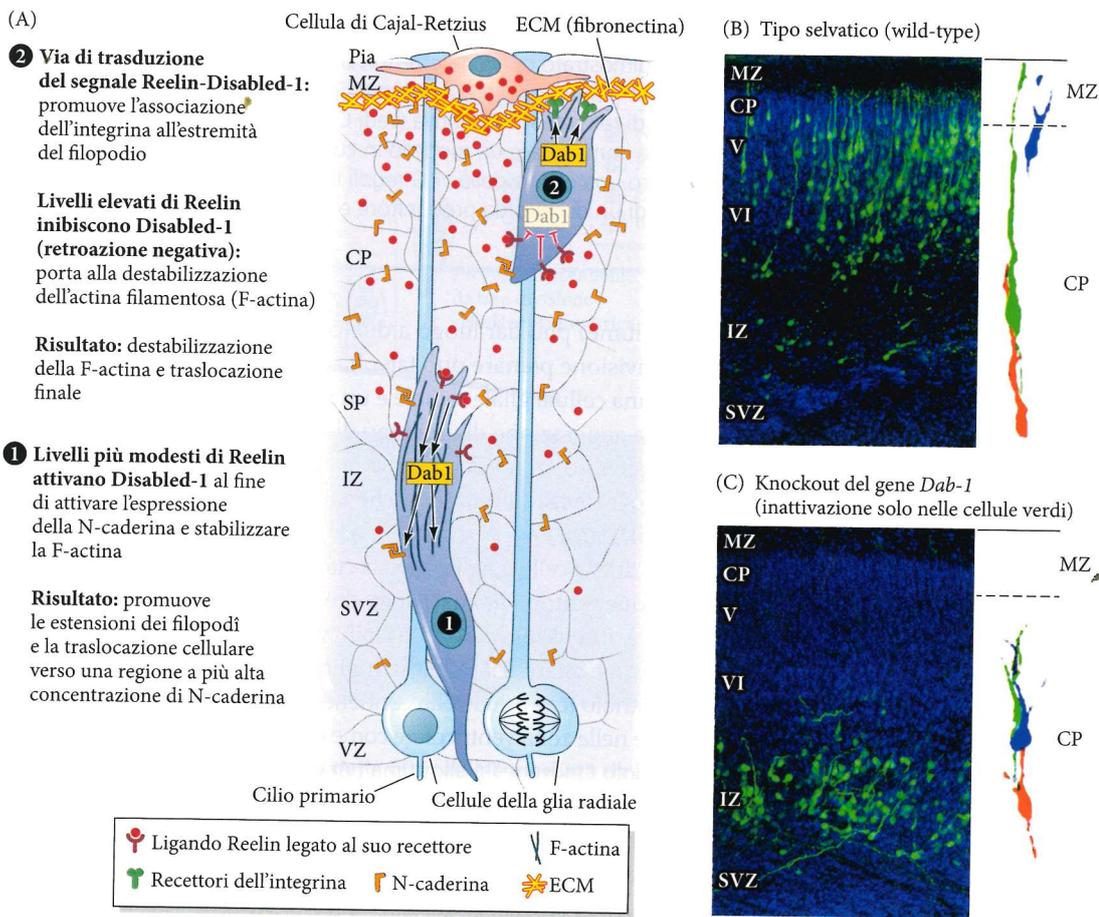
■ **UNO SGUARDO ALLO SVILUPPO 14.3**   
Osserva la morfologia dei neuroblasti che migrano tardivamente quando traslocano verso le cellule di Cajal-Retzius.

■ **WEB TOPIC 14.1**   
**Differenzamento neuronale versus gliale**  
Esplora il ruolo dei fattori neurotrofici nella regolazione del differenziamento dei progenitori corticali in neuroni o in glia: un meccanismo rivelatore.

■ **WEB TOPIC 14.2**   
**Specificazione orizzontale e verticale del cervello**  
Né l'organizzazione verticale né quella orizzontale della corteccia cerebrale è specificata clonalmente. La migrazione cellulare è fondamentale e i fattori paracrini secreti dalle cellule vicine svolgono un ruolo importante nella migrazione e nella specificazione.

### ? DOMANDE DELLO SVILUPPO

È stato dimostrato quanto la N-caderina sia importante per la migrazione dei progenitori neuronali nella neocorteccia, ma come svolge questo ruolo? Le cellule lungo l'asse apico-basale presentano livelli crescenti di espressione delle caderine che sembrano aprire la strada verso lo strato successivo, ma si ritiene che di solito le caderine svolgano un ruolo nell'adesione differenziale e nella selezione cellulare. Possono queste capacità di selezione guidare il movimento dei progenitori neuronali verso la zona marginale, proprio come accade per la E-caderina nella gastrula di zebrafish (vedi Capitolo 4)? In un'interessante ricerca, l'analisi dell'intero trascrittoma delle diverse zone proliferative della neocorteccia murina e umana ha rivelato un elevato livello d'espressione dei geni dell'adesione cellulare e della matrice extracellulare (Fietz et al. 2012), lasciandoci intuire come l'utilizzo dell'adesione cellulare rappresenti probabilmente un meccanismo complesso e fondamentale ai fini della stratificazione corticale.



**FIGURA 14.13** Modello della regolazione da parte di Reelin della migrazione neuronale guidata.

(A) Secreta dalle cellule di Cajal-Retzius, la proteina Reelin (pallini rossi) viene distribuita lungo un gradiente nella matrice extracellulare. Reelin istruisce i neuroni migratori appena generati (marcati con 1 e 2) a estendere filopodi dalla loro membrana basale verso la superficie pia. *Disabled-1* (*Dab1*) è attivato da Reelin; il prodotto del gene *Dab1* stabilizza l'actina filamentosa (F-actina) e aumenta l'espressione della N-caderina. La N-caderina è anche localizzata sulle membrane delle fibre della glia radiale e di altre cellule in tutto l'epitelio, e si rinviene in concentrazioni più elevate nella zona marginale. Un segnale iniziale Reelin-Dab1 produce un'estensione del filopodio verso la zona marginale e la traslocazione del neurone 1. In un neurone migrante che si avvicina alla zona marginale (cellula 2), *Dab1* regola positivamente l'espressione delle integrine sull'apice del filopodio, per ancorare la cellula alla matrice extracellulare, ricca di fibronectina. Tuttavia, a concentrazioni di Reelin più elevate, viene attivato un meccanismo di retroazione negativa che inibisce *Dab1* mediante degradazione proteica (cellula 2), ponendo fine alla migrazione e consentendo il differenziamento cellulare all'interno dello strato corticale specificato. (B, C) Inattivazione condizionale di *Dab1* in neuroni di nuova formazione e progenitori in migrazione. In questo

esperimento sono stati utilizzati due ceppi di topi, un topo di tipo selvatico e un ceppo che presenta una mutazione condizionale del gene *Dab1*, attivabile solo in combinazione con un secondo gene (codificante la ricombinasi *CRE*). *CRE* non ha alcun effetto sui topi wild-type. Un plasmide che porta *CRE* e *GFP* è stato introdotto nelle cellule progenitrici dei due ceppi murini. Le cellule che hanno ricevuto il plasmide sono identificabili grazie alla loro espressione di GFP (in verde). (B) Il controllo di tipo selvatico mostra come le cellule progenitrici trattate raggiungano con successo lo strato della piastra corticale. (C) Nel mutante condizionale di *Dab1*, *Dab1* viene eliminato (knockout) nelle cellule verdi (che contengono *CRE* e esprimono GFP). Queste cellule permangono nella zona intermedia. La videoripresa in *time-lapse* di una singola cellula dimostra come una tipica cellula progenitrice dia inizio al suo allungamento migratorio (in rosso), quindi estenda il suo processo basale verso la zona marginale (in verde) e infine trasferisca il compartimento apicale agli strati esterni (in blu) (B, disegno sulla destra). L'immagine mostra che la migrazione viene avviata anche nelle cellule knockout per *Dab1*, ma queste non riescono a produrre estensioni basali efficaci, né mostrano segni di traslocazione. (C, disegno sulla destra). (B, C, tratte da Franco et al. 2011.)

