

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO



Dottorato di Ricerca In

Fisiopatologia, Farmacologia, Clinica e Terapia

delle Malattie Metaboliche (XXV ciclo)

Anno accademico 2011-2012

Settore scientifico disciplinare: BIO14

Tesi Sperimentale

**RECUPERO MOTORIO IN MODELLO MURINO DI MORBO DI
PARKINSON DOPO TRAPIANTO DI
CELLULE STAMINALI POST-MORTEM**

Coordinatore del Corso di Dottorato: Chiar.mo Prof. A. Gorio

Docente guida: Chiar.mo Prof. A. Gorio

Dottorando: Andrea Raspa

Matr. n°: R08816

RIASSUNTO

Abbiamo studiato una strategia per migliorare i sintomi motori di topi che avevano ricevuto lesioni con una neurotossina specifica, MPTP, un modello murino di morbo di Parkinson, attraverso il trapianto di precursori cellulari post mortem nello striato.

I precursori cellulari neurali post-mortem (PM-NPC) sono stati isolati dalla zona subventricolare (SVZ) dei ventricoli laterali del topo, coltivati in vitro e la loro capacità di differenziarsi è stata studiata valutando l'espressione di diversi marcatori neurali. PM-NPC differenziano in neuroni e in gran parte a differenza di molti altri precursori, mantengono la capacità di migrazione e integrazione, quando trapiantate nel cervello adulto. Abbiamo eseguito il trapianto di PM-NPC nei gangli della base di topi MPTP lesionati. PM-NPC trapiantate sopravvivono, differenziano e si integrano nel circuito di accoglienza, e modificano il comportamento motorio nei topi MPTP lesionati. I nostri dati suggeriscono che il trapianto di PM-NPC nel corpo striato è un approccio promettente per investigare i potenziali benefici di rimodellamento dei circuiti dei gangli basali nelle malattie neurodegenerative.

SUMMARY

We investigated a strategy to ameliorate the motor symptoms of mice that received MPTP lesions, a rodent model of Parkinson's disease, through transplantation of adult precursor post-mortem cells into the striatum.

Post mortem neural precursors (PM-NPCs) were isolated from the subventricular zone (SVZ), grown in vitro and their differentiation capability was investigated by evaluating the expression of different neuronal markers. PM-NPCs differentiate mostly in neurons and unlike most other precursor cells, retain the capacity for migration and integration when transplanted into the adult brain. We performed PM-NPCs transplantation into the basal ganglia of MPTP lesioned mice. Transplanted PM-NPCs survived, differentiated and integrated into host circuitry, and modified motor behavior in MPTP lesioned mice. Our data suggest that PM-NPCs transplantation into the the striatum is a promising approach to investigate the potential benefits of remodeling basal ganglia circuitry in neurodegenerative diseases.

Indice

1. INTRODUZIONE	5
2. OBIETTIVI DEL LAVORO DI RICERCA	36
3. MATERIALI E METODI	37
4. RISULTATI	47
5. DISCUSSIONE	82
6. BIBLIOGRAFIA	83

1. INTRODUZIONE

1.1 Inquadriamo la malattia di Parkinson

La malattia di Parkinson, seconda patologia neurodegenerativa più comune (dopo il morbo di Alzheimer) (De Lau et al., 2006), è un disturbo del sistema nervoso centrale caratterizzato principalmente dalla degenerazione cronica e progressiva di alcune cellule nervose situate in una zona profonda del cervello denominata *Substantia Nigra* (Davie CA et al., 2008). I neuroni che si trovano in questa zona producono un neurotrasmettitore chimico, la *dopamina*, essenziale per l'attivazione di un circuito che controlla il movimento (Carlsson et al., 1959).

