

Organogenesi del sistema nervoso periferico

Gabriella Nicolini

Introduzione

Lo sviluppo embriologico del sistema nervoso periferico (SNP) è un processo molto complesso, regolato in modo preciso al fine di permettere una maturazione armonica e coordinata con quella del sistema nervoso centrale (SNC) al quale è connesso. La conoscenza delle varie fasi di questo sviluppo è essenziale per la comprensione di diverse malattie e dei meccanismi che vengono utilizzati dal SNP adulto e maturo per recuperare da condizioni patologiche acquisite. In questo Capitolo vengono quindi affrontate in modo sequenziale le fasi di sviluppo e maturazione delle diverse componenti del SNP, descrivendo le complesse interazioni molecolari che le governano e le guidano. A questo proposito si segnala che per la denominazione di queste molecole verrà mantenuta la forma anglosassone, dalla quale derivano gli acronimi con i quali esse vengono comunemente indicate.

Dalla gastrulazione al tubo neurale

Al termine della seconda settimana di sviluppo embrionale il prodotto del concepimento è costituito da un **disco bilaminare** (formato da **epiblasto** e **ipoblasto**) disposto tra la **cavità amniotica** e il **sacco vitellino definitivo**. L'embrione bilaminare è quindi costituito da cellule con potenzialità differenti ma ancora prive di una collocazione spaziale specifica. Nel corso della terza settimana di sviluppo embrionale, attraverso il processo della **gastrulazione** (chiamata anche transizione epitelio-mesenchimale), si passa dal disco bilaminare al **disco trilaminare**. Le cellule che costituiscono i tre foglietti embrionali (endoderma definitivo, ectoderma e mesoderma) vengono completamente riorganizzate da un punto di vista spaziale dando il via al successivo differenziamento. La migrazione delle cellule dei tre foglietti embrionali è controllata mediante la regolazione dell'espressione genica. Al 15° giorno di sviluppo embrionale (E15), la prima evidenza morfologica della gastrulazione è la comparsa, nella regione che poi diventerà caudo-posteriore, della **linea primitiva** (Fig. 1.1). Quest'ultima si presenta come un ispessimento che cresce in direzione

caudocraniale grazie alla migrazione di cellule dell'epiblasto dalla periferia del disco embrionale all'asse centrale. Mentre la linea primitiva si accresce in direzione caudocraniale, le cellule si invaginano ventralmente formando il **solco primitivo** e nella porzione più cefalica della linea primitiva la **fossetta primitiva (nodo di Hensen o nodo cefalico)**. Un primo contingente di cellule che si invaginano nel solco primitivo si intercala tra le cellule dell'ipoblasto andando a sostituirlo e a formare l'**endoderma definitivo**. Il secondo contingente di cellule che si introflettono nel solco primitivo, invece, subisce il fenomeno noto come **transizione epitelio-mesenchimale**, andando a disporsi tra endoderma definitivo ed **ectoderma definitivo** (costituito dalle cellule epiblastiche che non sono migrate a formare la linea primitiva) e formando così il terzo foglietto embrionale, il **mesoderma intraembrionale**. Durante la transizione epitelio-mesenchimale le cellule dell'epiblasto che migrano nel solco primitivo smettono di esprimere alcune proteine coinvolte nelle giunzioni occludenti che tengono unite le cellule dell'epiblasto; in particolare si blocca l'espressione della caderina E. Le cellule che vanno a costituire il mesoderma intraembrionale producono elevate quantità di acido ialuronico. Le cellule mesodermiche si frappongono tra l'endoderma definitivo e l'ectoderma definitivo tranne che a livello della **membrana buccofaringea** e della **membrana cloacale** (si veda Fig. 1.1). La migrazione delle cellule mesodermiche è maggiore nella regione che diventerà la regione rostrale (cefalica) dell'embrione.

Le cellule che migrano dalla porzione più rostrale del nodo di Hensen danno luogo alla **notocorda**, struttura embriologica fondamentale per l'induzione del tubo neurale. La notocorda è una struttura mesodermica piena che si estende dal nodo di Hensen in direzione cefalica e che raggiunge la sua massima lunghezza intorno al 20° giorno di vita embrionale arrestandosi caudalmente alla membrana buccofaringea. Una volta formata la notocorda funge da induttore molecolare del **tubo neurale** (induzione della **neurulazione primaria**). In un primo momento (a partire dal 17° giorno di sviluppo embrionale) la notocorda determina l'ispessimento delle cellule poste nella regione ectodermica corrispondente alla notocorda stessa. Si forma così la **placca neurale (neuroectoderma)** che si differenzia dal resto dell'ectoderma (**ectoderma di rivestimento**). Mentre i bordi (**pieghe neurali**) si sollevano, nella placca

neurale si forma una depressione (**solco neurale**). La placca neurale diventa così la **doccia neurale**. Le pieghe neurali a partire dal 18° giorno di sviluppo embrionale si avvicinano e infine si fondono sulla linea mediana. Il processo comincia a livello della regione in cui successivamente si formerà il midollo allungato per poi procedere sia cefalicamente sia caudalmente. La fusione delle pieghe neurali sulla linea mediana determina la formazione del **tubo neurale**, precursore del SNC (encefalo e midollo spinale) (si veda Fig. 1.1). Il neuroporo cefalico e il neuroporo caudale si chiudono rispettivamente al 24° e al 28° giorno di sviluppo embrionale.

L'induzione della neurulazione primaria è regolata principalmente dalla modulazione dell'espressione della Bone Morphogenetic Protein (BMP-4). Le proteine secretorie noggin (NOG), chordin (CHRD) e follistatin (FST) espresse dalle

cellule della notocorda inibiscono l'attività di BMP-4 a livello della placca neurale. Il differenziamento della regione più caudale della placca neurale (da cui si differenzierà il romboencefalo e il midollo spinale) richiede la produzione da parte della notocorda anche di acido retinoico, Wnt-3a e Fibroblast Growth Factor 2 (FGF-2). Al contrario nelle cellule dell'ectoderma di rivestimento (che si differenzierà nell'epidermide) che non subiscono l'induzione molecolare della notocorda, BMP-4 rimane attivo.

Una volta differenziato il neuroectoderma, il successivo ripiegamento delle pieghe neurali e la loro fusione sulla linea mediana richiedono l'espressione delle proteine integrali di membrana N-caderina e N-CAM da parte delle cellule di entrambe le pieghe. Queste proteine permettono il riconoscimento cellulare e la conseguente chiusura del tubo neurale.

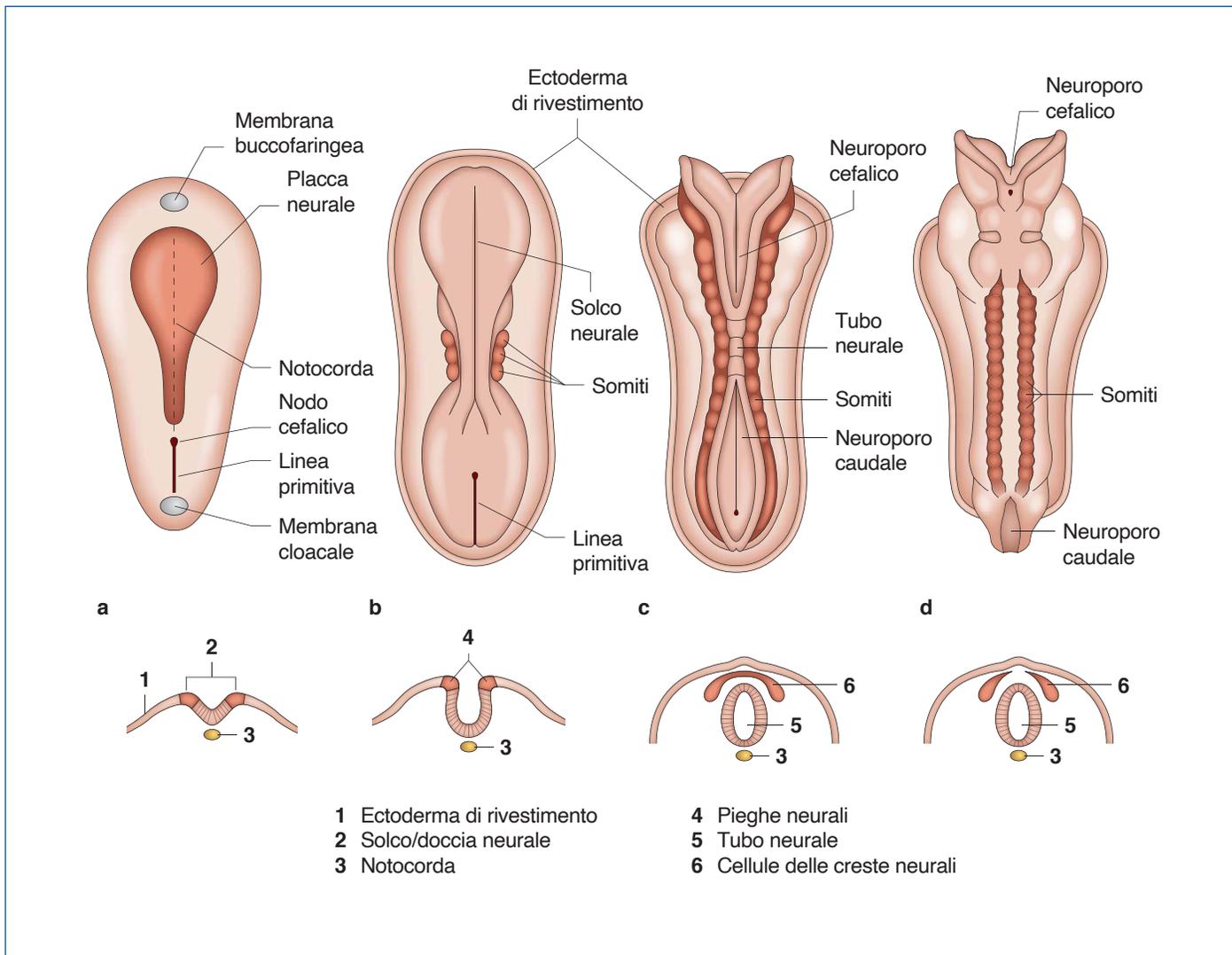


Figura 1.1 Neurulazione primaria e cellule delle creste neurali (terza-quarta settimana di sviluppo embrionale). Durante la terza settimana di sviluppo con la formazione della linea primitiva ha inizio la gastrulazione attraverso la quale si forma il mesoderma intraembrionale e in particolare la notocorda. L'ectoderma dorsale sotto l'influenza molecolare della notocorda si ispessisce formando la placca neurale (a). Con il sollevamento delle pieghe neurali si evidenzia il solco neurale che diventando più evidente diventa doccia neurale (b). A partire dal 18° giorno di sviluppo embrionale le pieghe neurali si fondono sulla linea mediana costituendo il tubo neurale. Con la chiusura del tubo neurale l'embrione viene a essere rivestito dall'ectoderma di rivestimento (c). Quando le pieghe neurali si sollevano e si fondono, le cellule del bordo laterale del neuroectoderma migrano come cellule delle creste neurali (c-d). Entro la quarta settimana di sviluppo embrionale si chiudono sia il neuroporo cefalico che quello caudale (d).

Cellule delle creste neurali

Le **cellule delle creste neurali** (CCN) sono una popolazione cellulare multipotente che si differenzia precocemente durante la chiusura del tubo neurale nella sua porzione più dorsale e per tutta la sua lunghezza (si veda Fig. 1.1). Le CCN subiscono una transizione epitelio-mesenchimale, delaminano dal tubo neurale e migrano in regioni anatomiche differenti all'interno dell'embrione in via di sviluppo. Mentre il tubo neurale darà luogo al SNC (encefalo e midollo spinale), le CCN rappresentano i precursori del SNP, dei melanociti, dei tessuti connettivi (connettivo propriamente detto, cartilagine, osso) di gran parte delle strutture cranio-facciali, della midollare del surrene, della neuroipofisi e delle leptomeningi (aracnoide e pia madre).

Il destino delle CCN dipende dalla regione del tubo neurale da cui migrano e in base a questo si differenziano in: **craniali, del tronco** (che includono le **cardiache**), **vagali** e **sacrali** (Fig. 1.2).

In particolare:

- le cellule di Schwann, i neuroni sensitivi dei gangli delle radici dorsali, i neuroni del sistema nervoso ortosimpatico e le cellule satelliti derivano dalle CCN del tronco che prendono origine caudalmente al quarto paio di somiti
- il sistema nervoso enterico deriva da CCN sacrali e vagali
- il sistema nervoso parasimpatico si sviluppa da CCN craniali e sacrali
- i nervi cranici derivano da CCN craniali con l'apporto di cellule dei placodi.

Il destino delle CCN e il successivo sviluppo del SNP è regolato in maniera molto precisa da segnali extracellulari e dall'attivazione di pathway intracellulari che determinano l'espressione di geni specifici. I segnali extracellulari che specificano le CCN derivano dall'ectoderma, dal mesoderma parassiale e dal neuroepitelio adiacente.

Nonostante sia stato chiarito il ruolo dei pathway molecolari di Wnt/ β -catenin, BMP (Bone Morphogenic Protein) e

FGF (Fibroblast Growth Factor) nell'induzione delle CCN negli anfibii, uccelli e pesci, un loro ruolo nei mammiferi non è ancora stato dimostrato. Sembra infatti che nei mammiferi questi pathway molecolari siano importanti per il differenziamento successivo delle CCN. È chiaro però che tutte le CCN esprimono il fattore di trascrizione Sox10 (SRY-Box Transcription Factor 10).

Durante la loro delaminazione dal tubo neurale le CCN, per potere subire la transizione epitelio-mesenchimale, modificano l'espressione di integrine e caderine mentre avvengono anche dei cambiamenti della matrice extracellulare.

Nella maggior parte dei casi le CCN migrano in file (catene) ordinate il cui orientamento, influenzato da diversi componenti della matrice extracellulare (laminine, versicano, fibronectina), determina il destino delle cellule. Inoltre il destino delle CCN dipende anche dal momento nel quale le cellule delaminano dal tubo neurale. Generalmente le CCN del tronco migrano ipsilateralmente ma alcune di queste sono anche in grado di attraversare la linea mediana dorsalmente e di migrare quindi nei gangli delle radici dorsali controlaterali.

Le CCN del tronco che migrano ventromedialmente contribuiscono a formare i nervi del sistema nervoso autonomo e somatico (oltre che le cellule cromaffini della midollare del surrene) mentre le CCN che migrano dorsolateralmente differenziano in melanociti. Inoltre le cellule che migrano precocemente migrano ventromedialmente mentre quelle che migrano successivamente migrano dorsolateralmente.

Inoltre, durante la migrazione delle CCN, il concomitante differenziamento dei somiti è fonte di ulteriori segnali molecolari che determinano la migrazione segmentale delle CCN e la conseguente organizzazione metamERICA dei gangli delle radici dorsali, dei gangli del sistema nervoso simpatico e dei nervi periferici.

In particolare la porzione più caudale dei somiti rilascia segnali (per es. semaforine ed efrine che interagiscono con il recettore neuropilina e i recettori per l'efrine espresse dalle CCN) che inibiscono la migrazione delle CCN, mentre la porzione rostrale produce segnali che attraggono le CCN e ne inducono la proliferazione.

È importante ricordare che le CCN che delaminano dal tubo neurale comprendono sia progenitori multipotenti (Sox2+, Sox10+, Fox3+) che cellule già determinate. Nel corso dello sviluppo la maggior parte delle CCN riduce la sua capacità di differenziamento ma alcune di queste cellule mantengono un livello elevato di plasticità e capacità di autorinnovamento. Sia nel nervo sciatico sia nei gangli delle radici dorsali di organismi adulti sono state infatti ritrovate cellule simil-staminali, definite come "neural crest-like stem cells".