**Essere o non essere... una cellula staminale, un progenitore o un neurone?** Se una cellula della glia radiale va incontro a una divisione simmetrica anziché asimmetrica dipende dal piano di divisione (che a sua volta dipende dall'orientamento del fuso mitotico) ed è funzionale al tipo di progenie generata. Una citocinesina che divide la cellula della glia radiale lungo un piano perfettamente perpendicolare (planare) alla superficie luminale (cioè, allineando il fuso mitotico paral-

### ? DOMANDE DELLO SVILUPPO

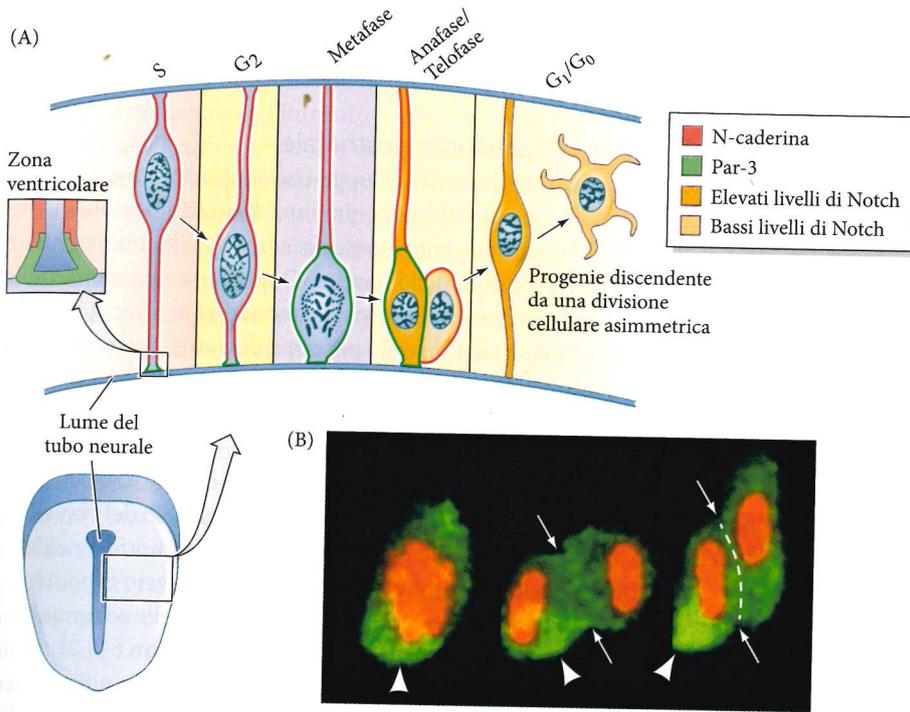
È stato dimostrato come gli effettori trascrizionali di Notch della famiglia Hes presentino periodi oscillatori di espressione genica nella vRG, a causa di un meccanismo di retroazione negativa (vedi Capitoli 4 e 17; Shimojo et al. 2008). È interessante immaginare un modello in cui il numero di oscillazioni Notch-Hes cui va incontro una cellula della vRG regoli il suo sviluppo tra autorinnovamento, acquisizione di un destino da progenitore e differenziamento (Paridaen e Huttner 2014).

lelemente al lume) può dar luogo a due cellule staminali gliali (Xie et al. 2013). Questa suddivisione planare può talvolta produrre anche una progenie diversificata, ossia una cellula gliale radiale e un neurone; tuttavia, in genere questo è il risultato della generazione di un piano di divisione obliquo. Quando il fuso mitotico viene alterato, in modo tale che la citocinesi si verifichi lungo assi casuali, aumentano le divisioni asimmetriche iniziali e si induce una neurogenesi precoce (Xie et al. 2013).

Il destino di una cellula figlia dopo la citocinesi è associato al centriolo che questa eredita. I due centrioli in una cellula che si divide non sono gli stessi in relazione alla loro età: il centriolo parentale è più "vecchio" (centriolo madre) del centriolo figlio che si forma quando il primo si duplica. A ogni divisione, la cellula ricevente il "vecchio" centriolo (che a sua volta contiene proteine diverse rispetto al nuovo centriolo) rimane nella zona ventricolare come cellula staminale, mentre la cellula ricevente il centriolo "giovane" si allontana per differenziarsi (Wang et al. 2009). Questi due centrioli sono legati a diverse proteine e strutture, il che si traduce in una localizzazione asimmetrica di quei fattori che influenzano l'espressione genica e il destino cellulare. Di particolare importanza è il cilio primario, che rimane associato al vecchio centriolo durante la divisione cellulare. La cellula figlia che eredita il vecchio centriolo insieme al cilio primario può esporre il cilio primario nel lume più rapidamente e, di conseguenza, nel fluido cerebrospinale. Quest'ultimo contiene fattori quali i fattori di crescita simili all'insulina, FGF e Sonic hedgehog, che inducono la proliferazione e la segnalazione cellulare utili a mantenere il suo destino di cellula staminale della glia radiale (Lehtinen et al. 2011; Paridaen et al.). La cellula figlia che eredita il centriolo più giovane finirà per formare un nuovo cilio primario. Questo cilio, tuttavia, si estenderà a partire dal processo basale della cellula piuttosto che dalla sua superficie apicale e riceverà una serie diversa di segnali, in grado di influenzare il suo sviluppo verso un progenitore o un neurone (Wilsch-Brauninger et al. 2012).

Un altro meccanismo coinvolto nella determinazione del destino delle cellule derivate da una divisione asimmetrica di una cellula staminale della glia radiale consiste nella distribuzione della proteina apicale Par-3 (Figura 14.14A). In generale, Par-3 mantiene la polarità apico-basale delle cellule. Nello sviluppo del cervello, Par-3 recluta nella parte apicale della cellula un complesso che può segregare fattori in grado di indurre un certo destino cellulare, come le proteine di segnalazione Notch. In una divisione asimmetrica, una cellula figlia riceve più molecole di Par-3 rispetto all'altra (Figura 14.14B). La cellula figlia che riceve più Par-3 svilupperà un'elevata attività di segnalazione Notch e rimarrà una cellula staminale. L'altra cellula figlia esprimerà elevate quantità della proteina Delta (ricordiamoci che Delta è il recettore di Notch), predisponendosi verso un differenziamento neuronale (Bultje et al. 2009).

Una tale separazione fra elevata o ridotta attività di Notch è dovuta direttamente al co-trasporto con Par-3 di Numb, l'inibitore di Notch. Sebbene sia poco intuitivo immaginare il reclutamento di questo inibitore in una cellula staminale che richiede elevate concentrazioni di Notch, Par-3 effettivamente sequestra e disattiva la funzione di Numb. Cellule figlie prive di Par3 presentano una proteina Numb attivata liberamente, che agisce per ridurre la concentrazione di Notch consentendo pertanto un destino cellulare alternativo (mediato da Delta) (Gaiano et al. 2000; Rasin et al. 2007; Bultje et al. 2009).