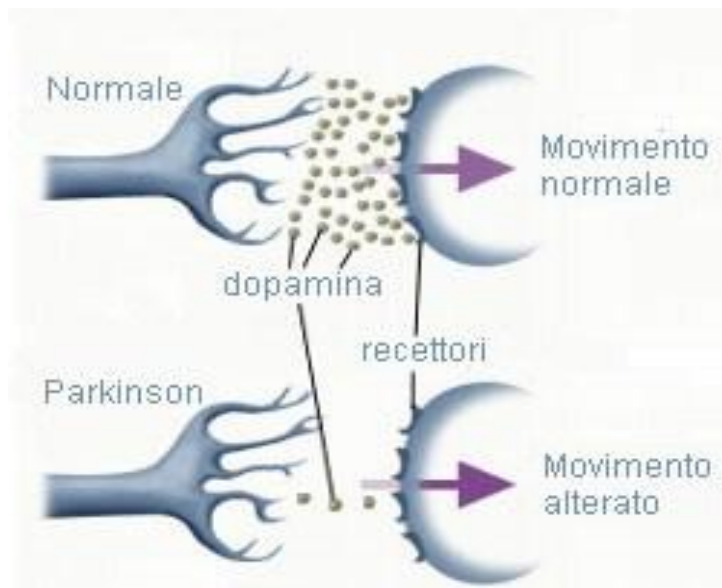


Figura 1: livelli di DA in un neurone normale e in uno affetto da MP

1.1.1 Aspetti storici

La malattia di Parkinson venne descritta per la prima volta nel 1817 dal medico inglese James Parkinson nel suo trattato *An Essay on the Shaking Palsy* (Trattato sulla paralisi agitante) in questi termini: *“moto tremolante involontario, con forza muscolare ridotta, di parti non in azione, anche quando vengono sorrette; con propensione a piegare il tronco in avanti e a passare da un’andatura al passo alla corsa in assenza di alterazioni sensitive e dell’intelletto”*.

Paralisi agitante è il nome che identificò la malattia per quasi un secolo, fino a quando si rese conto che la definizione risultava inappropriata perché i malati di

Parkinson non sono effettivamente paralizzati, non hanno deficit di forza ma difficoltà di movimento.

Tra il 1868 e il 1881 gli studi di Jean-Martin Charcot divennero un punto di riferimento nella comprensione della malattia. Charcot operò la distinzione tra rigidità, debolezza e bradicinesia e sostenne anche la ridenominazione della malattia in onore di James Parkinson (Charcot 1890). Nel 1912 Frederic Lewy descrisse le particelle microscopiche presenti nel cervello colpito dalla malattia, poi chiamate *Corpi di di Lewy* (Rodrigues e Silva 2010) da Konstantin Tretiakoff il quale nel 1919 scoprì che la Sostanza Nera è la principale struttura cerebrale colpita dalla malattia.

I cambiamenti biochimici fondamentali che avvengono nel Parkinson vennero individuati nel 1950, grazie soprattutto al lavoro svolto in Svezia da Arvid Carlsson sul neurotrasmettitore dopamina.

Nel 1911 venne sintetizzata da Kazimierz Funk la *levodopa* (l-dopa), ma essa, per circa 50 anni, ricevette poca attenzione fino a quando a Vienna nel 1961 l'allora direttore del dipartimento di Neurologia dell'ospedale cittadino, Walther Birkmayer, e Oleh Hornykiewicz, farmacologo del locale istituto di biochimica, pensarono di somministrarla per via endovenosa ai pazienti parkinsoniani per sostituire la dopamina mancante.

Un altro passaggio fondamentale nella storia del Parkinson fu la messa a punto di modelli sperimentali della malattia, e come spesso accade nella storia delle scoperte scientifiche, tutto iniziò con un'osservazione casuale. All'inizio degli anni Ottanta un giovane chimico, Barry Kidston tossicodipendente, decise di sfruttare le proprie conoscenze per creare in laboratorio una droga "legale". L'uomo utilizzò per diversi mesi questa sostanza, ma poi volendo modificarne alcune proprietà – creò involontariamente una sostanza tossica chiamata MPTP (1-Metil 4-Fenil 1,2,3,6-Tetraidropiridina), un composto secondario che si forma durante la sintesi della meperidina (eroina sintetica). Dopo poche assunzioni di questa nuova droga, iniziò a mostrare sintomi quali lentezza, rigidità e tremore; portato in ospedale, fu curato con successo con la somministrazione di l-dopa. Iniettato negli animali, l'MPTP ricreò per la prima volta un quadro clinico del tutto analogo a quello riscontrato nella malattia di Parkinson (The Case of the Frozen Addicts (J.W Langston 1995).

La forma più frequente di malattia di Parkinson è detta sporadica, cioè senza un'ereditarietà all'interno della stessa famiglia. L'età media d'insorgenza è intorno ai 50-60 anni.

Oltre alla forma sporadica, esistono forme ereditabili geneticamente, ma esse sono più rare (circa il 5% dei casi) rispetto alla prima (Samii A. et al., 2004).

La malattia colpisce entrambi i sessi ed è ubiquitariamente diffusa a livello mondiale. Si calcola che nei paesi industrializzati il numero di persone affette da malattia di Parkinson sia di

120-180 casi ogni 100000 abitanti; in Italia essa varia da 152 casi ogni 100000 abitanti. Si stima anche che in un anno vi siano dagli 8 ai 18 nuovi casi ogni 100000 abitanti.

Si può pertanto ritenere che attualmente esistano in Italia circa 200000 persone affette da Parkinson, 1,2 milioni in Europa e oltre 20 milioni nel mondo.

Di conseguenza, l'impatto economico della malattia è enorme: è stato infatti stimato che il costo sostenuto dai sistemi sanitari europei ammonta a ben 13,9 miliardi di euro all'anno.