Neuroni sensitivi

Il differenziamento dei **neuroni sensitivi** è caratterizzato dalla riduzione dell'espressione di marker che mantengono la multipotenza delle cellule delle creste neurali quali Sox10, Sox2, Fox3. In concomitanza con lo spegnimento dei relativi geni, nelle cellule che delaminano si ha una rapida regolazione

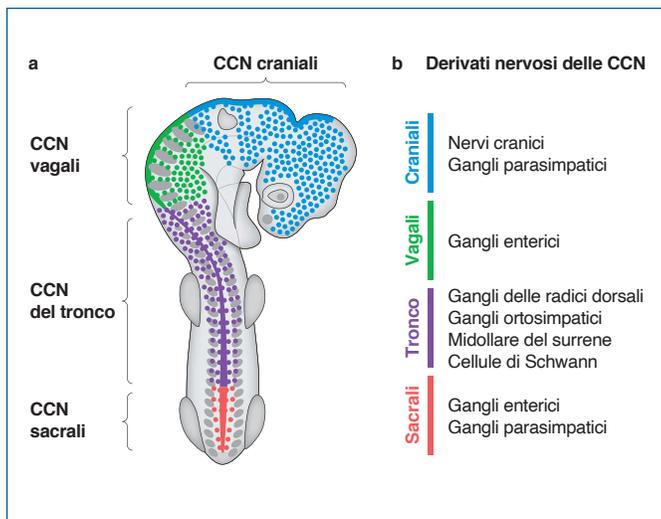


Figura 1.2 (a) Cellule delle creste neurali e (b) loro derivati nervosi.

positiva di fattori trascrizionali quali neurogenina 1 e 2 che indirizzano le cellule verso i gangli delle radici dorsali. Il differenziamento poi in senso neurale o gliale è indotto dall'espressione di precisi fattori trascrizionali. Tra questi, Brn 3a e Islet 1 indirizzano i precursori verso il differenziamento in senso neuronale e verso la maturazione dei diversi neuroni sensitivi grazie all'espressione di specifici **recettori per le neurotrofine (TrkA, TrkB, TrkC)**. Il fattore trascrizionale Runx1 determina il differenziamento dei neuroni nocicettivi mentre Runx3 regola la maturazione dei neuroni propriocettivi.

È importante ricordare che i diversi neuroni sensitivi si differenziano dalle cellule delle creste neurali che delaminano dal tubo neurale in tempi differenti (nel topo E10-E12.5, E11.5 e E13.5). Fondamentale per il loro differenziamento è l'interazione con le diverse **neurotrofine (NGF, BDNF, NT-3)**, resa possibile dall'espressione dei recettori specifici (Trk). Il differenziamento dei neuroni sensitivi durante le tre "ondate" può essere così schematizzato:

- dalla prima "ondata" di cellule della cresta neurale si differenziano **neuroni propriocettivi di grosso diametro TrkC+** e **neuroni meccanocettivi TrkB+ o Ret+**
- dalla seconda ondata si differenziano i **neuroni di piccolo diametro TrkA+** (**neuroni meccanocettivi, nocicettivi e termocettivi**)
- dalla terza ondata che dipende sia dalle cellule delle creste neurali che migrano controlateralmente che dalle cellule della glia di confine (si veda la descrizione istologica nel Capitolo 2) si differenziano una ristretta popolazione di **neuroni nocicettivi TrkA+** ma anche **neuroni TrkB+** e **TrkC+**.

La migrazione delle CCN destinate a formare i gangli spinali è influenzata da diversi segnali, tra cui l'interazione tra integrine e componenti della matrice extracellulare e l'adesione tra recettori di membrana. Le cellule delle creste neurali che migrano nei gangli spinali si dispongono spazialmente in maniera regolata a seconda delle "ondate": le cellule che migrano precocemente si dispongono a formare la parte centrale del ganglio mentre le cellule che migrano in un secondo momento si dispongono perifericamente. Per la corretta morfogenesi dei gangli spinali è fondamentale l'interazione tra i

neuroni immaturi della parte centrale del ganglio e le cellule delle creste neurali (interazione in parte dovuta al pathway Delta/Notch).

I neuroni sensitivi che raggiungono i gangli delle radici dorsali sono neuroni bipolari allungati che subiscono in questa sede la polarizzazione verso un fenotipo pseudounipolare (Fig. 1.3).

Il primo cambiamento morfologico evidenziabile è una disposizione asimmetrica del citoplasma del neurone che prende le sembianze così di un neurone bipolare (con i due prolungamenti che formano un angolo minore di 90°) con citoplasma eccentrico (neurone a forma di campana). Successivamente il corpo cellulare del neurone si allunga e si dispone tra i due prolungamenti. Diverse evidenze suggeriscono che il prolungamento che si stacca dal soma non derivi dalla fusione dei due prolungamenti del neurone bipolare ma dalla disposizione del citoplasma tra i due prolungamenti originari.

Nei diversi studi condotti, infatti, non si è mai dimostrata l'apposizione dei due prolungamenti e inoltre il diametro del prolungamento che si stacca dal soma è maggiore rispetto alla somma dei diametri dei due prolungamenti del neurone bipolare. Inoltre, la porzione prossimale del prolungamento ha caratteristiche ultrastrutturali molto simili al corpo cellulare e nell'adulto è caratterizzato dall'espressione del marker somatodendritico Microtubule Associated Protein 2 (MAP2). Nel topo la polarizzazione è in gran parte avvenuta al giorno E15. Al momento non è ancora stato comunque dimostrato se la **pseudounipolarizzazione** si concluda prima o dopo l'innervazione del target centrale e periferico. Inoltre questo processo è sicuramente dipendente dalle cellule gliali, ma a oggi non sono stati ancora chiariti quali sono i pathway molecolari coinvolti.

Neurotrofine

Le **neurotrofine (NGF, Nerve Growth Factor; BDNF, Brain-Derived Neurotrophic Factor; NT-3, Neurotrophin 3; NT-4/5, Neurotrophin 4/5)** svolgono un ruolo cruciale nella regolazione della sopravvivenza e dell'apoptosi nel sistema

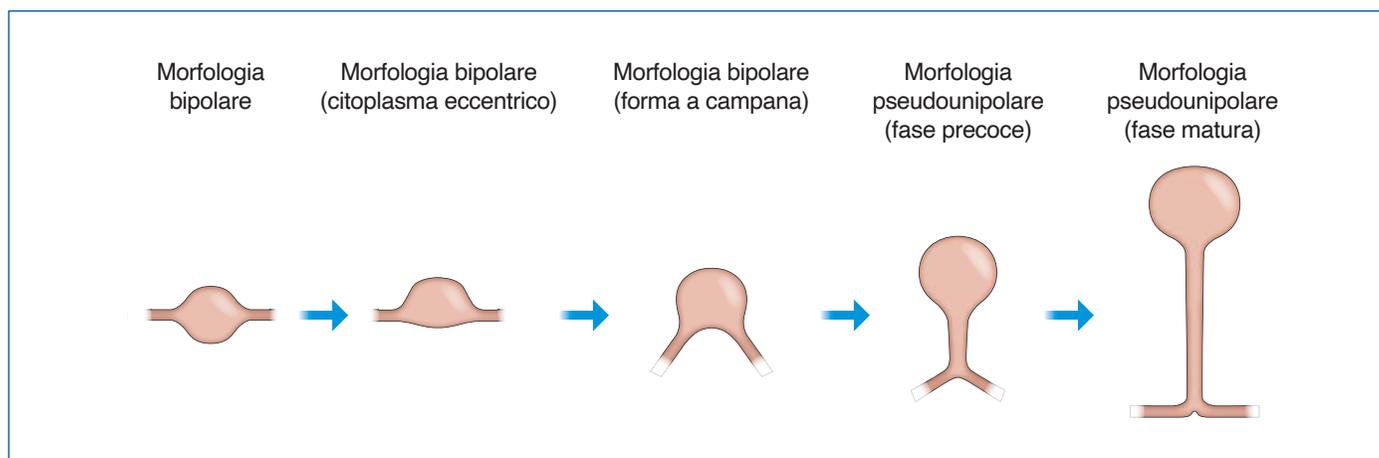


Figura 1.3 Schema dei diversi stadi morfologici durante il differenziamento (pseudounipolarizzazione) dei neuroni sensitivi dei gangli spinali.

nervoso sia durante lo sviluppo sia in seguito a un danno. L'espressione delle neurotrofine è fondamentale per la sopravvivenza dei neuroni periferici e per l'innervazione corretta dei bersagli periferici. Le neurotrofine sono sintetizzate come precursori (**proneurotrofine**) che vengono scissi da proteasi, nell'apparato di Golgi o in vescicole secretorie, generando le neurotrofine mature. Nel caso le proneurotrofine vengano elaborate in modo incompleto, vengono convertite nell'ambiente extracellulare in neurotrofine mature da plasmina e dalla metalloproteinasi 7.

Le neurotrofine (espresse dai tessuti bersaglio) esercitano i loro effetti legandosi a due diverse classi di recettori di membrana espressi dai neuroni: i **recettori della tirosina chinasi TrkA, B e C** e il **p75 Neurotrophin Receptor (p75NTR)**, membro della superfamiglia dei recettori del Tumor Necrosis Factor (TNF).

I recettori sono prodotti nel soma e vengono trasportati lungo l'assone verso le sinapsi mediante il trasporto anterogrado. Il trasporto assonale anterogrado è dipendente dai microtubuli e dalla proteina motore chinesina ed è dipendente anche dall'interazione con la proteina sortilina che a sua volta può formare dei complessi sia con p75NTR sia con i recettori Trk.

Sia le proneurotrofine che le neurotrofine mature (NGF, BDNF, NT-3 e NT-4/5) possono legarsi a p75NTR, mentre i recettori Trk tendono a legarsi con neurotrofine mature e ogni sottotipo di Trk si lega in maniera selettiva ad alcune neurotrofine: NGF è il ligando preferenziale per TrkA, BDNF e NT-4 per TrkB e NT-3 per TrkC (Fig. 1.4). È stato inoltre dimostrato che la co-espressione di p75NTR modula la specificità e aumenta l'affinità dei recettori Trk verso le neurotrofine. Il legame delle neurotrofine ai recettori p75NTR o Trk induce la dimerizzazione dei recettori e l'autofosforilazione che a sua volta attiva una serie di pathway molecolari.

L'interazione delle neurotrofine con il recettore p75NTR (Fig. 1.5) può attivare:

- la via NF-κB che induce la sopravvivenza cellulare; il legame di TRAF6 con il dominio citoplasmatico di p75NTR determina l'attivazione dell'IκB kinase (IKK) che fosforila e degrada le proteine IκB, permettendo a NF-κB di entrare nel nucleo
- la via di C-JUN promuovendo l'apoptosi cellulare; l'attivazione della chinasi JNK attiva p53 e Bax (inducendo apoptosi) e la fosforilazione di c-JUN permettendone la traslocazione nel nucleo
- la via di Rho riducendo la crescita del cono di crescita.

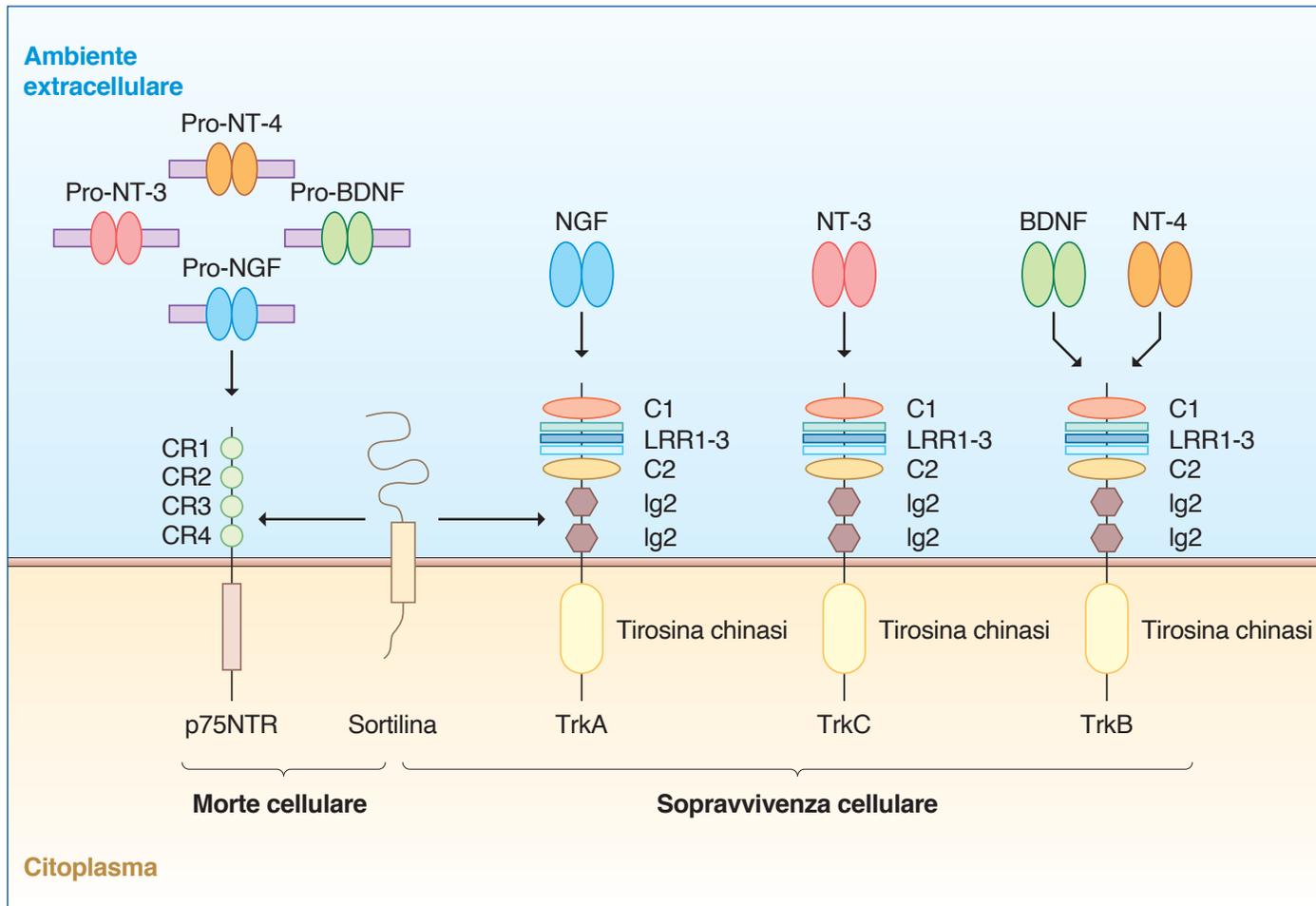


Figura 1.4 Neurotrofine e loro recettori. Le proneurotrofine (pro-NGF, pro-BDNF, pro-NT-3 e pro-NT-4) interagiscono con alta affinità con il recettore p75NTR. NGF interagisce con un'elevata affinità con TrkA, BDNF e NT-4 con TrkB e NT-3 con TrkC. La sortilina può formare un complesso sia con p75NTR sia con i recettori Trk.