**FIGURA 14.14** La divisione asimmetrica della glia radiale mediata da Par3 e Notch.

(A) Schema della sezione di un tubo neurale di pollo, che mostra la posizione del nucleo e della proteina Par-3 in una cellula della glia radiale in funzione del ciclo cellulare. Le cellule mitotiche si trovano vicino alla superficie interna del tubo neurale, adiacenti al lume. La distribuzione dinamica della proteina Par-3 in queste cellule staminali luminali regola la sintesi dei componenti della via Notch di trasduzione del segnale nella membrana cellulare della cellula figlia. Alla mitosi, Par-3 si localizza principalmente su una delle due cellule figlie. Quella cellula figlia esprimerà livelli elevati di Notch e rimarrà cellula staminale. La cellula che riceve meno Par-3 esprimerà Notch a livelli più modesti e diventerà una cellula progenitrice neuronale. (B) La fusione del gene *Par3* con il gene reporter *GFP* consente la visualizzazione del movimento della proteina Par3 durante la divisione cellulare, come si vede in questo caso nel romboencefalo di un embrione di zebrafish. Par3 (in verde chiaro) è isolato soprattutto nella cellula figlia a sinistra (freccia) in seguito a una divisione asimmetrica. Come illustrato in (A), questa cellula rimarrà cellula staminale. (A, tratta da Bultje et al. 2009, Lui et al. 2001; B, tratta da Alexandre et al. 2010.)

## Sviluppo del cervello umano

Ci sono molte differenze tra l'uomo e i suoi parenti più prossimi, come scimpanzé e bonobo (Prüfer et al. 2012). Per esempio, noi non abbiamo peli così lunghi, la nostra pelle è in grado di sudare e assumiamo una postura bipede per camminare. Il maschio della specie umana è privo anche dell'osso del pene e delle spine cheratiniche penili che caratterizzano i genitali esterni di altri primati maschi. Tuttavia, le più sorprendenti e significative differenze si osservano nel cervello. L'enorme crescita e asimmetria della neocorteccia umana e la nostra capacità di ragionare, ricordare, pianificare il futuro, imparare le lingue e acquisire competenze culturali rendono unici gli esseri umani nel Regno animale (Varki et al. 2008). Lo sviluppo della neocorteccia dell'uomo è straordinariamente plastico e rappresenta un "lavoro in corso" pressoché continuo. Sono stati individuati vari fenomeni che distinguono lo sviluppo del cervello umano, in parte condivisi con altri primati, da quello di altre specie.

- L'importante convoluzione della corteccia cerebrale.
- L'attività di geni per l'RNA specifici dell'uomo.

- L'alta attività trascrizionale.
- L'esistenza di alleli specifici dell'uomo per i geni regolatori dello sviluppo.
- La continua maturazione del cervello in età adulta.

#### • Il ritmo fetale della crescita neurale postnatale

Se esiste un'importante caratteristica dello sviluppo che contraddistingue l'uomo dal resto del Regno animale, questa è il mantenimento di un ritmo fetale di crescita neurale. Il cervello delle scimmie antropomorfe, come quello umano, ha un elevato ritmo di accrescimento prima della nascita. Dopo la nascita, però, nelle scimmie antropomorfe questo ritmo rallenta vistosamente; al contrario, l'uomo presenta un rapido accrescimento del cervello per circa due anni ancora dopo la nascita (Figura 14.15A; Martin 1990; vedi Leigh 2004). Portmann (1941), Montagu (1962) e Gould (1977) hanno tutti affermato che, nel primo anno di vita, siamo essenzialmente dei "feti extrauterini".

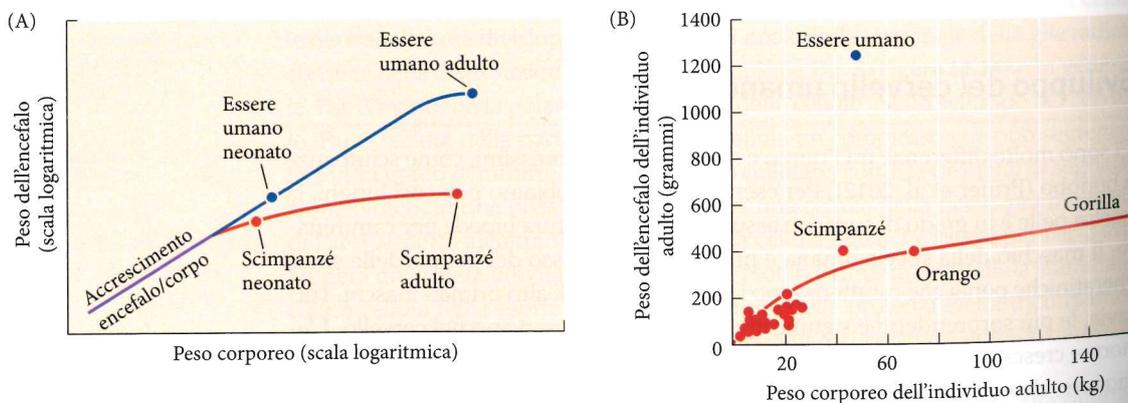
Durante il primo sviluppo postnatale, noi ci arricchiamo di circa 250 000 neuroni al minuto (Purves e Lichtman 1985). Anche il rapporto tra peso del cervello e peso totale del corpo alla nascita è simile nelle scimmie antropomorfe e nell'uomo. Tuttavia, all'epoca in cui gli individui umani sono adulti, questo rapporto è, nell'uomo, letteralmente "fuori scala", essendo 3,5 volte quello delle scimmie antropomorfe (Figura 14.15B; Bogin 1997). La nostra gestazione effettiva è di 21 mesi, se si seguono i parametri di maturità delle scimmie antropomorfe. La nostra "nascita prematura" è un compromesso trovato dall'evoluzione tra l'ampiezza della pelvi materna, la circonferenza della testa e la maturità dei polmoni del neonato. Il meccanismo utile al mantenimento di un ritmo fetale di crescita neurale è stato definito **ipermorfosi**, il prolungamento filetico dello sviluppo oltre il suo stato ancestrale (Vrba 1996; Vinicius e Lahr 2003).

Oltre ai neuroni prodotti dopo la nascita, anche il numero delle sinapsi aumenta in modo enorme. A livello cellulare, si osserva che nei primi due anni di vita dell'uomo si formano non meno di 30 000 sinapsi *al secondo*, per cm<sup>3</sup> di corteccia (Rose 1998; Barinaga 2003). Si ritiene che i nuovi neuroni e la rapida proliferazione delle connessioni neurali rendano possibili la plasticità e l'apprendimento, creino un enorme potenziale di immagazzinamento di nuovi ricordi e ci consentano di sviluppare il linguaggio, l'umore, la creatività musicale, cioè tutte quelle capacità che ci rendono umani.

#### ■ WEB TOPIC 14.3

##### La crescita neuronale e l'invenzione dell'infanzia

Secondo un'ipotesi interessante i requisiti calorici dell'iniziale crescita cerebrale hanno reso necessaria l'evoluzione di una nuova fase del ciclo umano della vita, l'infanzia, durante la quale il bambino è attivamente accudito e nutrito dagli adulti.