1.1.2 Cosa non funziona?

La principale funzione della sostanza nera è la produzione della dopamina, i neuroni della sostanza nera utilizzano la dopamina per comunicare con i neuroni presenti in altre aree cerebrali, chiamate *gangli della base*, di cui lo *striato* è il nucleo principale. I neuroni che dalla sostanza nera raggiungono lo striato costituiscono la *via nigrostriatale*, che costituisce la parte fondamentale di un circuito nervoso deputato al controllo del movimento, della postura e della marcia, chiamato *sistema extrapiramidale*.

La perdita di questi neuroni e la conseguente deplezione di dopamina determina una riduzione dell'efficacia di questo sistema neuronale (Albin et al., 1989; Mink e Thach, 1993; Wichmann e De Long 1993).

In maggiore dettaglio, non tutta la sostanza nera produce dopamina: essa è divisa in *sostanza nera compatta* e *sostanza nera reticolata* e soltanto la sostanza nera compatta contiene neuroni dopaminergici.

La sintesi della dopamina avviene a partire dalla *tirosina*, un amminoacido presente nel nostro organismo, tramite una serie di processi biologici ognuno regolato da un enzima.

La dopamina prodotta viene accumulata nel neurone della sostanza nera in vescicole e viene poi liberata nello spazio intersinaptico, dove entra in contatto con recettori localizzati sui neuroni circostanti per diffondere il segnale nervoso.

Oltre ai recettori circostanti, è presente anche un autorecettore di tipo inibitorio che si trova sia sui corpi cellulari sia sulle terminazioni presinaptiche dei neuroni dopaminergici; esso ha un ruolo di controllo sulla frequenza di scarica e sulla liberazione di dopamina da parte del neurone stesso. L'azione della dopamina ha termine nel momento in cui viene ricaptata dalle terminazioni presinaptiche e degradata dagli enzimi *monoamino-ossidasi* (MAO-A e MAO-B) e *catecol-o-metiltransferasi* (COMT) (Blaschko et al., 1963).

Le attività motorie vengono apprese in maniera cosciente dal nostro cervello, e vengono conservate in una memoria particolare, detta "procedurale", che quando attivata, richiama l'insieme delle

attività muscolari complesse, necessarie alla completezza del gesto, in maniera automatica, senza cioè che l'esecutore abbia coscienza dei muscoli coinvolti durante il movimento.

Il sistema extrapiramidale ha proprio il compito di facilitare le aree corticali in cui è conservata la memoria procedurale e di inibire le altre aree che potrebbero interferire con il gesto volontario.

Di questo sistema lo striato rappresenta il nucleo d'entrata del circuito, poiché riceve informazioni da tutta la corteccia, allo stesso modo, sempre all'interno dello striato arrivano anche i neuroni dopaminergici della sostanza nera (*neuroni nigrostriatali*) che hanno la funzione di modulare queste afferenze provenienti dalla corteccia.

Tra lo striato (stazione d'entrata) e il globo pallido interno (stazione d'uscita) vi sono complessi collegamenti all'interno del circuito, che si dividono principalmente in due vie: una via diretta, che ha un'azione attivante sul movimento, e una via indiretta, che ha un'azione inibitoria.

Si ritiene che le vie, diretta e indiretta, siano in una sorta di equilibrio funzionale reciproco: la compromissione della sostanza nera, come accade nella malattia di Parkinson, altera questo equilibrio. In particolare si ha una riduzione dell'attività della via diretta e un aumento di attività della via indiretta, non più inibita, con un'iperattivazione del nucleo subtalamico e una riduzione di attivazione motoria del talamo sulla corteccia.

Nei soggetti malati di Malattia di Parkinson è stato dimostrato, inoltre, una diminuzione del numero di spine a livello dendritico dei neuroni della via indiretta (Day et al, 2006; Deutch 2006; Neely et al, 2007) come meccanismo compensatorio per attenuare tale eccitabilità.

La maggiore attivazione di questa via, associata ad una diminuita attività dei neuroni striatali della via diretta, induce un aumento dell'output inibitorio dalla *substantia nigra pars reticulata* (SNpr) e *globus pallidus interno* (GPi) al talamo e, quindi, in una diminuita attività degli stessi verso la corteccia motoria. Ma il quadro non sembra essere così semplice. L'iperattività del nucleo subtalamico (STN) non sembra essere mediata solo dall'attivazione del *globus pallidus esterno* (GPe) come indicato dal modello base (Blandini et al., 2000). Questa potrebbe derivare anche dalla proiezione diretta corticosubtalamica che risulta essere ancora funzionale, anche nella fase terminale della malattia (Frank et al., 2007).