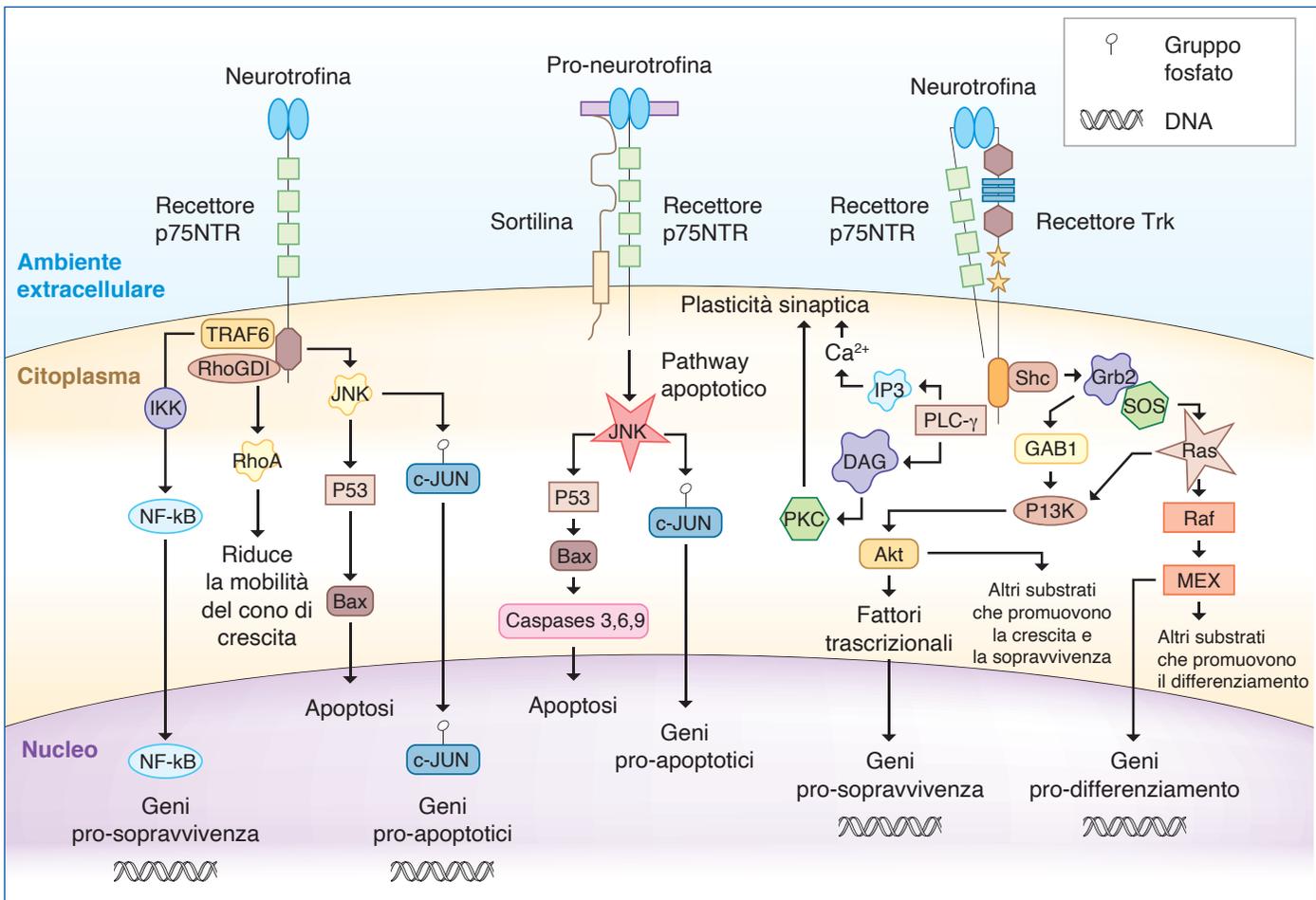


Figura 1.5 Pathway molecolari delle neurotrofine. Lo schema illustra l'interazione delle neurotrofine e delle proneurotrofine con i recettori Trk, sortilina e p75NTR e i principali pathway molecolari intracellulari attivati attraverso questi recettori. Si noti che il recettore p75NTR può attivare tre diversi pathway molecolari.

L'interazione delle proneurotrofine con il complesso p75NTR/sortilina (si veda Fig. 1.5) stimola invece l'azione pro-apoptotica attraverso la via apoptotica JNK dipendente.

L'interazione delle neurotrofine con i recettori Trk (co-espresi con p75NTR) (si veda Fig. 1.5) può attivare:

- la via delle Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK) che induce il differenziamento neuronale e la crescita del neurite; il legame tra Shc e il dominio citoplasmatico fosforilato dei recettori Trk promuove la formazione del complesso Grb2-SOS che a sua volta recluta Ras e stimola le MAPK
- la via della Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) che promuove la sopravvivenza e la crescita cellulare; l'attivazione di PI3K può avvenire grazie a GAB1 o a Ras e determina a sua volta l'attivazione della proteina chinasi Akt
- la via della Phospholipase C-γ (PLC-γ) che controlla la plasticità sinaptica. L'attivazione di PLC-γ determina l'attivazione di pathway calcio o IP3 dipendenti.

A seguito dell'attivazione da parte delle neurotrofine, i recettori possono venire trasportati per via retrograda dalla terminazione assonale al soma mediante la formazione di vescicole chiamate endosomi di segnalazione, con i quali si regola l'espressione genica. Durante il trasporto retrogrado gli endosomi si modificano attivando diversi pathway molecolari.

Le diverse neurotrofine differiscono nella loro capacità di indurre la formazione di endosomi di segnalazione, con importanti conseguenze per lo sviluppo del SNP.

È stato infatti dimostrato che sia NGF che NT-3 si legano e attivano TrkA espressi dai neuroni simpatici, ma solo NGF induce la formazione di endosomi contenenti TrkA inducendo effetti di sopravvivenza a lungo termine.

Poiché NT-3 è prodotto ad alti livelli nei target intermedi (soprattutto a livello dell'apparato vascolare) mentre NGF è prodotto solo nei tessuti bersaglio finali, NT-3 consente la crescita dei neuriti TrkA-dipendente permettendo l'innervazione dei vasi sanguigni durante lo sviluppo, mentre solo NGF prodotto dai tessuti bersaglio finali dei neuroni è in grado di indurre segnali di sopravvivenza a lungo termine; attraverso questo sistema duplice si utilizza l'interazione NT-3-TrkA per dirigere gli assoni simpatici verso la loro destinazione, mentre si utilizza l'interazione NGF-TrkA a lungo raggio per supportare la sopravvivenza neuronale.

È importante sottolineare che la regolazione della sopravvivenza e della morte cellulare è un aspetto chiave nella formazione di circuiti neuronali funzionali. Nel sistema nervoso dei vertebrati in via di sviluppo, si differenzia infatti un eccesso di neuroni e solo quelli che contattano con successo il loro bersaglio e formano connessioni appropriate sopravvivono; i

rimanenti vanno incontro a un processo di apoptosi. L'ipotesi che i tessuti bersaglio producano quantità limitate di neurotrofine e che solo una quota di neuroni, stimolati dalle neurotrofine (che fungono da fattori di sopravvivenza), sfuggano alla morte cellulare per apoptosi è alla base della teoria neurotrofica formulata dal premio Nobel Rita Levi Montalcini.

In particolare circa il 50% dei neuroni periferici che si differenziano vanno incontro ad apoptosi. L'NGF è la neurotrofina che permette ai neuroni simpatici e ai neuroni sensitivi nocicettivi (esprimenti il recettore TrkA) di sopravvivere. NGF è espresso, infatti, nella pelle, uno dei principali bersagli dei neuroni nocicettivi.

NT-3 è invece espresso nei fusi neuromuscolari, negli organi tendinei del Golgi e dalle cellule di Merkel, bersagli dei neuroni NT-3-dipendenti. NT-3 influenza anche la sopravvivenza dei neuroni sensitivi responsabili della meccanoccezione ad adattamento lento.

Inoltre è stato dimostrato che alcuni neuroni sensitivi durante lo sviluppo cambiano la loro dipendenza dalle neurotrofine.

Per esempio i neuroni meccanocettivi chiamati "D-hair receptor" sono dipendenti da NT-3 per la sopravvivenza durante il periodo prenatale e lo sviluppo postnatale precoce, ma negli animali maturi la loro sopravvivenza dipende da NT-4/5. Inoltre molti neuroni dei DRG (circa il 60%) e praticamente tutti i neuroni simpatici dipendono da NT-3 prima che si verifichi l'innervazione del bersaglio; una volta che il bersaglio viene contattato i neuroni invece diventano dipendenti da NGF.

Cellule di Schwann e mielinizzazione

Dalle cellule delle creste neurali (CCN) si differenziano:

- **cellule di Schwann mielinizzanti e non mielinizzanti (cellule di Remak)** localizzate nei nervi periferici
- **cellule di Schwann terminali** a livello delle giunzioni neuromuscolari
- **cellule satelliti** nei gangli
- **cellule gliali enteriche.**

Gli studi più completi sono stati condotti nei roditori e dimostrano in particolare che le cellule delle creste neurali si differenziano in cellule di Schwann attraverso la generazione di due stadi intermedi ben definiti. Questi sono identificati come: **precursori delle cellule di Schwann (PCS)** nei nervi embrionali precoci; **cellule di Schwann immature (iSc)** nei nervi embrionali tardivi e nei nervi perinatali (Fig. 1.6).

Dati ancora non del tutto condivisi indicano che tutte le cellule di Schwann delle radici dorsali e molte delle cellule di Schwann delle radici ventrali derivino da una popolazione multipotente, denominata **glia di confine** (si veda il Capitolo 2), che rappresenta una popolazione cellulare transiente derivante dalle cellule delle creste neurali che formano una barriera tra il SNC e il SNP.

Il differenziamento delle CCN in PCS è parzialmente regolato dai fattori trascrizionali Sox10 e Pax3, dall'istone deacetilasi 1 e 2 (HDAC1/2) e in maniera particolare dalla

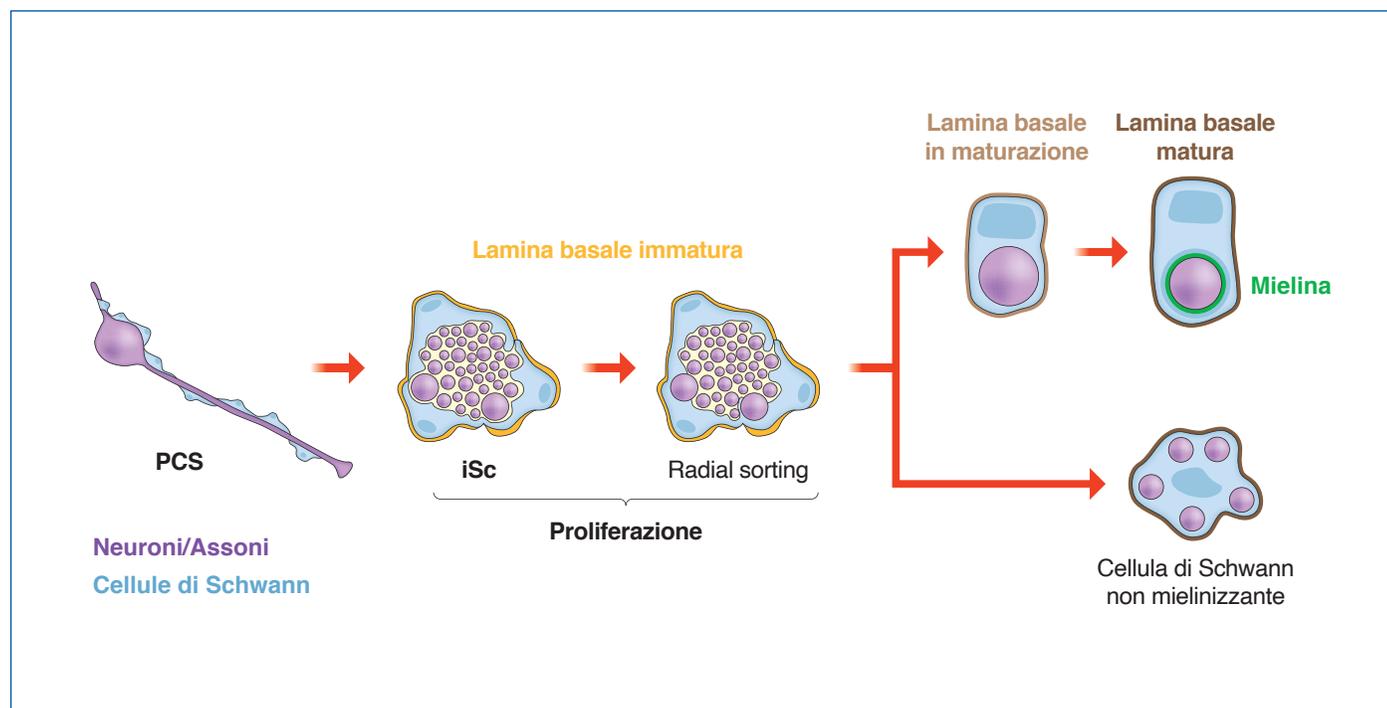


Figura 1.6 Sviluppo di cellule di Schwann mielinnizzanti e non mielinnizzanti. I precursori delle cellule di Schwann (PCS) proliferano e migrano lungo gli assoni in crescita. I PCS diventano cellule di Schwann immature (iSc), che sono associate a molti assoni. Le iSc, cessata la migrazione, rimangono proliferative e depongono una lamina basale immatura. Durante il "radial sorting", le iSc interdigitano i loro processi citoplasmatici tra le fibre nervose, e le cellule di Schwann promielinnizzanti si associano a un singolo segmento assonale. Mentre la lamina basale matura, le cellule di Schwann mielinnizzanti cominciano a formare la guaina mielinnica. Le iSc possono anche differenziarsi in cellule di Schwann non mielinnizzanti.

neuregulina 1 (NRG1) espressa dagli assoni. In particolare la proliferazione, la sopravvivenza e la migrazione delle PCS è regolata dalla NRG1 mediante il legame al recettore Erb espresso dalle PCS. Nei roditori la NRG1 viene espressa dal giorno E11-12, influenzando la proliferazione e la sopravvivenza delle PCS e regolando così il numero delle PCS in rapporto al numero degli assoni. La migrazione delle PCS viene in parte controllata anche dal collagene della matrice extracellulare (in particolare collagene IV, V e XV).

L'ulteriore differenziamento delle PCS in iSc (che avviene quando le PCS terminano di migrare) è invece regolato dal pathway di Notch e dalla riduzione dell'attività dei fattori trascrizionali AP2 α ed endotelina B. Nei roditori (E14-17) le iSc diventano inoltre indipendenti dagli assoni per la loro sopravvivenza, producendo fattori autocrini (IGF2, PDGF-BB, NT-3, LIF). In questa fase di differenziamento le iSc producono inoltre fattori che favoriscono la crescita e la sopravvivenza degli assoni.

Le iSc così differenziate entrano in quel processo chiamato "radial sorting" che permette di instaurare un rapporto 1:1 tra cellule di Schwann e gli assoni con un diametro maggiore di 1 μm (motoneuroni e neuroni sensitivi che trasmettono informazioni propriocettive e meccaniche) (Fig. 1.7).

Il "radial sorting" è un processo che nei roditori inizia nel periodo perinatale e continua per circa 10-15 giorni permettendo di riconoscere e di separare gli assoni che verranno mielinizzati dagli assoni che formeranno invece i fasci di Remak, formati da assoni amielinici. Il processo richiede una interazione specifica tra gli assoni, la matrice extracellulare e le iSc (Fig. 1.8).