**FIGURA 14.15** Crescita del cervello nei primati. (A) Mentre gli altri primati, come lo scimpanzé, completano la proliferazione dei loro neuroni più o meno al momento della nascita, nell'uomo i neuroni del neonato continuano a proliferare con lo stesso ritmo dei neuroni del cervello fetale. (B) Nell'uomo, il rapporto peso del cervello/peso del corpo (indice di encefalizzazione) è circa 3,5 volte quello delle scimmie antropomorfe. (Tratta da Bogin 1997; vedi anche la quantificazione più recente eseguita da Herculano-Houzel 2012 e Herculano-Houzel et al. 2015.)

- **Le colline elevano gli orizzonti della conoscenza**

Una caratteristica particolarmente importante della corteccia cerebrale, associata all'evoluzione del cervello umano, è rappresentata dal numero e dall'intricato profilo delle colline e valli del cervello, ossia i *giri* e i *solchi* che definiscono le sue convoluzioni (Hofman 1985). Nei mammiferi si osserva una certa diversità tra specie nel numero e nella complessità delle convoluzioni corticali; per esempio, la corteccia cerebrale è altamente convoluta negli esseri umani e negli elefanti (è, quindi, **girencefalica**), è solo moderatamente girencefalica nei furetti ed è priva di convoluzioni (è **lissencefalica**) nei topi (**Figura 14.16**). La vastità e la complessità della convoluzione sono elementi associati di solito al livello di intelligenza<sup>3</sup> e rappresentano pertanto un significativo adattamento, ottimizzato in modo unico nel cervello umano. Quali sono i meccanismi di convoluzione corticale che possono contribuire alla diversità dei cervelli più convoluti, che si osservano fra i mammiferi?

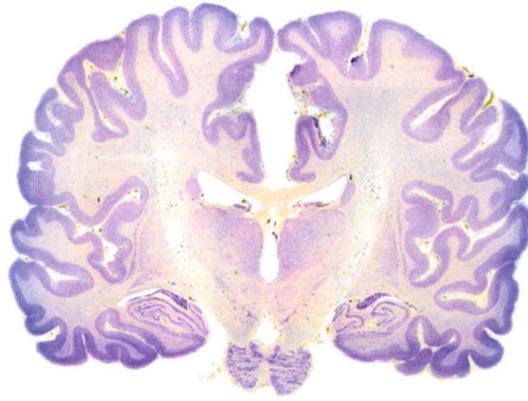
Non sorprende che lo studio delle convoluzioni corticali sia impegnativo, poiché queste si possono osservare esclusivamente in gruppi di mammiferi molto difficili da analizzare in laboratorio. Tuttavia, ricerche recenti condotte sull'architettura della corteccia dei mammiferi, insieme ad analisi genomiche, hanno iniziato a svelarne la storia (come trattato in Lewitus et al. 2013). È sorprendente come l'aumento delle convoluzioni corticali non sia necessariamente associato a un aumento del numero di neuroni nella corteccia cerebrale, sebbene sia invece correlato all'aumento della superficie cerebrale. In un recente studio, si è messo a punto un modello della complessa convoluzione corticale, ponendola a confronto con la carta stropicciata e dimostrando così che, quando l'area superficiale totale si espande a una velocità superiore a quella con cui si accresce lo spessore della corteccia (o dei fogli di carta), si ha la girencefalia (Mota e Herculano-Houzel 2015). In linea con questa osservazione, i cervelli più grandi tendono a contenere più convoluzioni di quelli più piccoli. Inoltre, nella patologia umana definita pachigiria, il cervello presenta un numero inferiore di convoluzioni e una ridotta superficie, nonostante si abbia un normale numero di neuroni (Ross e Walsh 2001).

Le cellule che potrebbero rappresentare i miglior candidati nel fornire la forza meccanica per la generazione delle convoluzioni sono le cellule della glia radiale. Ricordiamoci che, oltre a funzionare come cellule staminali, le cellule della glia radiale si estendono per tutto lo spessore della corteccia cerebrale, fornendo un'impalcatura strutturale che può generare forze meccaniche. È interessante notare come vi sia una percentuale maggiore di cellule proliferative della glia radiale (in particolare, della glia radiale esterna) nei cervelli girencefalici rispetto a quelli lissencefalici. Tuttavia, nei cervelli girencefalici, la distribuzione e l'organizzazione delle cellule della glia radiale in relazione ai giri e ai solchi sono appropriate per generare la tensione necessaria alla convoluzione (**Figura 14.17** e Uno sguardo allo sviluppo 14.4; Hansen et al. 2010; Shitamukai et al. 2011, Wang et al. 2015). Nell'insieme, l'aumento delle cellule della oRG e la biomeccanica delle loro fibre radiali forniscono forti indicazioni a favore del coinvolgimento diretto delle cellule della glia radiale nei meccanismi della convoluzione corticale evolutisi nel tempo.

Grazie a studi ulteriori in cui sono stati analizzati interi trascrittomi (mRNA totali espressi dai geni di un organismo) si è scoperta l'esistenza di un'altra correlazione tra le cellule della glia radiale e la convoluzione corticale negli esseri ma-

<sup>3</sup> Questo criterio non è corretto; i delfini e le balene, per esempio, presentano una maggiore quantità di convoluzioni corticali rispetto agli esseri umani.

(A) Essere umano

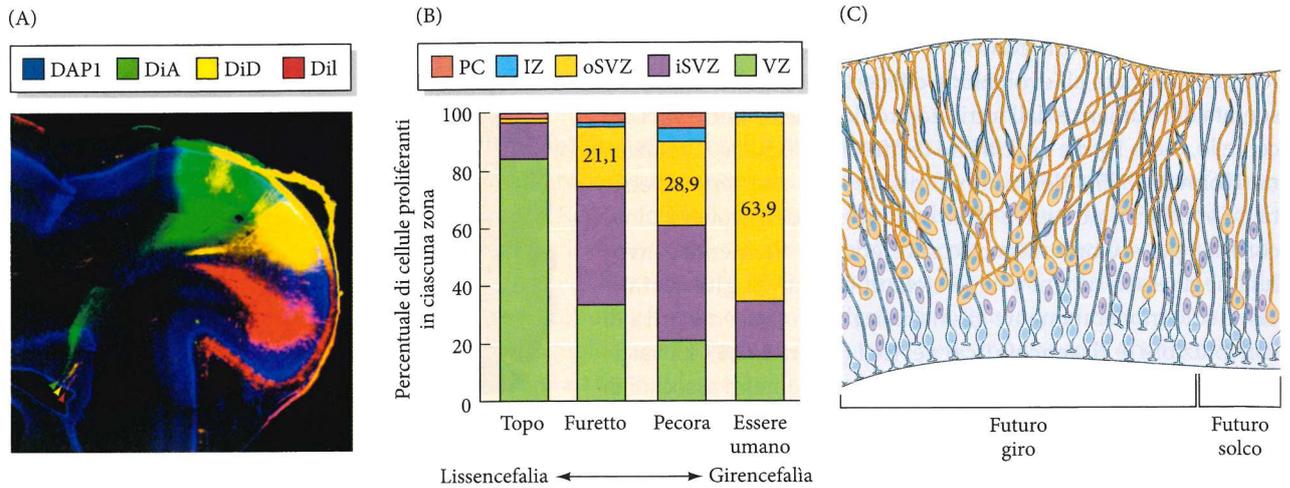


(B) Topo



**FIGURA 14.16** Sezioni trasversali del cervello umano e di topo. La colorazione di Nissl marca i nuclei del cervello umano girencefalico (A) e del cervello di topo lissencefalico (B). (Tratta da Lui et al. 2011.)