Inoltre esiste un'evidenza anatomica di una connessione glutammatergica tra il STN e la SNpc (Smith et al, 1992 e 1996; Iribe et al, 1999). Attraverso questa via eccitatoria, STN influenza l'attività dei neuroni nigrali (Smith and Grace, 1992). Quindi, la disinibizione del STN che segue il danno nigrostriatale produce una sovrastimolazione dei neuroni residui della SNpc peggiorando il danno iniziale e creando un circolo vizioso sostenuto da se stesso (Rodriguez et al, 1998).

Infatti una delle più recenti terapie per alleviare i sintomi della MP è quella di ridurre l'attività del STN attraverso l'impianto di un elettrodo all'interno del nucleo che, stimolato ad elevata frequenza

(Deep Brain Stimulation, DBS) (Troster Al. 2009), dovrebbe agire attraverso questi 2 meccanismi: inibizione del soma per stimolazione di rilascio di GABA dalle afferenze provenienti dal GPe; attivazione delle efferenze del STN ai nuclei output SNr e GPi con conseguente attivazione della via talamo-corticale compensando il difetto iniziale.

Non sono ancora noti i motivi precisi della perdita dei neuroni nigrostriatali. È stato dimostrato come la perdita cellulare inizi molti anni prima rispetto alla comparsa dei sintomi motori e in particolare questi compaiono solo dopo che la quantità di dopamina in sede nigrostriatale si sia ridotta di almeno l'80% rispetto al quantitativo originario, in seguito ad una perdita equivalente a 500000 neuroni dopaminergici della sostanza nera. Nella fase precedente al superamento di questa soglia, la deplezione di dopamina viene compensata attraverso un aumento del suo turnover e un aumento della sensibilità dei recettori striatali per la dopamina, mascherando così il danno funzionale e ritardando la comparsa dei sintomi.

Nei pazienti parkinsoniani il numero dei neuroni diventa drammaticamente basso, inferiore a 150000. Si verificano anche modificazioni qualitative in quanto i neuroni appaiono più piccoli rispetto a quelli dei soggetti sani di pari età.

1.1.3 Le cause: ambiente e geni

Attualmente si ritiene che essa sia dovuta a un insieme di più fattori che interagendo tra loro ne determinano la comparsa. Questi fattori possono essere di tipo ereditario o di tipo acquisito. Nella maggior parte dei casi di Parkinson sporadico si ritiene che i fattori di tipo acquisito siano preponderanti nella genesi della malattia, anche se non va esclusa la possibilità di una predisposizione genica.

Alla fine degli anni Settanta furono riportati casi di soggetti con comparsa di sintomi parkinsoniani dopo assunzione di MPTP (Nicklas et al., 1985). Si scoprì poi che questa sostanza è selettivamente tossica per i neuroni dopaminergici: in particolare il suo metabolita attivo, MPP+, esercita un'inibizione sulla catena respiratoria mitocondriale dei neuroni determinando un deficit energetico cellulare con produzione di radicali liberi dell'ossigeno dannosi per la cellula. Dati epidemiologici hanno identificato un insieme di sostanze strutturalmente simili alla MPTP contenute in insetticidi ed erbicidi il cui uso potrebbe rappresentare un fattore di rischio per la malattia di Parkinson (Mc Naught et al., 2004).

E' stato dimostrato che pazienti parkinsoniani presentavano un deficit nell'attività del complesso I della catena respiratoria mitocondriale (Parker et al, 1989; Schapira et al, 1990). Inoltre i neuroni DA sembrano essere particolarmente esposti a stress ossidativi. Infatti il catabolismo della DA,

l'autossidazione della melanina e la presenza di alti livelli di ferro, che inducono elevate formazioni di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Coyle and Puttfarcken, 1993), insieme alla diminuzione della quantità di glutatione (Sian et al, 1994) e all'aumentata attività della superossido dismutasi, descritta nei pazienti affetti da tale malattia (Poirier et al, 1994), rendono i neuroni DA più vulnerabili allo stress ossidativo.

E' stata anche dimostrata una stretta correlazione tra la MP e i fattori genetici. In alcune famiglie di soggetti affetti da MP è stata dimostrata una mutazione nel gene dell' α -sinucleina nel cromosoma 4 (Polymeropoulos et al, 1997). Recentemente sono state dimostrate delle mutazioni nel canale ionico calcio permeabile TRPM2 (Hermosura et al, 2008), nel promotore LSP del genoma mitocondriale (Lynch et al, 2008) e nel trasportatore gliale del glutammato (Wilson and Shaw, 2007) in pazienti affetti dalla sindrome della sclerosi laterale amiotrofica demenza parkinsoniana ("ALS-PDC complex") presente nell'isola di Guam.