Durante il "radial sorting" le iSc depongono una lamina basale (ricca in laminina e collagene X) e successivamente ne determinano la maturazione. In particolare nei nervi periferici è fondamentale la sintesi della laminina 211 in quanto la sua interazione con recettori presenti sulla membrana delle iSc permette l'attivazione dei pathway che regolano la mielinizzazione (trasducendo la risposta scatenata dall'interazione delle cellule di Schwann con la NRG1). In particolare è stata dimostrata l'importanza dell'espressione (regolata sia nel tempo sia nello spazio) delle integrine $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$ e del distroglicano. Recentemente è stato scoperto anche il ruolo nella regolazione della mielinizzazione del recettore denominato G Protein-coupled Receptor 126, GPR126. Mutazioni a carico di questo recettore determinano errori sia nel "radial sorting" che nella successiva mielinizzazione, con la comparsa di fasci di assoni di grosse dimensioni (maggiori di 1 μm) non reclutati dalle iSc per

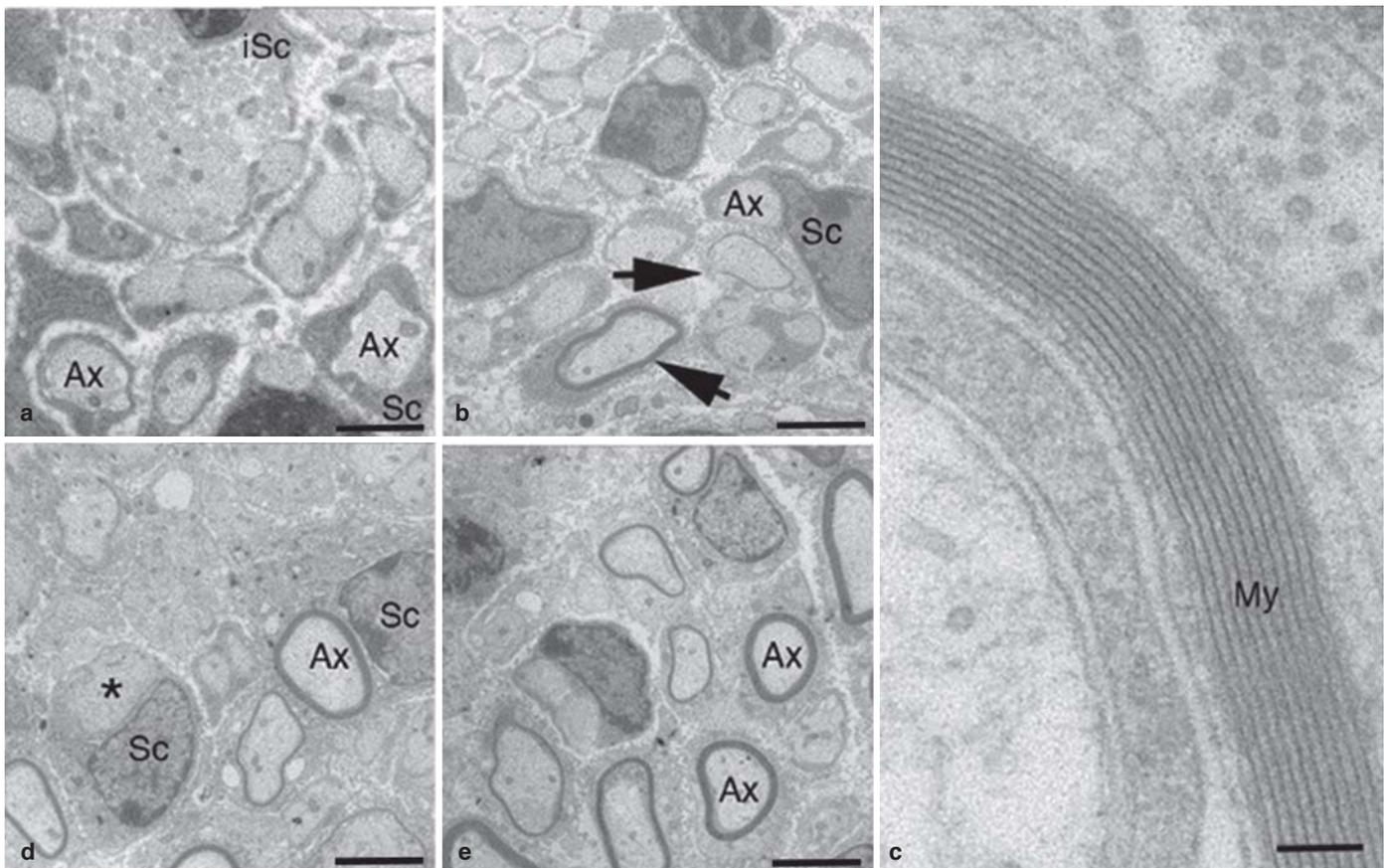


Figura 1.7 Sviluppo postnatale di nervo sciatico di topo. Micrografie al microscopio elettronico a trasmissione di nervo sciatico di topo neonato (P1) e di topo di 5 giorni (P5). **(a,b)** Le cellule di Schwann immature (iSc) avvolgono un gruppo di assoni con diametri diversi; altre cellule di Schwann (Sc) che mostrano lo stadio di promielinizzazione si associano con una relazione 1:1 con grandi assoni (Ax); le frecce indicano le cellule di Schwann che stanno cominciando a formare una sottile guaina di mielina attorno agli assoni (c: alto ingrandimento della mielina, My). **(d,e)** Nervo sciatico di topo P5; alcuni assoni (Ax) di grosso calibro presentano una sottile guaina di mielina compatta; l'asterisco in **(d)** indica lo stadio della promielina. Barre: 2 μm **(a, b, d, e)**; 200 nm **(c)**. Per gentile concessione di Angelo Quattrini.

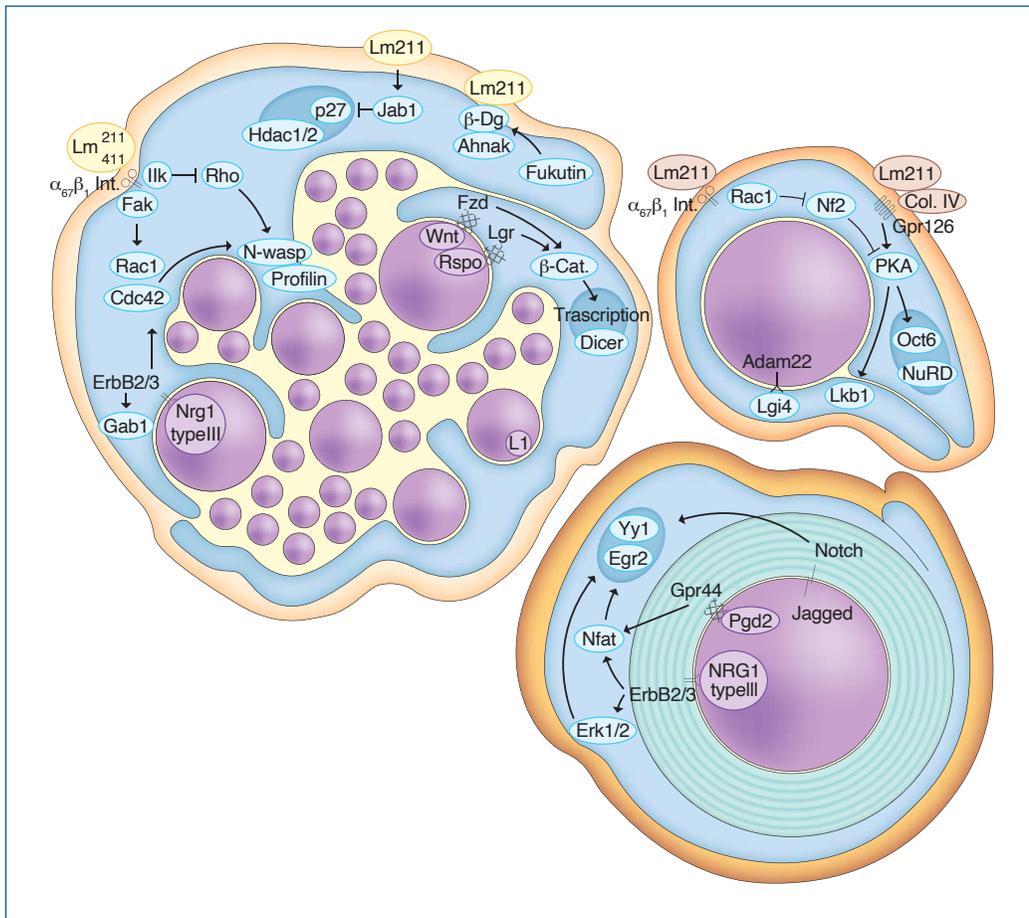


Figura 1.8 Interazioni aso-gliali durante il "radial sorting" e la mielinizzazione. Nell'immagine sono indicati i pathway molecolari coinvolti.

la successiva mielinizzazione e avvolti da protrusioni citoplasmatiche di cellule di Schwann anomali. Questa mielinizzazione aberrante non è associata a un numero insufficiente di cellule di Schwann ma probabilmente a un difetto nell'organizzazione del citoscheletro delle cellule di Schwann. È importante ricordare infatti che durante il radial sorting è fondamentale sia la polarizzazione delle iSc (indotta principalmente dalla laminina 211) sia il rimaneggiamento del citoscheletro (in particolare dei microfilamenti di actina) che permette alle iSc di formare estroflessioni citoplasmatiche con cui segregare gli assoni che dovranno essere mielinizzati successivamente. Durante questo processo le iSc si differenziano in cellule di Schwann non proliferanti promielinizzanti (proSc) o non mielinizzanti. Queste ultime si trovano a livello delle placche neuromuscolari, associate ai corpuscoli di Pacini e di Meissner e rivestono gli assoni amielinici nei fasci di Remak. L'indirizzamento delle iSc verso uno o l'altro differenziamento dipende dall'interazione tra l'assone (che esprime diversi livelli di NRG1) e la cellula di Schwann (che esprime i recettori ErbB2/3). È stato dimostrato che la neuregulina 1 di tipo III (NRG1 III) è l'isoforma essenziale (e non sostituibile da altre isoforme) per regolare la mielinizzazione e lo spessore della mielina. Lo spessore della mielina è infatti proporzionale alla quantità di NRG1 III espressa sull'assone e quindi al calibro dell'assone stesso. Inoltre è importante ricordare che il segnale indotto dalla NRG1 III dipende da modificazioni post-traduzionali specifiche. La NRG1 III è una proteina transmembrana, la cui porzione extracellulare può subire

dei tagli proteolitici da parte di secretasi differenti come beta-site APP cleaving enzyme 1 (BACE-1) e la metallo proteasi Adam 17 che attivano o inibiscono rispettivamente i pathway molecolari che inducono la mielinizzazione attraverso il recettore ErbB2/3 delle cellule di Schwann.

In una prima fase gli assoni che dovranno essere mielinizzati vengono circondati da iSc che grazie ai loro processi citoplasmatici raggruppano gli assoni in fasci circondati da una lamina basale condivisa da più iSc. Successivamente mediante la formazione di processi ulteriori si raggiungerà il rapporto 1:1 tra cellule di Schwann promielinizzanti e assoni. L'interazione delle cellule di Schwann promielinizzanti da una parte con i componenti della lamina basale e dall'altra con la NRG1 III espressa dall'assone determina la **polarizzazione radiale** (o basoapicale) delle cellule di Schwann. Le cellule di Schwann promielinizzanti subiscono anche una **polarizzazione longitudinale** (da nodo a nodo) che prevede l'espressione modulata nel tempo di proteine differenti sia sulle cellule di Schwann sia sui diversi tratti dell'assone che permettono il differenziamento dei diversi domini dell'assone procedendo dal nodo al paranodo e infine al juxtapanodo. Questo differenziamento è regolato dall'espressione di proteine della famiglia ERM (principalmente ezrina) a entrambe le estremità della cellula di Schwann prima della formazione della mielina compatta. L'interazione con le cellule di Schwann mielinizzanti determina la localizzazione specifica dei canali del sodio (Nav1.2) mediante il "clustering" (raggruppamento) dell'ankirina G (AnkG) e di

molecole che legano l'AnkG (NrCAM e neurofascina) sulla membrana dell'assone a livello del nodo. In questo processo di localizzazione specifica dei canali del sodio è stato dimostrato anche il coinvolgimento del citoscheletro e in particolare della spettina β IV (si veda il Capitolo 2).

Durante le prime fasi della mielinizzazione l'espressione di Caspr e contattina nella regione dell'assone dove si svilupperà il paranodo (e la contemporanea espressione di neurofascina 155 a livello della membrana delle spirali paranodali delle cellule di Schwann) determina invece il differenziamento di questo dominio e la formazione delle giunzioni tra l'assone del paranodo e le spirali paranodali.

Dopo il differenziamento del paranodo avviene la maturazione del nodo con la sostituzione del canale Nav1.2 con Nav1.6. Infine, si sviluppano i juxtapanodi, con l'accumulo di TAG-1, Caspr2, canali Kv1 e 4.1B. I componenti juxtapanodali, che sono precedentemente presenti all'interno dei paranodi, diffondono nei juxtapanodi mediante l'accumulo di Caspr e Caspr2. È importante ricordare inoltre che la lunghezza della cellula di Schwann (e di conseguenza la lunghezza dell'internodo) non è fissa ma aumenta durante lo sviluppo.

A differenza dei diversi domini del segmento internodale e dei nodi di Ranvier, il differenziamento del segmento iniziale dell'assone (SIA) (si veda il Capitolo 2) non richiede l'interazione tra l'assone e le cellule di Schwann, ma viene intrinsecamente determinato.

Come è già stato sottolineato il processo di determinazione dei diversi domini dell'internodo è strettamente associato al processo di mielinizzazione da parte delle cellule di Schwann mielinizzanti. Durante la mielinizzazione una cellula di Schwann può generare fino a 20 μm^2 di membrana attorno agli assoni di calibro maggiore. Questo processo richiede una fine regolazione della trascrizione genica, della traduzione proteica e del trasporto intracellulare che nell'insieme determinano la corretta stechiometria dei diversi componenti della mielina. Nelle cellule di Schwann promielinizzanti, i pathway molecolari che promuovono la mielinizzazione inducono l'espressione dei geni che codificano per proteine essenziali della mielina compatta (**P0, Myelin P0-protein; MBP, Myelin Basic Protein; PMP22, Peripheral Myelin Protein 22**) e della mielina non compatta (**MAG, Myelin Associated Glycoprotein; Cx32, Connexin 32**). Contemporaneamente viene indotta l'espressione di enzimi necessari per la sintesi dei lipidi di membrana e la sintesi dei componenti del citoscheletro. Studi sulla mielinogenesi hanno evidenziato l'importanza della regolazione epigenetica (metilazione del DNA, modificazioni post-traduzionali degli istoni, espressione di RNA non codificanti e microRNA) nella modulazione dell'espressione genica.

La guaina mielinica è formata da 40 o più avvolgimenti della membrana plasmatica di una cellula di Schwann. Questi si formano come risultato dell'avvolgimento a spirale della membrana plasmatica delle cellule di Schwann attorno all'assone. La prima fase della mielinizzazione prevede lo sviluppo di due estroflessioni citoplasmatiche della cellula di Schwann che vanno a contrapporsi formando la struttura nota come **mesassone**. Le fasi successive che prevedono la formazione

dei diversi strati di mielina non sono dovute alla migrazione del nucleo/citoplasma intorno alla regione più periferica della mielina ma ad avvolgimenti interni della membrana plasmatica della cellula di Schwann. Questo processo di invaginazione di nuovi strati di membrana a contatto con l'assone prevede che vengano continuamente modificati i rapporti tra la membrana dell'assone e la membrana della cellula di Schwann. L'aumento della superficie della membrana plasmatica della cellula di Schwann è reso possibile dall'aggiunta di componenti della membrana plasmatica a livello della regione abassonale (rivolta verso la lamina basale) e perinucleare. Da questa zona i componenti della membrana plasmatica diffondono lungo la mielina in via di formazione. Durante la formazione delle diverse lamelle concentriche di mielina il citoplasma, gli organelli e il nucleo della cellula di Schwann vengono spostati verso la porzione abassonale della cellula di Schwann. Inizialmente i diversi strati di membrana che rivestono l'internodo non sono compatti ma lo diventano successivamente con l'aumento dell'espressione delle proteine P0 e MBP che determinano rispettivamente la compattazione dei foglietti extracellulari e intracellulari. Si forma così la **mielina compatta**. Come già sottolineato durante il processo di maturazione/compattazione della mielina aumenta anche la lunghezza dell'internodo.

Giunzione neuromuscolare: un esempio di sinaptogenesi nel SNP

La formazione e il mantenimento della **giunzione neuromuscolare** (o **placca motrice**), sinapsi colinergica ionotropica specializzata tra un motoneurone e una fibra muscolare scheletrica, richiedono una rigida induzione reciproca e comunicazione tra motoneuroni, cellule miogeniche e cellule di Schwann terminali. Il differenziamento dei motoneuroni (dal tubo neurale) e delle fibre muscolari striate scheletriche esula dagli argomenti trattati in questo testo, mentre il differenziamento delle cellule di Schwann è stato affrontato ampiamente nel paragrafo precedente. Qui invece verranno affrontate nello specifico le interazioni fra queste tre cellule che permettono di sviluppare la placca motrice. Durante lo sviluppo, le cellule di Schwann immature (iSc) migrano lungo gli assoni dei motoneuroni verso la periferia differenziandosi in cellule di Schwann mielinizzanti o in **cellule di Schwann terminali** che partecipano alla formazione della placca motrice. Le cellule di Schwann terminali proliferano intorno alla placca motrice per poi rivestirla con i loro processi, lasciando libera però la superficie sinaptica. L'innervazione muscolare è preceduta dal "clustering" (raggruppamento) di **recettori acetilcolinici (AChR)** nella fibra muscolare attraverso un processo chiamato "prepatternning". Durante l'innervazione, la porzione distale del motoneurone rilascia il proteoglicano agrina che si lega al recettore Low-density lipoprotein Receptor related Protein 4 (LRP4), che dopo la sua eterodimerizzazione promuove l'attivazione e la transfosforilazione del recettore chi-

nasico Muscle-Specific Kinase (MuSK). L'attivazione di MuSK richiede anche la presenza della proteina adattatrice intracellulare Dok-7. I meccanismi attraverso i quali l'attivazione di MuSK porti all'accumulo degli AChR sulle fibre muscolari non sono ancora stati completamente chiariti ma certamente sono coinvolti i microfilamenti di actina con cui gli AChR possono interagire direttamente o attraverso actin-binding protein come la proteina coronina 6 e la proteina rapsina (Fig. 1.9).