■ **UNO SGUARDO ALLO SVILUPPO 14.4**  Questo filmato segue le cellule della oRG umana via via che vanno incontro a divisione mitotica, traslocando nella neocorteccia.



**FIGURA 14.17** Caratterizzazione dell'orientamento a ventaglio della glia radiale, durante la formazione delle convoluzioni corticali nella neocorteccia del furetto.

(A) Tracciamento retrogrado delle cellule della glia radiale nella neocorteccia del furetto, nel corso di neurogenesi e girificazione. Si noti la distribuzione a forma di triangolo delle cellule fluorescenti (marcate mediante colorazione con i traccianti lipofilici DiA, DiD e Dil, N.d.T.), che indica una progressiva apertura a ventaglio delle fibre radiali lungo l'asse apico-basale (le punte di freccia in basso a sinistra indicano stretti raggruppamenti con deposizione di cristalli del colorante, in corrispondenza della superficie luminale, rispetto all'estrema ampiezza di ogni area di marcatura alla superficie piaie); i nuclei sono marcati con il colorante DAPI. (B) Quantificazione delle cellule mitotiche

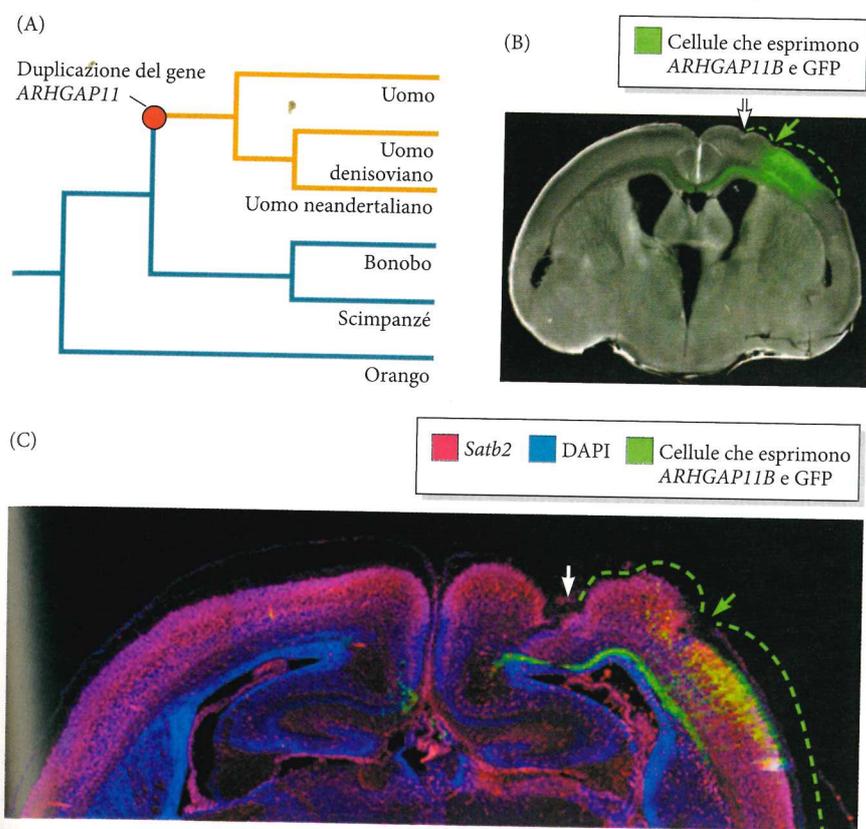
nelle diverse regioni del cervello di specie lissencefaliche e girencefaliche. I cervelli più girencefalici mostrano percentuali più alte di cellule proliferanti nella zona subventricolare esterna (outer subventricular zone, oSVZ), ossia la stessa regione che ospita più cellule della glia radiale esterna rispetto alle specie lissencefaliche. PC: piastra corticale; IZ: zona intermedia; iSVZ: zona subventricolare interna; VZ: zona ventricolare. (C) L'orientamento delle fibre ventricolari (in blu) e delle fibre della glia radiale esterna (in arancione) nelle regioni che formeranno un giro e un solco. Le cellule della glia radiale esterna sono raffigurate per mostrare le fibre orientate più obliquamente, un'organizzazione strutturale proposta per spiegare il meccanismo di formazione di un giro. (A, B, tratte da Reillo et al. 2011; C, tratta da Lewitus et al. 2013.)

ni (Florio et al. 2015; Johnson et al. 2015; Pollen et al. 2015). Per esempio, Walsh e colleghi (vedi Johnson et al. 2015) hanno confrontato i trascrittomi delle differenti glie radiali di esseri umani e topi. Si è così scoperto che le cellule della glia radiale esterna degli esseri umani mostrano un'espressione differenziale dei geni coinvolti nella via di segnalazione dello ione calcio, nelle transizioni epitelio-mesenchimali, nella migrazione cellulare e nell'attivazione specifica della neurogenina, un regolatore trascrizionale proneurale.

L'identificazione del gene *ARHGAP11B* ha focalizzato ulteriormente l'attenzione sul ruolo peculiare che le cellule della glia radiale esterna possono svolgere nello sviluppo della corteccia umana. Questo gene si rinviene *esclusivamente* negli esseri umani ed è espresso *specificamente* nelle cellule della glia radiale (e non nei neuroni corticali). Quando Huttner e colleghi hanno introdotto il gene *ARHGAP11B*, mediante elettroporazione, nella corteccia del cervello di un topo in via di sviluppo (normalmente lissencefalica), questa ha sviluppato pliche simili ai giri (Figura 14.18). Il meccanismo esatto con cui l'espressione di *ARHGAP11B* determina la formazione delle convoluzioni corticali non è ancora chiaro, ma sem-

### ? DOMANDE DELLO SVILUPPO

Se le cellule della oRG sono in grado di applicare tensioni sulla superficie piaie e promuovere la formazione delle convoluzioni corticali, forse qualcosa trattiene la loro estremità apicale all'interno della zona subventricolare al fine di conferire la resistenza necessaria alla convoluzione del tessuto. Che cosa tiene ancora unite queste cellule della oRG, dato che la differenza fondamentale tra le cellule staminali e le cellule della vRG è la mancanza di un ancoraggio alla superficie luminale? Quanta forza di trazione è necessaria per ripiegare la corteccia?



**FIGURA 14.18** *ARHGAP11B* è un gene umano evolutivamente nuovo che può indurre la formazione dei giri (e quindi delle convoluzioni) nella corteccia del topo. (A) Albero filogenetico dei primati che indica il punto della linea di discendenza umana in cui il gene *ARHGAP11B* è comparso, attraverso una duplicazione parziale del gene *ARHGAP11A*. (B) Sezione trasversale di un cervello di topo che mostra l'espressione di GFP (in verde) in cellule sottoposte a elettroporazione *in utero* con una costruzione genetica codificante sia GFP che *ARHGAP11B*. (C) Immunomarcatura ottenuta utilizzando un marcatore per la neocorteccia (*Satb2*, in rosso) in un topo sottoposto a elettroporazione con *ARHGAP11B* (in verde); i nuclei sono marcati con DAPI (in blu). Le linee tratteggiate in (B) e (C) indicano le pliche (i giri) indotte; le frecce indicano i relativi solchi. (Tratta da Florio et al. 2015.)

bra essere associato a un aumento specifico e significativo del numero di cellule della glia radiale esterna che viene prodotto (Florio et al. 2015). Questa scoperta è di particolare importanza per la nostra comprensione dell'evoluzione del cervello umano. Il gene *ARHGAP11B* è emerso negli esseri umani grazie a una duplicazione parziale di *ARHGAP11A* (un gene che si rinviene in generale negli animali) ed è apparso nella discendenza umana quando i primi ominidi si sono separati dalla discendenza degli scimpanzé (vedi Figura 14.18A).