Dal 10 al 15% dei pazienti con malattia di Parkinson riferisce, infatti, almeno un familiare di primo grado affetto. Recenti studi hanno scoperto l'identità di alcuni polimorfismi di geni predisponenti come Snca, Park2, Mapt (codificante la proteina tau) e Gba (codificante la glucocerebrosidasi). La loro importanza risiede soprattutto nella possibilità che essi offrono di chiarire i meccanismi biochimici precisi che si trovano alla base della malattia e quindi di identificare possibili punti di intervento con farmaci specifici.

Molto più rilevante, a livello clinico individuale, è, invece lo studio delle forme ereditabili in conseguenza della mutazione di un singolo gene nel corredo cromosomico (forme monogeniche). Il gene anomalo è composto da DNA alterato in un determinato punto che può essere trasmesso da una generazione all'altra. Da allora la ricerca in questo campo ha fatto enormi progressi identificando molteplici forme di Parkinson a trasmissione familiare (tab.1).

tipo	locus	gene	Modalità di trasmissione	di frequenza	Età esordio e caratteristiche	Istologia
Park1	4q21	Alfa-sinucleina	Dominante	Molto rara	Giovanile, progressione rapida, frequente presenza di demenza	Corpi di Lewy alfa-sinucleina positivi
Park2	6q25	Parkina	Recessiva	10% del Parkinson giovanili (esordio <40 anni)	20-40 anni, progressione lenta, buona risposta alla l-dopa	Molto variabile: assenza di corpi di Lewy, o presenza di inclusi simili
Park3	2p13	-	Dominante	-	Attorno ai 60 anni	-
Park4	4q21	Triplicazione gene alfa-sinucleina	Dominante	Rara	Giovanile, quadro variabile tra Parkinson e demenza con corpi di Lewy	Corpi di Lewy alfa-sinucleina positivi
Park5	4p14	UCHL1	Dominante	Molto rara	-	-
Park6	1p35-36	PINK-1	Recessiva	1-2% Parkinson giovanili	Giovanile, simile al Parkinson	-
Park7	1p36	DJ-1	Recessiva	1% Parkinson giovanili	Giovanile, simile al Parkinson	-
Park8	12p11.2-q13.1	LRRK2	Dominante	In Italia: 1-2% sporadici 4-5% familiari	Età di esordio molto variabile (anche tardiva), quadro clinico simile al Parkinson, lieve aumento di disturbi comportamentali	Variabile: corpi di Lewy, taupatia tipica per paralisi sopranucleare progressiva, degenerazione nigrostriatale aspecifica
Park9	1p36	ATP13A2	Recessiva	-	Giovanile, risponde alla l-dopa	Atrofia diffusa, accumulo ferro nei

							nuclei basali
Park10	1p32	-	Locus di suscettibilità	-	-	Esordio 50-60 anni	-
Park11	2q36	-	recessiva	-	-	-	-

Nel complesso, queste forme monogeniche sono comunque poco frequenti in quanto rappresentano non più del 5% di tutti i casi di Parkinson.

Al momento, non esistono terapie neuroprotettive in grado di bloccare o anche solo ritardare l'insorgenza della malattia nelle forme ereditarie di Parkinson.

1.2 I sintomi

1.2.1 La storia naturale della malattia

La storia naturale della malattia di Parkinson comporta un progressivo rallentamento motorio con corrispondente riduzione, nel tempo, dell'autonomia funzionale.

È possibile distinguere una fase iniziale, una fase moderata ed una avanzata di malattia.

La fase *iniziale* interessa in media i primi 3-5 anni di malattia e si caratterizza per una sintomatologia di grado lieve, espressa prevalentemente dalla triade motoria classica: tremore, rigidità e bradicinesia.

Data l'eterogeneità d'esordio di questa malattia, è possibile individuarne due diverse modalità di presentazione, con una sintomatologia ed un'evoluzione differenti:

- 1- Forma *ipercinetica*: dominata clinicamente dal tremore, spesso unilaterale, e caratterizzata da età d'insorgenza più precoce ed evoluzione clinica più lenta e meno invalidante;
- 2- Forma *acinetico-ipertonica*, dominata clinicamente da importante rigidità e acinesia, con precoci turbe posturali e interessamento dell'andatura, ad evoluzione più rapida e invalidante.

Nella fase iniziale il malato solitamente presenta un buon compenso farmacologico, della durata di circa 5 o 6 anni, con un'autonomia in genere del tutto o in gran parte conservata per quanto riguarda le normali attività della vita quotidiana.

Durante il percorso più tipico, la sintomatologia si amplia, presentando nuovi sintomi, dal punto di vista sia motorio sia non motorio.

Successivamente vi è una fase *moderata* in cui si hanno le prime complicanze della terapia, motorie e non.