È stato però dimostrato che il contatto tra motoneurone e fibra muscolare striata scheletrica può avvenire anche in assenza delle cellule di Schwann terminali; queste sono invece fondamentali per la crescita e l'omeostasi della placca motrice.

La formazione della giunzione neuromuscolare è influenzata anche da diversi componenti extracellulari. MuSK ha infatti un dominio ricco di cisteina che condivide l'omologia con il recettore di Wnt e di conseguenza le proteine Wnt si legano e attivano MuSK prima dell'innervazione, quando l'agrina neurale è assente.

Inoltre molecole della lamina basale sinaptica aiutano a guidare il processo di innervazione e sono cruciali per la formazione della densità postsinaptica e dell'organizzazione e mantenimento delle apposizioni funzionali degli elementi pre e postsinaptici. Il complesso glicoproteico Dystrophin Glycoprotein Complex (α -DG e

β -DG), attraverso la sua subunità α , organizza un reticolo molecolare nella lamina basale comprendente perlecano, AChE/ColQ e laminina che stabilizza i raggruppamenti degli AChR. La laminina β 2 svolge invece un ruolo nella maturazione delle sinapsi legandosi a cluster di canali del calcio voltaggio-dipendenti nella zona attiva della placca neuromuscolare (si veda Fig. 1.9).

Dopo aver formato la giunzione neuromuscolare i motoneuroni inducono la diversità strutturale e funzionale delle fibre muscolari innervate. Ciascun muscolo è infatti composto da diversi tipi di fibre che sono innervate da classi specifiche di placche motrici. I motoneuroni sono suddivisi in tre gruppi in base al tipo di fibra muscolare che innervano:

- a. **motoneuroni alfa**, che sono i più abbondanti, innervano fibre extrafusali contrattili
- b. **motoneuroni gamma**, che innervano le fibre intrafusali propriocettive
- c. **motoneuroni beta**, che innervano sia le fibre extrafusali che fibre intrafusali.

In particolare i motoneuroni alfa sono intrinsecamente competenti per innervare fibre veloci o lente. I motoneuroni che innervano le fibre lente esprimono specificamente la glicoproteina Synaptic Vesicle glycoprotein 2A (SV2A) così come

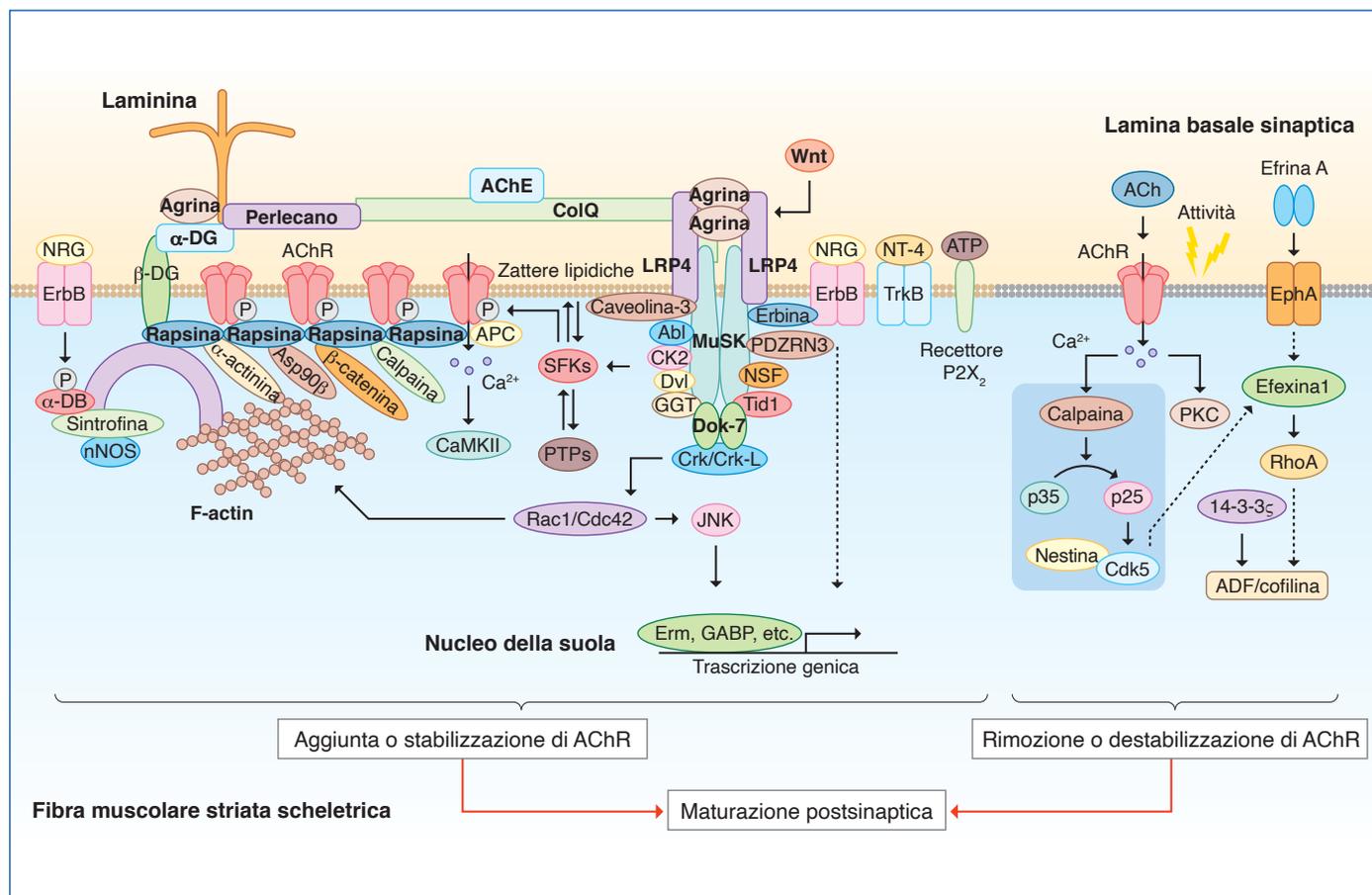


Figura 1.9 La maturazione della regione postsinaptica della placca motrice è regolata da pathway positivi e negativi per la stabilizzazione dei recettori AChR. Le vie di segnalazione positive, comprese quelle attivate dal recettore MuSK, dal complesso distroglicano-glioproteina e dai recettori ErbB e TrkB, agiscono sull'assemblaggio e sul mantenimento dei cluster dei recettori AChR. Al contrario, la sovraregolazione di RhoA mediata da efexina1 e l'attivazione di PKC e del modulatore di actina ADF/cofilina regolano la rimozione dei recettori AChR. Inoltre, le frecce tratteggiate indicano pathway studiati *in vitro* o in sistemi diversi dalla placca motrice.

il recettore Estrogen-related Receptor Beta (ESRRB) subito dopo la nascita. Al contrario, i motoneuroni che innervano le fibre veloci esprimono specificamente il polipeptide Calcitonin Related Polypeptide Alpha (CALCA) e la condrolectina (CHODL). I meccanismi attraverso cui l'innervazione specifica però induce un diverso fenotipo delle fibre muscolari striate scheletriche al momento non sono ancora stati chiariti.

Cenni di organogenesi

EPITELIO OLFATTIVO

L'epitelio olfattivo deriva dai **placodi olfattivi** (o nasali) che si sviluppano alla fine della quarta settimana di sviluppo embrionale, durante l'organogenesi del massiccio facciale, ai lati del processo frontonasale e cefalicamente allo stomodeo. I placodi olfattivi appaiono come due ispessimenti circolari dell'ectoderma che, a seguito del proliferare del mesenchima sottostante, danno luogo alle due **fosse nasali** a forma di ferro di cavallo. Dalle due fosse nasali si formano i **sacchi nasali** che crescono dorsalmente e fino alla sesta settimana di sviluppo embrionale sono separati dalla cavità orale dalla membrana oronasale. Durante la settima settimana di sviluppo embrionale a livello delle **volte nasali** si differenzia l'**epitelio olfattivo** mentre dalla vescicola telencefalica per un fenomeno di evaginazione si forma il **ventricolo olfattivo** che si differenzierà nel **bulbo olfattivo**. Quest'ultimo verrà raggiunto dagli assoni

dei **neuroni olfattivi** differenziati nell'epitelio olfattivo che mettendosi in contatto con i dendriti delle **cellule mitrali** formeranno i **glomeruli olfattivi**. Gli assoni dei neuroni olfattivi costituiscono il **nervo olfattivo** che a causa dello sviluppo della lamina cribrosa dell'osso etmoide viene suddiviso in fascetti (Fig. 1.10).

I segnali molecolari che inducono i placodi olfattivi non sono ancora del tutto chiariti. Uno studio approfondito su embrioni di pollo ha dimostrato che precursori dell'epitelio olfattivo possono essere già riconosciuti in una **fase preplacodica** per l'espressione di *Dlx3*, *Dlx5* e *Pax6*. È importante ricordare però che dati di letteratura suggeriscono espressioni specie-specifiche per questi fattori.

Dopo l'induzione del placode olfattivo lo sviluppo delle cavità nasali è indotta da acido retinoico, Fibroblast Growth Factors (FGFs) e Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) prodotti dal mesenchima frontonasale. È stato dimostrato che l'acido retinoico è coinvolto nell'interazione mesenchima/epitelio e insieme con FGF8, BMP4 e sonic hedgehog (Shh) partecipa alla definizione degli assi nello sviluppo sia dell'epitelio sia del nervo olfattivo. In particolare l'acido retinoico è un segnale laterale, BMP4 posteriore e FGF8 e Shh mediali.

Durante il differenziamento dell'epitelio olfattivo, cellule progenitrici che diventeranno neuroni olfattivi e/o cellule non neuronali mostrano un'espressione finemente regolata nel tempo di geni neuronali e non neuronali regolando così la loro proliferazione, differenziamento, sopravvivenza e rigenerazione. Sono stati identificati diversi fattori, tra i quali fattori trascrizionali ed epigenetici (microRNA e rimodellatori

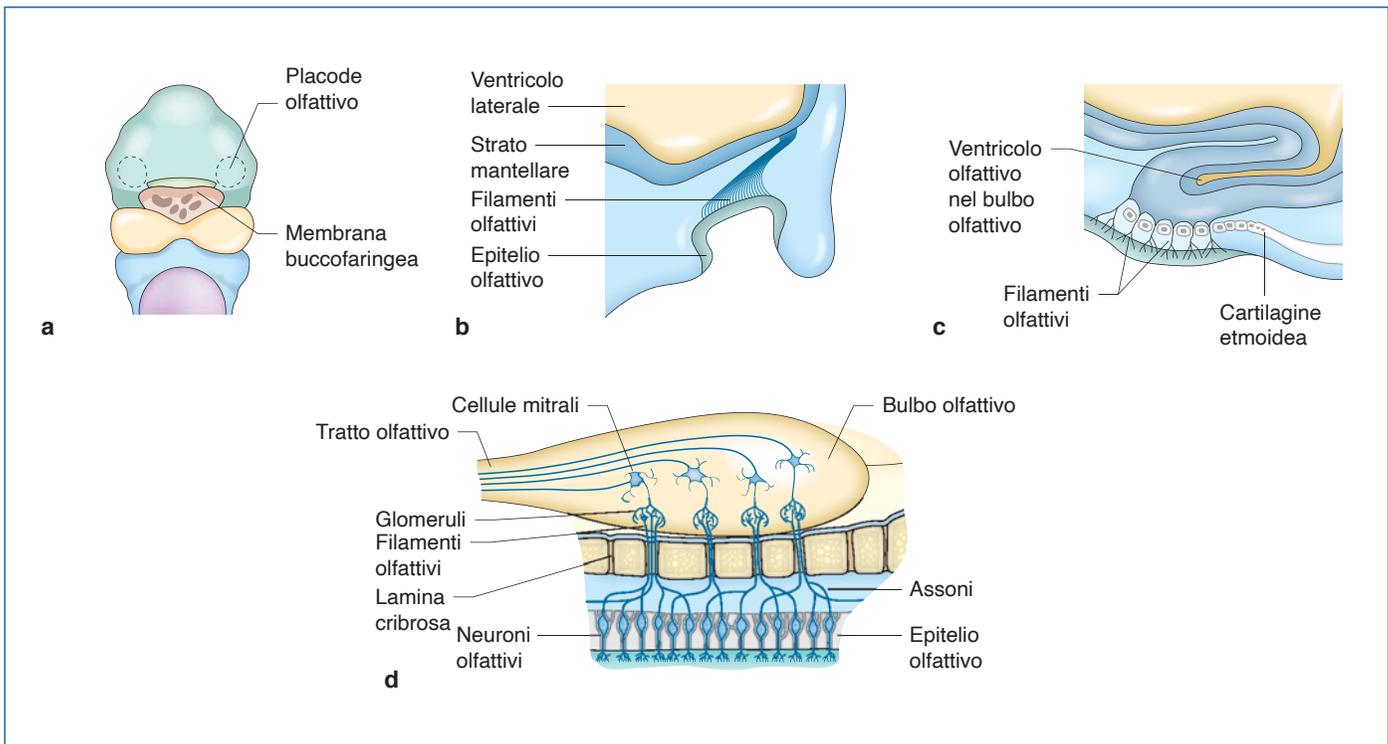


Figura 1.10 Sviluppo del sistema olfattivo. Rappresentazione dell'estremità cefalica di embrione umano. **(a)** Quarta settimana di sviluppo embrionale, vista frontale in cui sono evidenti i placodi olfattivi; **(b-f)** settima settimana di sviluppo embrionale. Sono mostrati diversi stadi di sviluppo del sistema olfattivo che mettono in evidenza l'interazione tra gli assoni dei neuroni olfattivi e le cellule mitrali nel bulbo olfattivo (derivato dal ventricolo olfattivo) e la suddivisione del nervo olfattivo in piccoli fascetti da parte della lamina cribrosa.

della cromatina) che fungono da regolatori per la morfogenesi dell'epitelio olfattivo e permettono il differenziamento sia dei neuroni olfattivi sia delle cellule staminali basali orizzontali (CBO), delle cellule staminali globose (CBG) e delle cellule di sostegno (si veda la descrizione istologica nel Capitolo 2) (Fig. 1.11).

Le cellule staminali orizzontali e globose, disposte nella porzione più basale dell'epitelio, esprimono un set di fattori trascrizionali necessari per mantenere la loro capacità mitotica e per la loro sopravvivenza (si veda Fig. 1.11). Da questi progenitori durante lo sviluppo dell'epitelio olfattivo si differenziano sia i neuroni olfattivi sia le cellule della linea non neuronale (cellule di sostegno, cellule con microvilli e cellule che rivestono i dotti delle ghiandole di Bowman). La linea neuronale si differenzia grazie all'espressione di fattori trascrizionali (Mash1, Ngn1, NeuroD1, Runx1, Insm1, BAF155) che determinano il differenziamento in senso neuronale di progenitori Sox2/Pax6+ che quindi si definiscono a questo stadio **progenitori intermedi (PI)**. Questi ultimi si differenziano poi in **neuroni olfattivi immaturi (NOim)** grazie all'espressione di altri fattori trascrizionali (Lhx2, Cux2, Ctip2, Dlx5, G9a, STAT3, NF1, osnBAF) (si veda Fig. 1.11; Fig. 1.12). Infine i neuroni olfattivi immaturi, sotto l'azione di nuovi fattori trascrizionali subiscono un ulteriore differenziamento durante il quale si sviluppano sia il dendrite (dominio apicale) che l'assone (dominio basale) diventando così **neuroni olfattivi maturi (NO)** (si vedano Figg. 1.11, 1.12). Durante il differenziamento in senso neurale i neuroni olfattivi cambiano la loro posizione all'interno dell'epitelio olfattivo che completa la sua morfogenesi (si veda Fig. 1.12).

Un'ulteriore particolarità della morfogenesi dell'epitelio olfattivo è rappresentata dalla migrazione di alcune cellule dall'epitelio olfattivo (dette in inglese **“olfactory ensheathing cells”**) lungo i fasci di assoni dei neuroni olfattivi che si riscontrano nella lamina propria e lungo il nervo olfattivo fino al bulbo olfattivo.