#### • Geni per la crescita neuronale

Quali altri geni oltre ad *ARHGAP11B* ci distinguono dai nostri parenti più vicini, gli scimpanzé e i bonobo? Gli esseri umani e queste due specie di primati non umani hanno genomi straordinariamente simili. Quando i tratti di DNA codificanti proteine sono messi a confronto, siamo identici per circa il 99%. Tuttavia, le regioni codificanti proteine comprendono più o meno solo un 2% del genoma. Quando si confrontano i genomi nel complesso, uomo e scimpanzé differiscono per circa il 4% delle loro sequenze, e la maggior parte delle differenze si trova in regioni non codificanti (vedi Varki et al. 2008). Nel 1975, King e Wilson trassero così le conclusioni dai loro studi sulle proteine umane e quelle dello scimpanzé: «Le differenze organismiche tra scimpanzé e uomo deriverebbero principalmente da variazioni genetiche di pochi sistemi di regolazione, mentre le sostituzioni aminoacidiche in generale sarebbero solo raramente un fattore chiave alla base dei principali cambiamenti adattativi». Era una delle prime indicazioni che l'evoluzione potesse aver luogo attraverso modificazioni dei geni regolativi dello sviluppo.

Sebbene ci siano alcuni geni dell'accrescimento del cervello (per esempio, *ASPM*, anche detto *microcephalin-5*, e *microcephalin-1*) le cui sequenze differiscono tra uomini e scimmie antropomorfe, queste differenze non sono state mai correlate con l'enorme crescita del cervello umano. Al contrario, le differenze fondamentali possono risiedere nelle sequenze del DNA che controllano questi geni. Tali sequenze si trovano nelle regioni enhancer del DNA o nel DNA che produce

#### ■ WEB TOPIC 14.4

**La parola, il linguaggio e il gene *FOXP2***  
Negli esseri umani, individui con mutazioni del gene *FOXP2* presentano gravi problemi di linguaggio. Gli scienziati stanno studiando i possibili ruoli di questo gene nell'apprendimento del linguaggio nella specie umana a confronto con altri primati.

■ **PARLANO GLI SCIENZIATI 14.2**   
 Segui la conferenza web della Dr.ssa Sofie Salama sul gene *HAR1* e lo sviluppo del cervello umano.

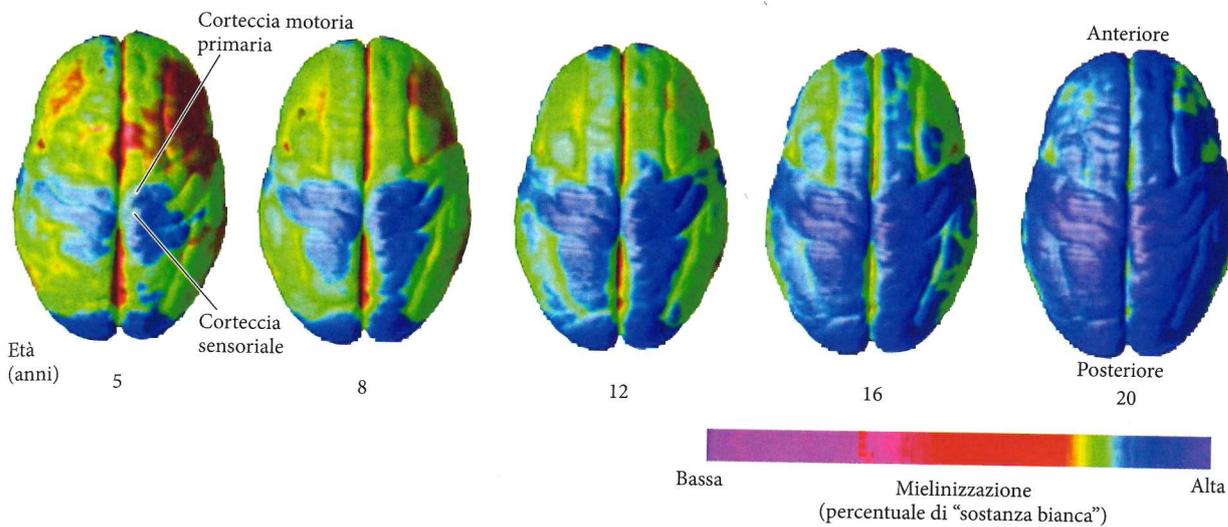
RNA non codificanti. Gli RNA non codificanti sono espressi ad alti livelli nel cervello in via di sviluppo e, sebbene non producano di per sé proteine, possono regolare la trascrizione o la traduzione di fattori di trascrizione neuronali. Un'analisi al computer, condotta allo scopo di confrontare fra loro diversi genomi di mammifero, ha contribuito all'identificazione dei geni per gli RNA non codificanti che potrebbero aver svolto un ruolo importante nell'evoluzione del cervello umano (Pollard et al. 2006a,b; Prabhakar et al. 2006). In primo luogo, tramite questi studi è stato identificato un gruppo relativamente piccolo di regioni di DNA non codificante che sono conservate tra i mammiferi, ma non nell'uomo. Esse rappresentano circa il 2% del genoma e si è ipotizzato che, proprio perché si sono conservate attraverso l'evoluzione dei mammiferi, svolgano un ruolo determinante.

In questi studi si sono poi poste a confronto queste sequenze con le loro omologhe umane per verificare se ognuna di queste regioni fosse mutata tra l'uomo e gli altri mammiferi. Sono state così identificate 50 regioni nelle quali la sequenza è molto conservata tra i mammiferi ma si è differenziata rapidamente tra l'uomo e lo scimpanzé. La divergenza più veloce si osserva nella sequenza *HAR1* (*human accelerated region-1*; regione umana a evoluzione accelerata), per la quale si osservano 18 variazioni di sequenza tra lo scimpanzé e l'uomo laddove ci si aspetterebbe, basandosi sull'evoluzione dei mammiferi, una o nessuna variazione. *HAR1* è espresso nell'encefalo in via di sviluppo dell'uomo e delle scimmie antropomorfe, specialmente nei neuroni di Cajal-Retzius, esprimenti Reelin, che sono responsabili di guidare la migrazione neuronale durante la formazione dei sei strati della neocorteccia (vedi Figura 14.13. Le ricerche per scoprire la funzione di *HAR1*, e di altri geni HAR che sono conservati nelle regioni non codificanti del genoma, sono ancora in corso.