Tra le complicanze motorie si annoverano le fluttuazioni di risposta ai farmaci e le discinesie. Alcune fluttuazioni possono anche essere di tipo non motorio (sonnolenza, iperidrosi, dolori muscolari) e psichiatrico (allucinazioni, psicosi, attacchi d'ansia).

Le discinesie sono invece movimenti involontari in eccesso.

Si ritiene che una vita media dei farmaci breve dia una stimolazione pulsatile del sistema dopaminergico, intermittente, a livello striatale, diverso quindi dalla stimolazione fisiologica, più costante.

La fase *avanzata* compare in media 10-15 anni dall'esordio, è caratterizzata da un compenso farmacologico scarso. I sintomi non motori in questa fase prevalgono rispetto ai sintomi motori e rispondono in maniera scarsa alla terapia dopaminergica, dalla quale possono essere addirittura esacerbati (demenza, disautonomia).

I pazienti nella fase *terminale* diventano inabili ed immobili, fino all'allettamento.

1.2.2 L'esordio clinico

Nel 60% dei casi il sintomo di esordio è rappresentato dal tremore; altre manifestazioni iniziali possono essere costituite da lentezza dei movimenti o sensazione di irrigidimento a uno o più arti, ma anche da disturbi meno specifici (dolori, faticabilità, turbe dell'andatura, modificazioni del timbro vocale o della scrittura).

Tremore, rigidità e lentezza nei movimenti costituiscono, insieme all'asimmetria iniziale, i quattro segni più caratteristici del Parkinson; per tale motivo essi sono considerati i *segni cardinali* della malattia.

Il *tremore* si manifesta a riposo, è a bassa frequenza (4-6 cicli per secondo) e si riduce o scompare temporaneamente durante un movimento volontario.

Il tremore esordisce tipicamente nelle porzioni distali degli arti superiori, in particolare nella mano, e tale movimento viene definito del tipo *contare monete*. Solitamente si diffonde poi ad altre parti del corpo, in un tempo variabile, interessando via via l'altra mano, il volto e gli arti inferiori.

Inoltre il tremore risente delle situazioni emotive del soggetto: può infatti essere temporaneamente aggravato da eventi stressanti, mentre si riduce in condizioni di tranquillità.

La *rigidità* indica un aumento del tono muscolare, a riposo o durante il movimento. Può essere presente agli arti, al collo o al tronco e si manifesta con una resistenza continua. I muscoli si trovano in una condizione di tensione ed irrigidimento, anche se il paziente sembra tranquillo e rilassato.

Altro segno della rigidità diffusa è il particolare atteggiamento posturale definito *camptocormico*: il malato è curvo, piegato su se stesso, con il tronco flesso in avanti, le braccia mantenute vicine e piegate, le ginocchia leggermente piegate in avanti.

La *bradicinesia* è data dalla lentezza e faticabilità con cui il soggetto esegue i movimenti volontari, senza che vi sia una riduzione della forza muscolare.

Elenco delle espressioni cliniche più frequenti e caratteristiche della bradicinesia e della acinesia.

- Ipomimia
- Fissità dello sguardo, con riduzione dell'ammiccamento e retrazione delle palpebre
- Lentezza dei movimenti oculari nelle varie direzioni
- Incapacità a fare convergere lo sguardo
- Incapacità a guardare verso l'alto
- Ipofonia
- Perdita della melodicità del linguaggio
- Rallentamento nell'iniziare i movimenti a comando
- Perdita dei movimenti spontanei
- Riduzione dell'ampiezza di movimenti ripetuti nel tempo
- Micrografia
- Difficoltà ad alzarsi da una sedia o a girarsi nel letto
- Rallentamento nello svolgimento di attività quotidiane, quali tagliare del cibo, vestirsi, curare l'igiene personale
- Riduzione d'ampiezza dei passi e rallentamento della marcia
- Perdita dei movimenti pendolari durante la marcia.

Asimmetria dei sintomi. Tale da interessare un solo arto oppure due, ma pur sempre dallo stesso lato del corpo.

I *disturbi non motori* possono grandemente incidere sulla qualità di vita dei pazienti, a volte in misura persino maggiore rispetto ai sintomi motori.

Tra i sintomi non motori, quelli che di solito i pazienti percepiscono come maggiormente disabilitanti sono i disturbi del sonno e dell'equilibrio, le difficoltà mnesiche, gli episodi confusionali e l'eccessiva salivazione.