Questo comporterebbe che alcune cellule dell'epitelio olfattivo siano in grado di migrare dal SNP al SNC. La natura di queste cellule non è però ancora completamente chiarita, soprattutto nei mammiferi, nei quali le **“olfactory ensheathing cells”** potrebbero avere una duplice origine (placode olfattivo e cellule delle creste neurali). In modelli di roditori è stato inoltre dimostrato che queste cellule esprimono marcatori molecolari differenti a seconda della loro localizzazione lungo la via olfattiva.

CALICI GUSTATIVI

Lo sviluppo dei calici gustativi è stato ampiamente studiato nei roditori ed è stato dimostrato che è strettamente controllato all'espressione di Wnt/ β -catenina, Sonic hedgehog (Shh), Sox2 e Notch. In particolare tra questi pathway è stato dimostrato che Wnt/ β -catenina è necessario e sufficiente per il differenziamento dei placodi gustativi oltre che essere attivo anche durante il mantenimento dei calici gustativi nella vita postnatale. Shh invece ha un effetto opposto durante lo sviluppo embrionale e nell'adulto: negli embrioni inibisce lo sviluppo dei calici gustativi durante la specificazione e il **“patterning”** dei placodi gustativi, mentre nell'adulto Shh induce il differenziamento delle cellule gustative. Il fattore trascrizionale Sox2, insieme con il pathway Wnt/ β -catenina, partecipa

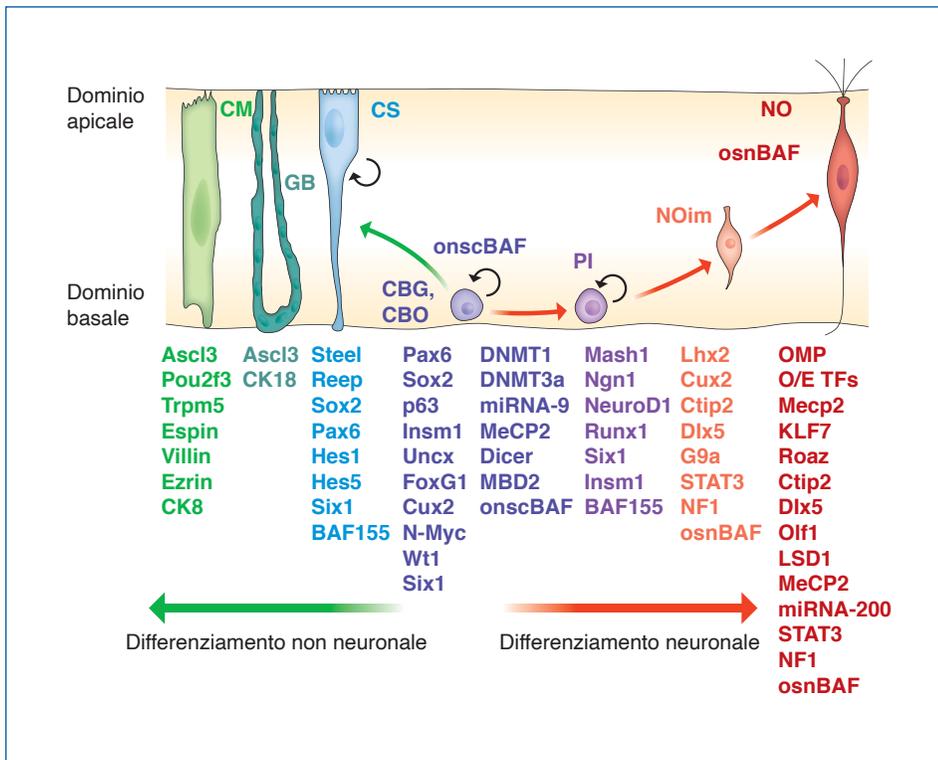


Figura 1.11 Regolazione trascrizionale del differenziamento dell'epitelio olfattivo. Il mantenimento dello stato di staminalità delle cellule progenitrici, CBO e CBG (si veda la descrizione istologica nel Capitolo 2), richiede fattori trascrizionali (*blu*); il differenziamento in senso neuronale di queste cellule prevede l'espressione di diversi fattori trascrizionali che permettono il differenziamento successivo di progenitori intermedi (PI) (*ciclamino*), neuroni olfattivi immaturi (NOim) (*arancione*) e neuroni olfattivi maturi (NO) (*rosso*). I NO maturano sviluppando un singolo dendrite e l'assone rispettivamente verso il dominio apicale e basale. Nell'immagine sono indicati anche i fattori trascrizionali necessari per il differenziamento non neuronale in cellule di sostegno (CS), cellule delle ghiandole di Bowman (GB) e cellule con microvilli (CM).

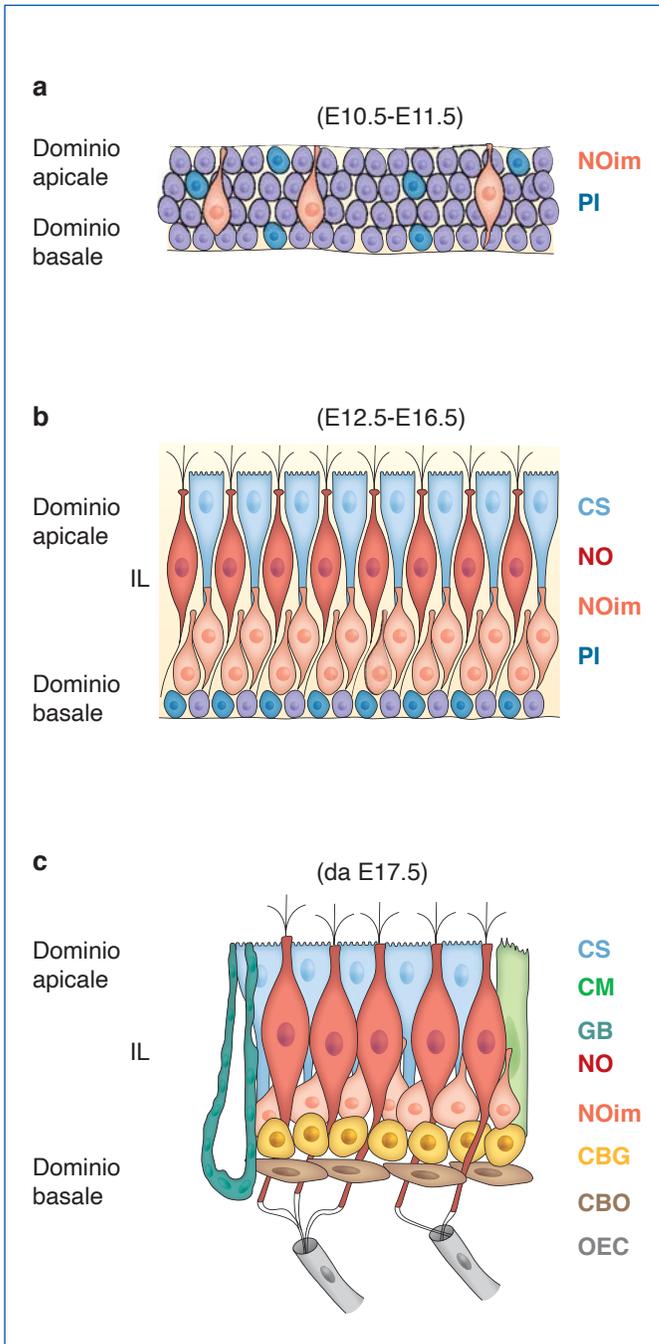


Figura 1.12 Illustrazione schematica delle principali fasi di sviluppo dell'epitelio olfattivo nei roditori. **(a)** Durante le prime fasi embrionali (E10.5–E11.5), l'epitelio olfattivo è costituito principalmente da cellule progenitrici (ciclaminio), alcune delle quali si differenziano in progenitori intermedi (PI) (blu). Si possono trovare rari neuroni olfattivi immaturi (NOim, arancione). **(b)** Nel periodo E12.5–E16.5 l'epitelio olfattivo acquisisce i suoi tre strati: apicale (contenente i corpi cellulari delle cellule di sostegno, CS), intermedio (contenente NO maturi e immaturi) e basale (contenente le cellule progenitrici e PI). **(c)** Dal giorno E17.5 l'epitelio olfattivo presenta lo strato basale con cellule basali globose (CBG) sopra le cellule basali orizzontali (CBO), a loro volta aderenti alla membrana basale. Nello strato intermedio, i neuroni olfattivi immaturi (NOim) durante il loro differenziamento in neuroni olfattivi maturi (NO) acquisiscono il dendrite e l'assone spostandosi nello strato più superficiale. Lo strato apicale contiene principalmente i corpi cellulari delle cellule di sostegno (CS) e alcune cellule dotate di microvilli (CM). La lamina propria, al di sotto dell'epitelio olfattivo, contiene gli assoni dei neuroni olfattivi, avvolti da "olfactory ensheathing cells" (OEC) (si veda la descrizione istologica nel Capitolo 2).

a regolare il differenziamento delle cellule gustative. La tempistica e la distribuzione dell'espressione di Notch indica invece un suo ruolo nella determinazione dei confini delle papille in via di sviluppo e/o nella specificazione dei progenitori delle papille gustative.

Una questione molto studiata e ancora in parte aperta riguarda invece la dipendenza del differenziamento dei calici gustativi dall'innervazione dei calici stessi.

È stato infatti ampiamente dimostrato da decenni che il mantenimento delle papille gustative negli animali adulti è dipendente dalla loro innervazione, mentre quanto lo sviluppo embrionale delle papille gustative sia dipendente da una loro precedente innervazione è tuttora argomento di dibattito. In un modello murino si è dimostrato che lo sviluppo delle papille gustative dipende dalla loro innervazione sensitiva speciale; i dati però non escludono che l'effetto induttivo possa essere dovuto ai precursori delle cellule di Schwann o alle cellule di Schwann mature invece che alle fibre nervose.

Durante la vita prenatale le papille gustative (fungiformi e circumvallate) si differenziano dai placodi gustativi (Fig. 1.13).

Nel topo, al giorno E11.5, la lingua è rivestita da un epitelio bistratificato (costituito da cheratinociti basali e superficiali), disposto al di sopra del mesenchima. Al giorno E12.5, i placodi gustativi si formano all'interno dell'epitelio come gruppi di cellule colonnari. Le fibre nervose sensitive raggiungono i placodi gustativi, ma non penetrano nell'epitelio del placode fino al giorno E15.5. La morfogenesi della papilla gustativa inizia circa al giorno E15.5; l'epitelio si introflette nel mesenchima per formare papille a forma di fungo con porzioni centrali mesenchimali definite e papille gustative immature situate apicalmente a partire dal giorno E18.5. Nei roditori, la maggior parte delle papille gustative fungiformi e circumvallate della lingua non si differenzia completamente se non alla prima settimana postnatale. Al contrario, la maggior parte delle papille gustative del palato molle è differenziata e funzionale alla nascita. La differenziazione precoce a livello del palato potrebbe essere richiesta per l'alimentazione alla nascita; durante la suzione, il latte materno colpisce infatti la parte posteriore della cavità orale (il palato molle) e quindi i calici gustativi di questa regione devono essere funzionali per garantirne l'ingestione.

Una caratteristica peculiare dei calici gustativi è quella di essere costituiti da diversi tipi cellulari (si veda la descrizione istologica nel Capitolo 2) che presentano una vita media di 10-14 giorni nei roditori e vengono continuamente rimpiazzati dai cheratinociti basali (che esprimono la cheratina 5, K5 e 14, K14) e che sono i precursori anche di cellule non appartenenti ai calici gustativi. I cheratinociti K5+/K14+, che entrano nei calici gustativi, cominciano a esprimere Shh (cellule di tipo IV) dopo circa 12 ore dall'ultima divisione mitotica, rappresentando così i precursori di tutti e tre i tipi cellulari (I, II e III). Il 50% delle cellule Shh+ si differenziano in cellule di tipo I, il 20-30% in cellule di tipo II e il 10% in cellule di tipo III. Il diverso destino delle cellule K5+/K14+ dipende dai livelli di β -catenina a cui sono esposte: livelli molto bassi di β -catenina inducono il differenziamento delle cellule in cheratinociti K13+ (che non entrano nel calice gustativo), mentre concentrazioni decrescenti (alta, media, bassa) di β -catenina inducono il differenziamento rispettivamente di cellule di tipo I, II, III (Fig. 1.14).

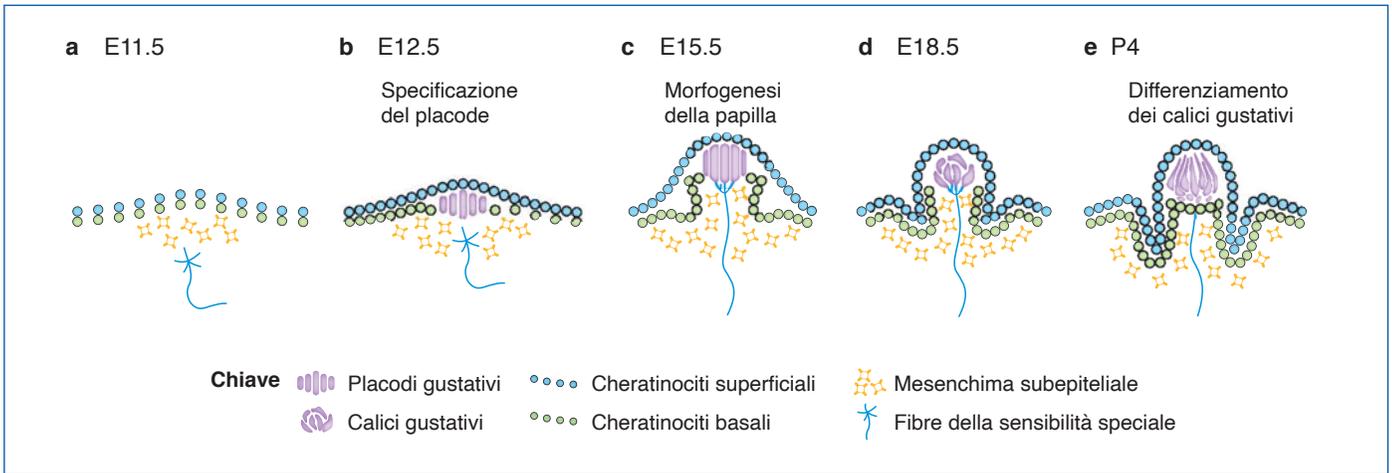


Figura 1.13 Illustrazione schematica delle principali fasi di sviluppo delle papille e dei calici gustativi in embrioni di topo. **(a)** Allo stadio E11.5, il primordio della lingua è rivestito da un epitelio bistratificato (con cheratinociti basali e superficiali) che si trova immediatamente al di sopra del mesenchima subepiteliale. **(b)** Allo stadio E12.5, si formano i placodi gustativi. Le fibre nervose sensitive raggiungono i placodi gustativi. **(c)** Allo stadio E15.5 inizia la morfogenesi della papilla gustativa e le fibre nervose prendono contatto con le cellule epiteliali dei placodi. **(d)** Allo stadio E18.5 i calici gustativi immaturi si trovano all'apice delle papille gustative. **(e)** Entro una settimana dalla nascita (P4) la maggior parte delle papille gustative fungiformi e circumvallate presenta calici gustativi maturi. Va ricordato che il periodo di gestazione del topo è di 18-19 giorni.