Una ricerca simile per le delezioni specifiche del DNA umano nei genomi dei primati ha consentito l'identificazione di alcuni promettenti candidati. Tenendo a mente che l'inattivazione di un inibitore equivale all'attivazione di un attivatore (si pensi alla via Wnt o al cancello del tipo doppio negativo nei blastomeri del riccio di mare), McLean e colleghi (2011) hanno identificato ben 510 sequenze presenti nei genomi degli scimpanzé e di altri mammiferi, ma non negli esseri umani. Una di queste delezioni è nell'enhancer specifico per il prosencefalo del gene *GADD45G*. Questo gene codifica un soppressore della crescita cellulare che di norma si esprime nella regione ventrale del prosencefalo in scimpanzé e topi, ma non negli esseri umani. Quando un gene reporter viene associato a un enhancer di *GADD45G* di scimpanzé e la costruzione genetica viene poi introdotta in un embrione di topo, *GADD45G* viene espresso nel cervello murino. Tuttavia, quando lo stesso reporter è fuso all'enhancer umano di *GADD45G*, non viene espresso nel cervello umano, dimostrando che l'enhancer umano di *GADD45G* agisce per reprimere un soppressore (il gene *GADD45G*).

- **Elevata attività trascrizionale**

Negli anni Settanta, A. C. Wilson suggerì che le differenze tra uomo e scimpanzé potrebbero risiedere nella *quantità* delle proteine prodotte dai loro geni (vedi Gibbons 1998), ed effettivamente esistono ora alcune prove a favore di questa ipotesi. Mediante la tecnica dei microarray, usata per studiare i profili globali dell'espressione genica, molte recenti ricerche hanno messo in luce che sebbene la quantità e i tipi di geni espressi nel fegato e nel sangue dell'uomo e dello scimpanzé siano in effetti estremamente simili, tuttavia, il *cervello* umano produce mRNA in misura oltre cinque volte maggiore rispetto al cervello dello scimpanzé (Enard et al. 2002a; Preuss et al. 2004). Nell'uomo, la trascrizione di alcuni geni (come *SPTLC1*, un gene la cui assenza danneggia i nervi sensoriali) è più elevata di 18 volte rispetto all'espressione degli stessi geni nella corteccia dello scimpanzé, mentre alti geni (come *DDX17*, il cui prodotto è coinvolto nella maturazione dell'RNA) sono espressi dieci volte meno nella corteccia dell'uomo rispetto a quella dello scimpanzé.



### • Il cervello dell'età adolescenziale: connesso e scatenato

Fino a poco tempo fa, la maggior parte degli studiosi riteneva che, dopo la crescita iniziale dei neuroni nello sviluppo fetale e nella prima infanzia, non vi fossero più periodi di rapida proliferazione neurale. Tuttavia, studi di analisi per immagini in risonanza magnetica (*magnetic resonance imaging*, MRI) hanno dimostrato che il cervello continua a svilupparsi fin verso la pubertà, e che non tutte le aree del cervello maturano contemporaneamente (Giedd et al. 1999; Sowell et al. 1999). Inoltre, subito dopo la pubertà, l'accrescimento neuronale cessa e inizia una cosiddetta "potatura". Questa è associata al momento in cui l'acquisizione del linguaggio diviene più difficile (e questo potrebbe essere il motivo per il quale i bambini imparano le lingue più rapidamente degli adulti). In questo periodo, si ha inoltre un'ondata di produzione della mielina (la "sostanza bianca" delle cellule gliali che avvolge gli assoni dei neuroni). La mielinizzazione ha importanza cruciale per il corretto funzionamento delle aree nervose e, sebbene questo processo continui nel corso dell'età adulta, le differenze maggiori tra il cervello all'inizio della pubertà e quello all'inizio dell'età adulta (Lebel e Bealieu 2011) interessano la corteccia frontale (Figura 14.19; Sowell et al. 1999; Gogtay et al. 2004). Queste differenze nello sviluppo del cervello possono spiegare le risposte estreme che gli adolescenti hanno a determinati stimoli, così come la loro abilità (o incapacità) nell'apprendere certi compiti.

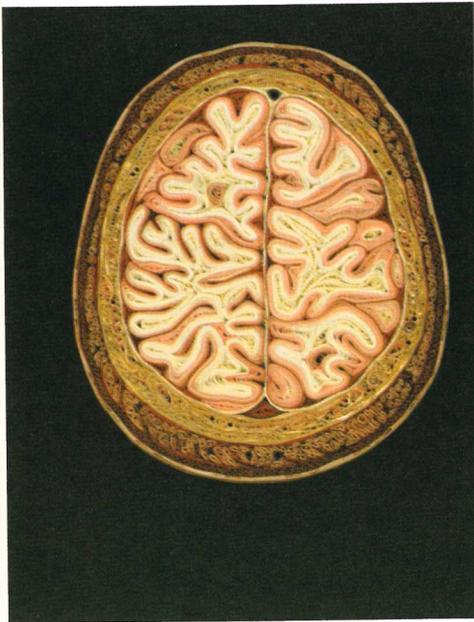
Quando gli studi di MRI funzionale prendevano in esame il cervello di soggetti ai quali venivano mostrate su un monitor immagini che evocavano emozioni, i giovani adolescenti attivavano l'amigdala, un centro del cervello che media la paura e le forti emozioni. Quando le stesse immagini venivano mostrate ad adolescenti più grandi, la loro attività cerebrale era massimamente concentrata nel lobo frontale, un'area coinvolta in percezioni più ragionate (Baird et al. 1999; Luna et al. 2001). Questi dati sono stati per lo più ottenuti grazie a studi che pongono a confronto diversi gruppi di individui. Migliorando la tecnologia, tuttavia, si sta cominciando a registrare la maturazione cerebrale di un singolo individuo nel corso del tempo (Dosenbach et al. 2010). Il cervello degli adolescenti è quindi un'entità complicatissima e dinamica che, come tutti i genitori sanno, non è facile da comprendere. Ma una volta superati questi anni, il cervello adulto che ne risulta è capace di prendere decisioni ragionate, anche nell'impeto di situazioni emotivamente coinvolgenti.

### IL PROSSIMO PASSO DELLA RICERCA

Le nostre conoscenze sulla nicchia delle cellule staminali embrionali neuronali sono ancora abbastanza superficiali. A differenza del midollo spinale, una struttura relativamente semplice, la complessità del cervello ha reso più difficile formulare

**FIGURA 14.19** Vista dorsale del cervello umano. È rappresentato il procedere della mielinizzazione (deposizione della "sostanza bianca") sulla superficie corticale durante l'adolescenza. (Immagine per gentile concessione di N. Gogtay.)

un modello globale che integrasse tutti le componenti, i tipi cellulari, le modalità di divisione cellulare, una miriade di regolatori molecolari, forze fisiche, network di regolazione genica e modificatori epigenetici. Questa sfida si allarga quando si aggiungono gli elementi temporali e il movimento cellulare. Possiamo di certo acquisire qualche informazione ulteriore studiando modelli più semplici dello sviluppo del cervello, sia negli invertebrati come *C. elegans* e *Drosophila*, sia nei vertebrati come *Xenopus* e zebrafish.