1.3 Come si identifica e si differenzia il Parkinson

1.3.1 La diagnosi: i criteri clinici

Criteri diagnostici revisionati dalla United Kingdom Parkinson's disease Society Brain Bank per la malattia di Parkinson idiopatica

POSSIBILE

- Presenza di almeno due dei quattro segni cardinali (di cui uno deve essere tremore o bradicinesia)
- Assenza di sintomi atipici all'esordio
- Documentata risposta all'uso di l-dopa o dopaminoagonisti (o mancanza di un tentativo terapeutico con tali farmaci)

PROBABILE

- Presenza di almeno tre dei quattro segni cardinali
- Assenza di sintomi atipici per almeno tre anni dall'esordio del primo sintomo cardinale
- Documentata risposta all'uso di l-dopa o dopaminoagonisti

DEFINITA

- Presenza di tutti i criteri clinici per la diagnosi di malattia di Parkinson probabile
- Conferma autoptica

Da non confondere con...

Nel grande gruppo dei parkinsonismi vi sono forme ad andamento cronico e progressivo, che a differenza della malattia di Parkinson, sono dovute a cause note (parkinsonismi sintomatici o secondari), e forme la cui causa rimane al momento sconosciuta, ma in cui la degenerazione neuronale non è a carico del sistema dopaminergico nigrostriatale (parkinsonismi primitivi o degenerativi atipici) (tab4).

MALATTIA DI PARKINSON IDIOPATICA

- Sporadica
- Ereditaria

PARKINSONISMI SINTOMATICI

- Postencefalitico
- Da farmaci
- Da tossici

- Da encefalopatia anossica (incluso l'avvelenamento da ossido di carbonio)
- Vascolare
- Da traumi cranici (inclusa la demenza pugilistica)
- Da tumori cerebrali
- Da idrocefalo
- Metabolico (degenerazione epatocerebrale acquisita, ipoparatiroidismo)
- Psicogeno

PARKINSONISMI DEGENERATIVI ATIPICI

- Forme sporadiche:
 - Atrofia multisistemica
 - Paralisi sopranucleare progressiva
 - Degenerazione cortico-basale
 - Degenerazione pallidale
 - Demenza da corpi di Lewy diffusi
 - Altre demenze con parkinsonismo
- Forme familiari:
 - In corso di malattie degenerative ereditarie (malattia di Wilson, corea di Huntigton, malattia di Hallervorden-Spatz, neuroacantocitosi, malattia di Machado-Joseph)
 - Calcificazione familiare dei gangli della base
 - Deficienza di glutammato-deidrogenasi
 - Distonia responsiva alla dopamina e parkinsonismo giovanile (malattia di Segawa)

1.4 Le terapie

Non esistono ancora terapie risolutive per la malattia di Parkinson, che agiscono cioè sulle sue possibili cause o, perlomeno, sui suoi meccanismi di progressione; dato il decorso cronico e progressivo, l'obiettivo principale della terapia rimane quindi, ad oggi, il migliore controllo possibile dei sintomi, sia motori sia non motori, riducendo al massimo gli effetti collaterali, al fine di poter garantire il più a lungo possibile una buona qualità di vita del paziente e la sua autonomia funzionale.

1.4.1 La terapia farmacologica

Gli approcci terapeutici principali attualmente in uso sono volti a correggere la carenza di dopamina, agendo su diversi fronti.

Cronistoria della terapia per il Parkinson

1817: J.Parkinson propone di prelevare sangue dalla porzione superiore del collo per ridurre la congestione del bulbo spinale

1860: Ordenstein inizia ad utilizzare gli estratti di belladonna

1940: vengono introdotti i primi anticolinergici sintetici

1950: primi interventi di neurochirurgia stereotassica nel Parkinson

1960: si scopre l'efficacia della l-dopa (Birkmayer, Hornykiewicz e Cotzias et al.). viene comunicata l'efficacia dell'amantadina

1970: inizia lo sviluppo dei dopamino-agonisti

1980: introdotto il concetto di *neuroprotezione* attraverso l'inibizione della via enzimatica MAO-B
Primi studi esplorativi sulla somministrazione endovenosa continua di l-dopa per trattare le complicanze motorie a lungo termine

1990: vengono introdotti gli inibitori COMT e i dopamino-agonisti non ergolinici.

Primi interventi di stimolazione cerebrale profonda del nucleo subtalamico per il trattamento delle fasi avanzate.

Annuncio di trapianto positivo di neuroni striatali fetali nel Parkinson

2000: studi clinici dimostrano che la terapia iniziale con dopamino-agonisti pospone la comparsa delle discinesie.

La clozapina risulta efficace nella psicosi associata al Parkinson.

La rivastigmina migliora la demenza associata al Parkinson.

Primi studi clinici controllati sul trapianto di cellule fetali.

Primi studi esplorativi sulla terapia genica.

Levodopa

La dopamina non può essere somministrata come tale, poiché non riuscirebbe ad attraversare la barriera ematoencefalica per raggiungere il cervello. Per tale motivo si utilizza la levodopa (l-dopa): è un aminoacido naturale, precursore della dopamina, che riesce a passare la barriera ematoencefalica e raggiungere così il cervello. Essa viene captata dalle cellule della sostanza nera ancora funzionanti.