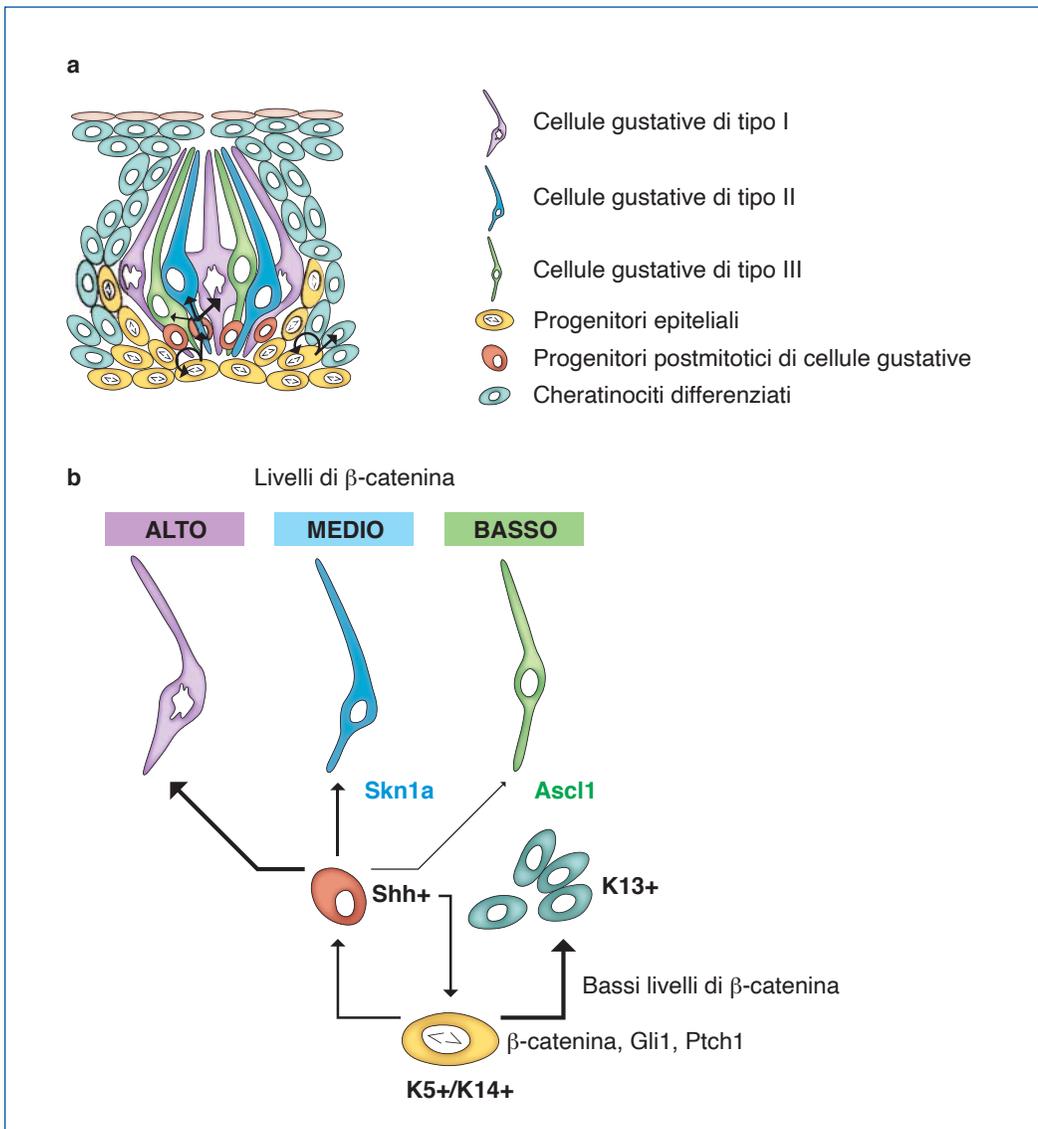


Figura 1.14 Epitelio delle papille gustative in topi adulti. **(a)** I progenitori epiteliali (K5+/K14+) (*gialli*) si dividono in modo asimmetrico per generare nuovi progenitori epiteliali e cheratinociti differenziati (*azzurri*) o progenitori postmitotici (Shh+) di tutti i tre tipi di cellule gustative (*arancione*). **(b)** Modello di regolazione molecolare del differenziamento delle cellule gustative. Il destino dei precursori K5+/K14+ dipende dai diversi livelli di espressione di β -catenina. Livelli bassi di β -catenina promuovono il differenziamento in cheratinociti K13+, mentre livelli più elevati consentono alle cellule figlie di diventare precursori delle cellule gustative Shh+, che a loro volta si differenziano in cellule gustative di tipo I, II o III in risposta rispettivamente a livelli di β -catenina alti, medi o bassi.

RETINA

In questo paragrafo ci occuperemo dello sviluppo in particolare della porzione visiva della tonaca nervosa della retina (si veda anche la descrizione istologica della retina nel Capitolo 2).

Nel suo insieme ciascuna retina deriva da una struttura embriologica chiamata **vescicola ottica** che compare come estroflessione del prosencefalo durante la quarta settimana di sviluppo embrionale (Fig. 1.15).

Alla quinta settimana di sviluppo, ciascuna vescicola ottica rimane collegata al diencefalo tramite il **peduncolo ottico** (che diventerà il nervo ottico). In realtà le cellule che andranno a formare la retina risultano già determinate verso questo differenziamento grazie all'espressione di fattori trascrizionali specifici (Pax6, Rx, Six3) nella regione centrale della placca neurale cefalica (area ottica) durante la quarta settimana di sviluppo embrionale; l'area ottica viene divisa in due, grazie all'espressione, da parte della placca precordale, della proteina Shh che inibisce Pax6 nella parte centrale dell'embrione.

Entro il 28° giorno di vita embrionale ciascuna vescicola ottica si differenzia (grazie all'espressione di Opo e Numb) in un **calice ottico**. I due strati della retina rimarranno separati dallo spazio intraretinico (originariamente la cavità del calice ottico) (si veda Fig. 1.15). Durante la quinta settimana di sviluppo embrionale sia il calice ottico che il peduncolo ottico si fessurano caudalmente formando la **fessura ottica** all'interno della quale alla settima settimana di sviluppo embrionale si troverà l'arteria ialoidea; la fessura ottica verrà invasa degli

assoni delle cellule gangliari che formeranno il nervo ottico. È importante ricordare che la parte distale dell'arteria ialoidea degenera mentre la sua porzione prossimale diventa l'arteria centrale della retina. Contemporaneamente alla formazione della fessura ottica, la parete esterna del calice ottico si differenzia nell'**epitelio pigmentato della retina**, un epitelio monostratificato con granuli di melanina. La parete interna del calice ottico invece si differenzia nella **tonaca nervosa** costituita da più strati (si veda Fig. 1.15). Lo sviluppo della tonaca nervosa è completo al settimo mese di vita embrionale (anche se la maturità visiva si raggiunge solo parecchi mesi dopo la nascita), rendendo così l'occhio sensibile alla luce.

Le cellule della porzione visiva della tonaca nervosa si differenziano in neuroblasti che mediante un meccanismo definito **migrazione nucleare intercinetica** (simile al processo che porta al differenziamento dei diversi strati della corteccia cerebrale) daranno luogo ai diversi strati della retina (si veda la descrizione istologica nel Capitolo 2) le cellule infine raggiungono la loro posizione nei diversi strati della retina mediante un processo chiamato **traslocazione nucleare** (Fig. 1.16).

Il neuroepitelio che costituisce la tonaca nervosa è inizialmente pseudostratificato: tutti i progenitori sono in contatto sia con la superficie apicale (epitelio pigmentato della retina) sia con la superficie basale (interna), mentre la localizzazione del nucleo è variabile lungo l'asse apico-basale. Questa diversa localizzazione del nucleo permette di distinguere le cellule del neuroepitelio nelle diverse fasi del ciclo

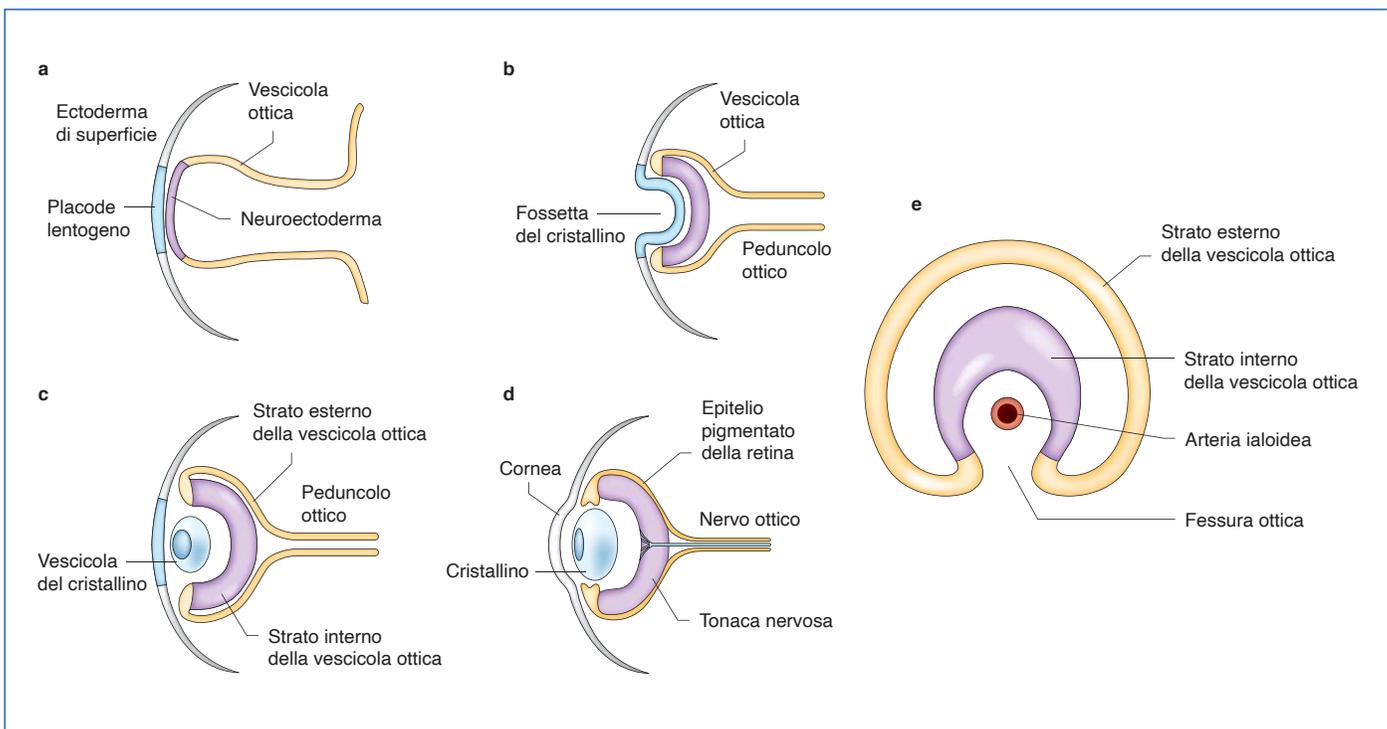


Figura 1.15 Sviluppo embrionale dell'occhio umano. È evidente la formazione (come estroflessione del diencefalo) della vescicola ottica (a,b) da cui si sviluppa il calice ottico che rimane collegato al diencefalo grazie al peduncolo ottico (c,d). Il calice ottico è rivestito dallo strato esterno che si differenzia nell'epitelio pigmentato della retina e dallo strato interno che si differenzia nell'epitelio neurosensoriale della retina (tonaca nervosa). Il cristallino si differenzia dal placode lentogena (ottico). (e) Si evidenzia la formazione nel peduncolo ottico della fessura ottica che contiene l'arteria ialoidea e verrà invasa dagli assoni del nervo ottico.

cellulare: i nuclei in fase M si trovano nella zona apicale, i nuclei in fase S nella zona basale, i nuclei in G1 e G2 nella zona intermedia. Il destino dei neuroblasti è influenzato dal momento in cui escono dal ciclo cellulare. In particolare compaiono prima le cellule gangliari, le cellule amacrine, i coni e le cellule orizzontali e poi le cellule bipolari, i bastoncelli e le cellule di Müller. Questo processo di differenziamento sequenziale è influenzato sia da fattori intrinseci sia estrinseci. In particolare durante la migrazione nucleare interfascica nei neuroblasti, grazie a specifiche proteine di membrana dei processi apicale e basale vengono attivati differenti pathway molecolari: a) i processi citoplasmatici a contatto con lo strato pigmentato presentano giunzioni aderenti e occludenti che sono coinvolte nella determinazione delle cellule progenitrici; a livello di queste giunzioni sono presenti molecole segnale (protein chinasi C atipica, aPKC, e cdc42) essenziali per il normale compimento della migrazione nucleare intercinetica; b) a livello dei processi citoplasmatici a contatto con la membrana basale sono invece presenti complessi segnale associati alle adesioni focali importanti per la proliferazione cellulare e la morfogenesi.

La migrazione nucleare interfascica regola inoltre l'esposizione del nucleo al pathway molecolare di Notch, controllando la proporzione di cellule che escono dal ciclo cellulare e vanno incontro a differenziazione. In particolare è stato dimostrato in modelli murini che il rilascio di ATP dalle cellule dell'epitelio pigmentato della retina aumenta l'espres-

sione di Notch nella porzione apicale delle cellule del neuroepitelio innescando il pathway molecolare Notch-Delta che influenza la capacità differenziativa delle cellule del neuroepitelio. A seguito della mitosi una cellula figlia, in prossimità dello strato pigmentato della retina, lega più efficacemente il ligando Delta, attivando il pathway di Notch; il pathway molecolare mantiene la cellula allo stato di progenitore. D'altra parte l'altra cellula figlia ha un legame recettore-ligando minore e procede verso la differenziazione. Quindi l'espressione differenziale dei componenti del pathway molecolare Notch-Delta, in combinazione con altre molecole segnale e fattori trascrizionali, controlla le diverse ondate di neurogenesi nella retina in via di sviluppo.

ORECCHIO INTERNO

Nei vertebrati, la percezione del suono e della posizione del capo sono dipendenti dagli epitelii neurosensoriali situati nella coclea e nel vestibolo dell'orecchio interno. Ogni neuroepitelio è composto da cellule ciliate meccanosensoriali e cellule di supporto non sensoriali che circondano le cellule ciliate disposte a formare un mosaico alternato. Prima di affrontare quali siano i pathway coinvolti nel differenziamento di questi due tipi cellulari accenniamo brevemente allo sviluppo dell'orecchio interno.

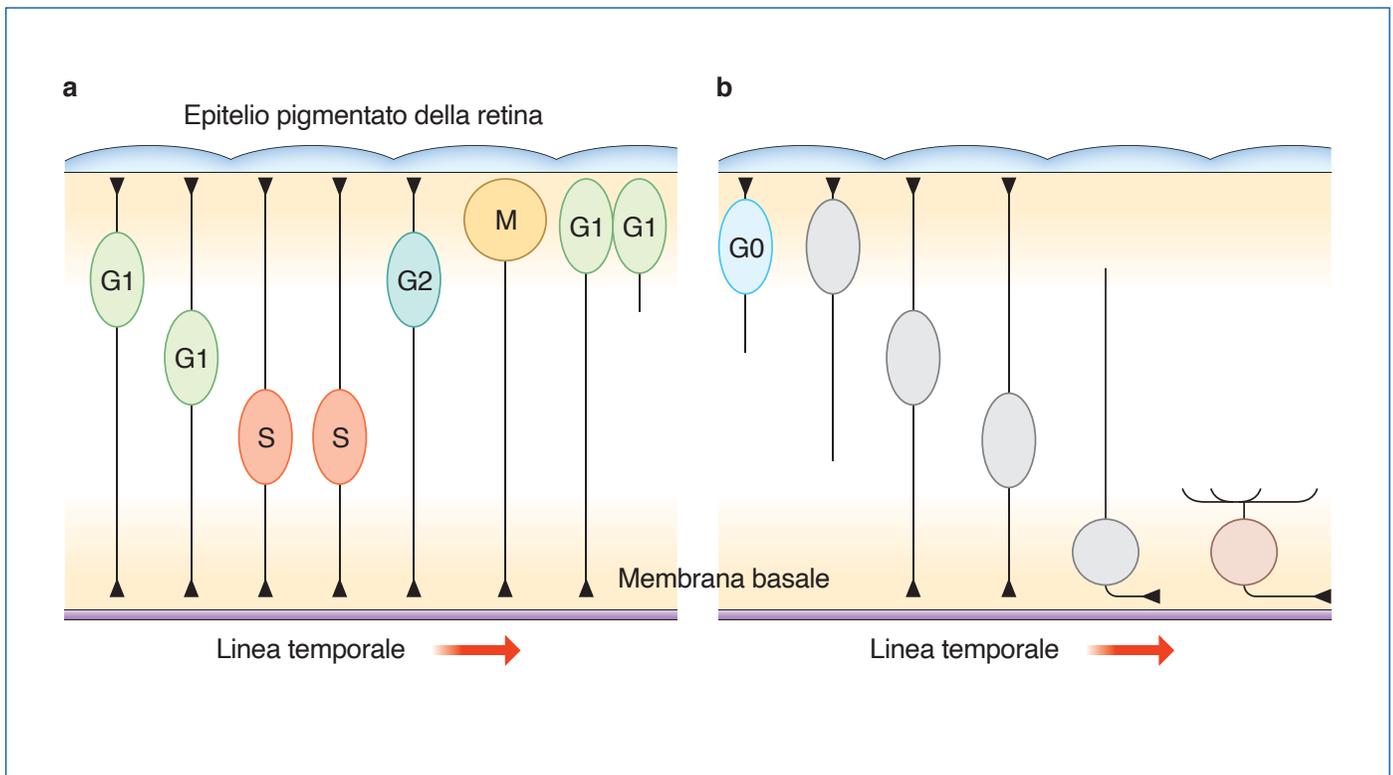


Figura 1.16 Differenziamento cellulare all'interno della porzione visiva (pars optica) della tonaca nervosa. **(a)** Modello di migrazione nucleare intercinetica. I nuclei delle cellule neuroepiteliali si muovono lungo l'asse apico-basale in entrambe le direzioni. La fase M del ciclo cellulare è limitata alla superficie apicale vicino all'epitelio pigmentato della retina. **(b)** Modello di traslocazione nucleare. Dopo l'uscita dal ciclo cellulare, i progenitori migrano mantenendo i loro processi apicali e basali fino a quando il soma raggiunge la posizione definitiva.