### ● CONSIDERAZIONI FINALI SULLA FOTO DI APERTURA

*La complessità di essere umani: quanto profondamente si ripiega?* I nostri cervelli grandi e convoluti sono parte di ciò che ci rende umani. Questa immagine è la fotografia di una scultura di Lisa Nilsson, che ha ripiegato in modo intricato della carta colorata per realizzare sezioni anatomiche di organi umani, in questo caso le pliche o convoluzioni del cervello (<http://lisanilssonart.com/home.html>). Al di là della sua bellezza, si tratta di una rappresentazione artistica proprio di quella ricerca che ha messo a punto un modello di convoluzione corticale a partire dalla carta stropicciata, discusso in questo capitolo. Inoltre, avete imparato che l'aumento del numero di tipi di cellule staminali nella corteccia e le modificazioni di un'esclusiva espressione genica (per esempio, *HAR1* e *ARHGAP11B*) costituiscono alcuni dei principali contributi alla complessità del cervello umano e sono alla base della sua evoluzione. Infine, durante l'età adulta, il cervello umano continua a crescere e si sviluppa in quella struttura fortemente mielinizzata, così straordinaria da diventare un vero e proprio oggetto d'arte. (Fotografia per gentile concessione di Lisa Nilsson).

## ★ ISTANTANEA DEL CAPITOLO

### Lo sviluppo dell'encefalo

1. I dendriti ricevono segnali da altri neuroni, mentre gli assoni trasmettono segnali ad altri neuroni ancora. La sinapsi è l'intervallo tra le cellule a livello del quale i segnali vengono trasferiti da un neurone all'altro (mediante il rilascio di neurotrasmettitori). Nel SNC è presente un vastissimo assortimento di diverse morfologie neuronali.
2. I tipi cellulari della macroglia nel SNC sono: astroglia (astrociti), oligodendrociti (cellule mieliniche) e microglia (cellule immunitarie del sistema nervoso).
3. Le cellule della glia radiale fungono da cellule staminali neuronali nel cervello embrionale e fetale. Attualmente si ritiene che l'uomo possa continuare a produrre neuroni per tutta la vita, anche se a un ritmo ben lontano da quello fetale.
4. I neuroni dell'encefalo si organizzano in corteccia (strati) e in nuclei (raggruppamenti).
5. Nuovi neuroni si formano per divisione delle cellule staminali neuronali (cellule neuroepiteliali, cellule della glia radiale) nella parete del tubo neurale (detta zona ventricolare). I precursori neurali, o neuroblasti, così formati possono migrare fuori dalla zona ventricolare e formare un nuovo strato, detto zona mantellare (sostanza grigia). I neuroni che si formano in seguito devono migrare attraverso gli strati già esistenti. Questo processo dà origine ai vari strati corticali.
6. I neuroni di nuova formazione e le cellule progenitrici migrano dalla zona ventricolare sui processi delle cellule della glia radiale.
7. Nel cervelletto, neuroni migranti formano una seconda zona germinativa, lo strato esterno dei granuli.
8. La corteccia cerebrale nei mammiferi, denominata neocorteccia, possiede sei strati. Ogni strato differisce nella funzione e nel tipo di neuroni posizionati al suo interno.
9. La glia radiale ventricolare dà origine alle cellule della glia radiale esterna, che popolano la zona subventricolare. Entrambe le popolazioni staminali possono anche generare progenitori intermedi, capaci essi stessi di ulteriori divisioni asimmetriche e simmetriche.
10. Sia nel cervelletto che nel cervello, la proteina Reelin una volta secreta guida la migrazione dei neuroni

verso il corretto strato superficiale in una crescita progressiva "verso l'esterno", mediante la regolazione dell'espressione di N-caderina e integrina.

11. La ripartizione asimmetrica di Par-3 durante la divisione delle cellule della glia radiale limita il segnale Notch attivo all'interno della glia radiale ventricolare per promuovere la staminalità in una cellula figlia, mentre l'attività di Delta nell'altra cellula figlia promuove il differenziamento.
12. Il numero e la complessità di giri e solchi (convoluzioni) della neocorteccia sono correlati con

il livello di intelligenza. Gli esseri umani presentano un'estesa convoluzione della corteccia (girencefalía). Le cellule della glia radiale svolgono probabilmente un ruolo importante nello sviluppo di queste convoluzioni.

13. Il cervello umano differisce da quello degli altri primati per il perdurare nella prima infanzia di un ritmo fetale di crescita dei neuroni, per l'entità dell'attività trascrizionale, per la presenza di alleli specifici per l'uomo di geni regolativi dello sviluppo, e per la perdita di regolatori trascrizionali.

## Ulteriori letture

- Alexandre, P., A. M. Reugels, D. Barker, E. Blanc e J. D. Clarke. 2010. Neurons derive from the more apical daughter in asymmetric divisions in the zebrafish neural tube. *Nature Neurosci.* 13: 673-679.
- Azevedo, F. A. et al. 2009. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J. Comp. Neurol.* 513: 532-541.
- Bentivoglio, M. e P. Mazzarello. 1999. The history of radial glia. *Brain Res. Bull.* 49: 305-315.
- Bultje, R. S., D. R. Castaneda-Castellanos, L. Y. Jan, Y. N. Jan, A. R. Kriegstein e S. H. Shi. 2009. Mammalian Par3 regulates progenitor cell asymmetric division via Notch signaling in the developing neocortex. *Neuron* 63: 189-202.
- Casper, K. B. e K. D. McCarthy. 2006. GFAP-positive progenitor cells produce neurons and oligodendrocytes throughout the CNS. *Mol. Cell. Neurosci.* 31: 676-684.
- Eriksson, P. S., E. Perfilieva, T. Björn-Eriksson, A.-M. Alborn, C. Nordberg, D. A. Peterson e F. H. Gage. 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Med.* 4: 1313-1317.
- Fuentealba, L. C., S. B. Rompani, J. I. Parraguez, K. Obernier, R. Romero, C. L. Cepko e A. Alvarez-Buylla. 2015. Embryonic origin of postnatal neural stem cells. *Cell* 161: 1644-1655.
- Hatten, M. E. 1990. Riding the glial monorail: A common mechanism for glial-guided neuronal migration in different regions of the mammalian brain. *Trends Neurosci.* 13: 179-184.
- Kwan, K. Y., N. Sestan e E. S. Anton. 2012. Transcriptional co-regulation of neuronal migration and laminar identity in the neocortex. *Development* 139: 1535-1546.
- Lewitus, E., I. Kelava e W. B. Huttner. 2013. Conical expansion of the outer subventricular zone and the role of neocortical folding in evolution and development. *Front. Hum. Neurosci.* 7: 424.
- Mota, B. e S. Herculano-Houzel. 2015. Cortical folding scales universally with surface area and thickness, not number of neurons. *Science* 349: 74-77.
- McLean, C. Y. et al. 2011. Human-specific loss of regulatory DNA and the evolution of human-specific traits. *Nature* 471: 216-219.
- Paridaen, J. T., M. Wilsch-Brauninger e W. B. Huttner. 2013. Asymmetric inheritance of centrosome-associated primary cilium membrane directs ciliogenesis after cell division. *Cell* 155: 333-344.
- Paridaen, J. T. e W. B. Huttner. 2014. Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. *EMBO Rep.* 15: 351-364.
- Pollen, A. A. et al. 2015. Molecular identity of human outer radial glia during cortical development. *Cell* 163: 55-67.
- Sekine, K. et al. 2012. Reelin controls neuronal positioning by promoting cell-matrix adhesion via inside-out activation of integrin  $\alpha 5 \beta 1$ . *Neuron* 76: 353-369.
- Trommsdorff, M. et al. 1999. Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell* 97: 689-701.
- Varki, A., D. H. Geschwind ed E. E. Eichler. 2008. Explaining human uniqueness: Genome interactions with environment, behaviour, and culture. *Nature Rev. Genet.* 9: 749-763.