All'inizio della quarta settimana di sviluppo embrionale, a livello della porzione caudale del romboencefalo (I arco branchiale), grazie all'induzione molecolare da parte della notocorda e del mesoderma parassiale, l'ectoderma di rivestimento si ispessisce formando i due **placodi acustici**. Da questi, mediante introflessione della porzione ectodermica nel mesenchima sottostante, si formano le due **vescicole acustiche** (o otocisti) (Fig. 1.17).

Dalla regione ventrale dell'otocisti delaminano i neuroblasti che daranno origine al **ganglio statoacustico**, la cui estremità ventrale andrà ad affiancarsi al canale cocleare seguendo la sua spiralizzazione, fino a divenire il **ganglio spirale**. Grazie a induzioni molecolari ciascuna vescicola acustica subirà una serie di modificazioni morfogenetiche che entro la fine del secondo mese di sviluppo embrionale permetteranno la formazione delle principali regioni dell'orecchio interno. L'instaurarsi dell'asse dorsoventrale è determinato da gradienti opposti di Wnt e Shh prodotti rispettivamente dal romboencefalo dorsale e dalla notocorda; l'asse anteroposteriore è determinato da un gradiente di acido retinoico; l'asse mediolaterale è in parte determinato da FGF3 prodotto dal romboencefalo e da fattori ancora non identificati. La porzione ventrale della otocisti si differenzierà nel **sacculo** e nel **canale cocleare** mentre la porzione dorsale darà luogo all'**utricolo**, i **canali semicir-**

colari e il **canale endolinfatico** (si veda Fig. 1.17). In particolare la coclea comincia a differenziarsi dalla settima settimana di sviluppo embrionale e alla sedicesima settimana di sviluppo embrionale al termine della spiralizzazione raggiungerà la lunghezza adulta, mentre alla ventitreesima settimana di sviluppo embrionale si completerà l'ossificazione. Intorno alla diciottesima settimana di sviluppo embrionale si avrà invece la canalizzazione del tunnel del Corti e la formazione dello spazio di Nuel fondamentale per la migrazione delle fibre nervose dirette verso le cellule neurosensoriali.

Il differenziamento degli epiteli neurosensoriali è stato studiato nel dettaglio in modelli murini. Le cellule ciliate e di supporto degli epiteli neurosensoriali derivano da un pool di progenitori epiteliali inizialmente localizzato nella regione ventromediale dell'otocisti. Durante il corso dello sviluppo embrionale, questi progenitori vengono specificati come **precursori prosensoriali** che poi vengono ripartiti in diverse regioni dell'orecchio interno. A seconda della loro localizzazione daranno quindi luogo al neuroepitelio sensoriale dell'organo del Corti e delle macule dell'utricolo e del sacculo e delle creste ampollari dei dotti semicircolari e poi si differenzieranno in cellule ciliate o di supporto. L'instaurarsi di questa diversità cellulare richiede più fasi, con conseguente restri-

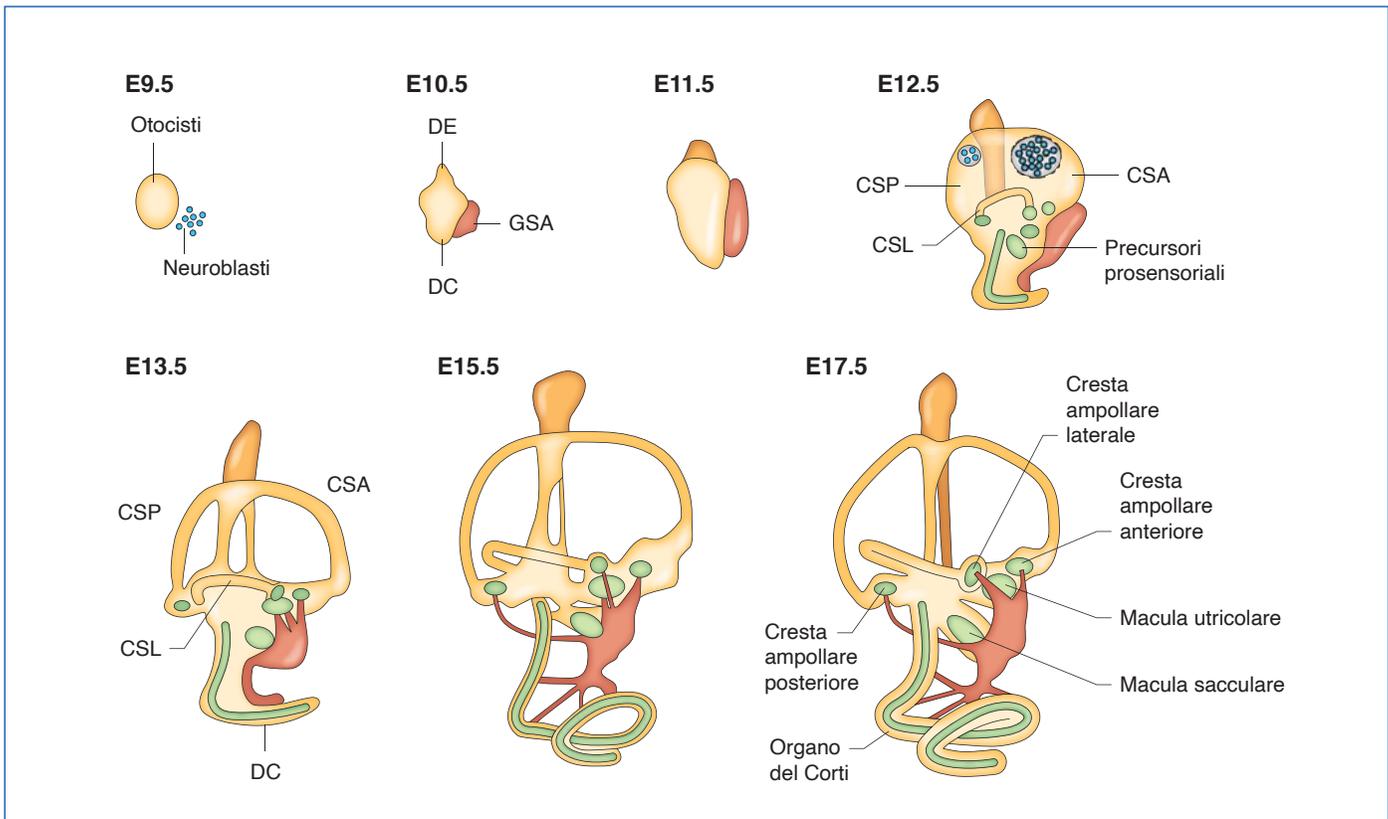


Figura 1.17 Sviluppo dell'orecchio interno (gli stadi indicati si riferiscono allo sviluppo nel topo). Tutte le strutture dell'orecchio interno si sviluppano da un placode acustico che si introflette per formare l'otocisti (E9.5). I neuroblasti delaminano dalla regione ventrale dell'otocisti. Da questi neuroblasti, vicini all'orecchio interno in via di sviluppo, si differenzierà il ganglio statoacustico (GSA) (E10.5). Entro lo stadio E10.5, l'otocisti inizia a cambiare forma a causa dello sviluppo del dotto endolinfatico (DE) e del dotto cocleare (DC). Entro lo stadio E12.5, si possono identificare i canali semicircolari in via di sviluppo, anteriore (CSA), posteriore (CSP) e laterale (CSL). Ogni canale si forma dall'otocisti come una estroflessione appiattita la cui porzione centrale subisce un fenomeno di riassorbimento che determina l'aspetto maturo dei canali. Allo stadio E13.5, il dotto cocleare ha completato circa tre quarti di giro e i neuroni del GSA in via di sviluppo hanno sviluppato i loro dendriti che prendono contatto con le cellule ciliate in via di sviluppo in tutte le regioni in cui sono presenti gli epiteli neurosensoriali. Durante gli stadi E15.5 e E17.5, diverse regioni dell'orecchio interno (compresa la coclea) continuano a espandersi.

zione progressiva della potenzialità delle cellule fino ad arrivare al differenziamento definitivo. Tipicamente, le cellule ciliate si sviluppano in una regione specifica, e poi il differenziamento progredisce seguendo uno schema preciso. Le cellule di supporto si sviluppano secondo un processo simile alle cellule ciliate, anche se con un ritardo che dipende dalla specie e dalla regione dell'orecchio interno.

Sebbene tutti gli epiteli prosensoriali nell'orecchio interno derivino da un pool di progenitori comuni, ogni epitelio si sviluppa con una morfologia unica e contiene tipi cellulari particolari. Le cellule ciliate situate negli epiteli sensoriali uditivi sono morfologicamente e fisiologicamente differenti rispetto alle cellule ciliate negli epiteli vestibolari. I fattori che generano questa diversità sono probabilmente dipendenti, in una certa misura, dai pathway molecolari che inducono il differenziamento lungo gli assi tridimensionali.

Riportiamo per esempio la modalità di differenziamento dell'epitelio neurosensoriale dell'organo del Corti nei roditori. La vescicola acustica è rivestita da un epitelio pseudostratificato che durante l'allungamento della coclea continua a subire divisioni mitotiche. Le cellule precursori del neuroepitelio (esprimenti il fattore trascrizionale Sox2) escono dal ciclo mitotico a partire dal giorno E14. Tra il giorno E14 ed E16,

questa regione del dotto si restringe sia lungo l'asse mediale-laterale sia lungo l'asse basale-luminale. Il differenziamento cellulare all'interno di questo dominio precursore del neuroepitelio avviene seguendo un gradiente temporale tra la base e l'apice della coclea (Fig. 1.18).

Cellule prosensoriali cocleari escono dal ciclo cellulare (in risposta all'espressione di CDKN1B) in un gradiente che inizia all'apice e si estende verso la base del condotto cocleare tra E12 ed E14. La differenziazione cellulare (determinata dall'espressione ATOH1) inizia vicino alla base al giorno E13 e si estende all'apice al giorno E16. La differenziazione cellulare è regolamentata attraverso una diminuzione da parte dei neuroni dei gangli spirali dell'espressione di Shh (che a sua volta riduce l'espressione di Lin28b/Hmg2 nelle cellule precursori del neuroepitelio) il quale influenza lo sviluppo del neuroepitelio sempre seguendo un gradiente temporale dalla base all'apice della coclea. D'altra parte il processo di differenziamento delle cellule neurosensoriali e delle cellule di supporto è in gran parte mediato attraverso l'inibizione laterale mediata da Notch.

Nello specifico le cellule che si differenziano in cellule neurosensoriali (esprimenti ATOH1) sovraesprimono i ligandi di Notch, DLL1 e JAG2 (Fig. 1.19).

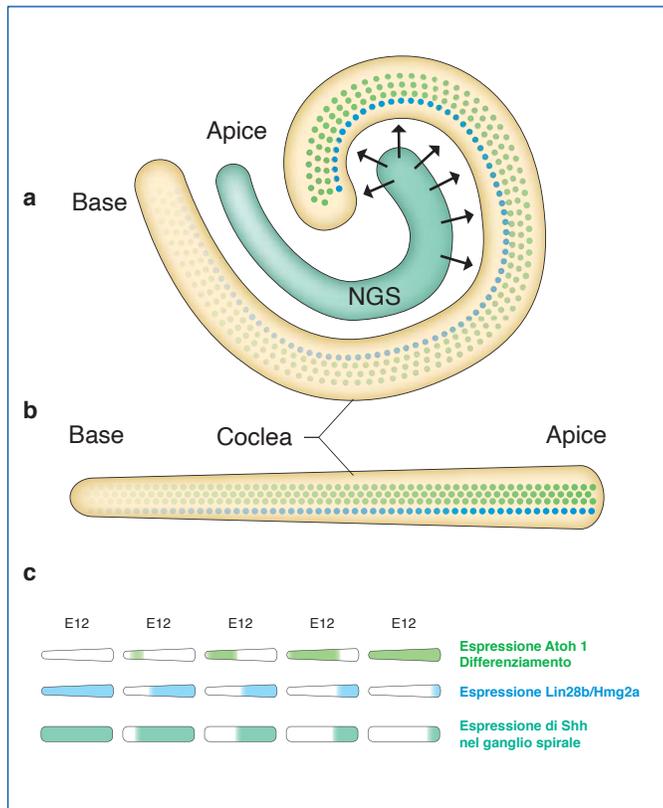


Figura 1.18 Regolazione del differenziamento cellulare nella coclea. Il differenziamento avviene attraverso diversi eventi, che si verificano in gradienti lungo l'asse baso-apicale. **(a)** Si evidenzia la stretta interazione tra la spirale della coclea e i neuroni del ganglio spirale (NGS). **(b)** Il dotto della coclea è raffigurato linearmente con la base stretta che rappresenta l'estremità che risponde alle alte frequenze e l'apice più ampio che rappresenta l'estremità che risponde alle basse frequenze. **(c)** Il pannello inferiore raffigura alcuni degli eventi (e delle molecole regolatrici) che si verificano durante i vari stadi di sviluppo cocleare.

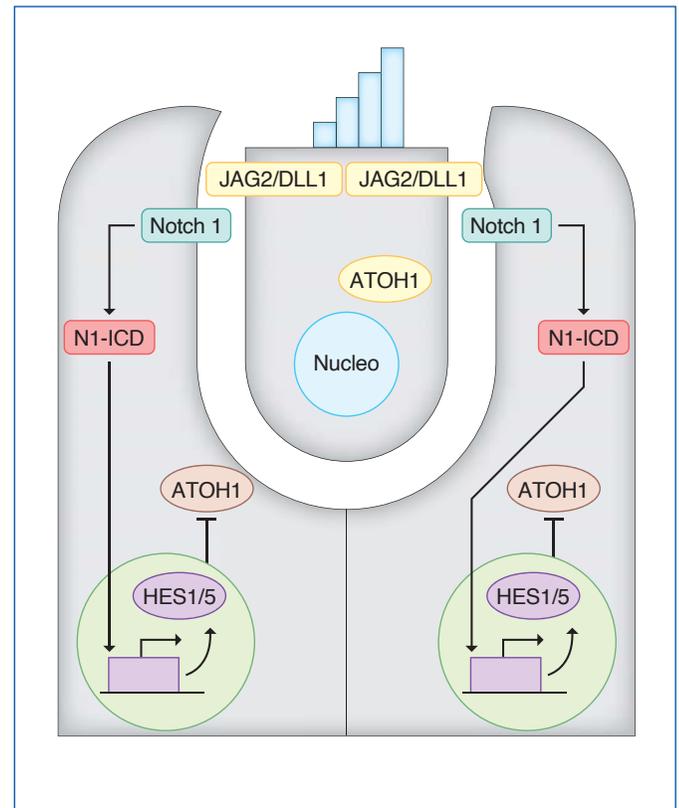


Figura 1.19 Differenziamento cellulare a livello della coclea. Le cellule ciliate esprimono JAG2 e delta1 (DLL1). Entrambi i ligandi si legano a Notch nelle cellule adiacenti, determinando il rilascio del frammento intracellulare (ICD), che a sua volta determina la sovraespressione delle proteine HES1/5. Queste inibiscono ATOH1, e di conseguenza bloccano la loro capacità di differenziare in cellule acustiche. Le cellule inibite si differenziano in cellule di supporto.