Il periodo che intercorre tra l'assunzione del farmaco e il suo effetto dipende da diversi fattori, principalmente legati al fatto che l-dopa viene assorbita nel tratto iniziale dell'intestino.

L'assorbimento della l-dopa è in competizione con alcuni cibi, soprattutto quelli ricchi di proteine. Per tale motivo solitamente si consiglia l'assunzione del farmaco lontano dai pasti.

La l-dopa rappresenta tuttora il *gold-standard* nella terapia del Parkinson. Circa il 50% dei pazienti, dopo 5-7 anni di terapia, inizia però a presentare la cosiddetta *sindrome da trattamento cronico con l-dopa*, caratterizzata da fluttuazioni della risposta al farmaco che possono risultare disabilitanti e di difficile trattamento.

Dopamino-agonisti

Sono farmaci che stimolano direttamente i recettori dopaminergici; non devono pertanto essere trasformati in dopamina per essere efficaci. Si dividono in *ergolinici* (bromocriptina, pergolide, lisuride, cabergolina) e *non ergolinici* (pramipexolo, ropinirolo, apomorfina, rotigotina). Sono in genere meno efficaci della l-dopa, ma determinano in percentuale inferiore complicanze a lungo termine quali le discinesie; vengono spesso impiegati nelle fasi iniziali e, in seguito, ad un'associazione con l-dopa, permettono di utilizzarla a dosaggi ridotti. Gli effetti collaterali sono simili a quelli della l-dopa; vi è però una maggiore incidenza di complicanze di tipo psichiatrico e di ipotensione.

Inibitori enzimatici

La dopamina, una volta liberata nello spazio sinaptico e dopo aver eseguito la sua funzione, viene in parte ricaptata dai neuroni presinaptici, ed in parte degradata dagli enzimi monoamino-ossidasi (MAO) e catecol-o-metiltransferasi (COMT). L'inibizione di questi due enzimi permette una maggior durata d'azione e quindi d'efficacia della dopamina.

Alcuni farmaci agiscono come inibitori delle MAO e bloccano, in particolare, l'enzima monoamino-ossidasi di tipo B che rappresenta l'80% dell'attività monoamino-ossidasi totale a livello encefalico ed è la forma predominante a livello striatale. L'inibizione di questo enzima determina un aumento dell'emivita della dopamina nell'encefalo. Gli inibitori MAO-B attualmente in commercio – selegilina e rasagilina – sono indicati sia da soli, in fase precoce di malattia, sia in associazione con l-dopa, in fasi più avanzate.

Recentemente, è stato approvato anche in Italia un farmaco *combo*, caratterizzato dall'associazione di tre principi attivi: l-dopa, carbidopa (inibitore dell'enzima dopa-decarbossilasi) ed entacapone

(inibitore dell'enzima catecol-o-metiltransferasi); possibili vantaggi di questa formulazione sono la semplificazione della terapia, preziosa spesso in persone anziane.

Anticolinergici

Storicamente, i composti anticolinergici sono stati i primi a essere utilizzati nel Parkinson: la cosiddetta “cura bulgara”, ad esempio, si basava su un decotto vinoso di radici di *Atropa belladonna*.

L'impiego degli anticolinergici nel Parkinson si fonda sull'ipotesi che, oltre alla denervazione dopaminergica, vi sia anche un'iperattività del sistema colinergico, modificabile con farmaci capaci di antagonizzare i recettori. In generale, questi farmaci sono meno efficaci dei farmaci dopaminergici e la loro azione si esplica soprattutto su tremore e rigidità, meno sulla bradicinesia.

Amantadina

Essa agisce come antagonista non competitivo dei recettori del glutammato, ma il suo meccanismo d'azione nella malattia di Parkinson non è chiaro: sembra possa stimolare il rilascio di dopamina dalle fibre nervose superstiti e bloccarne la ricaptazione successiva. Inoltre, ha un significativo effetto antidiscinetico, con riduzione del 45% delle discinesie causate dalla l-dopa.

Le terapie per le fasi avanzate

- L'*apomorfina* è il più potente agonista dopaminergico e una singola dose ha un'efficacia equivalente a quella della levodopa. Essa può essere utilizzata anche come test diagnostico per i pazienti con sintomi sospetti per malattia di Parkinson, in quanto può dare una buona indicazione della attività dei recettori dopaminergici nello striato.
- La *duodopa* è una sospensione stabile in gel contenente l-dopa e carbidopa. I vantaggi di questa terapia sono l'assorbimento del farmaco indipendentemente dalla velocità di svuotamento gastrico e la presenza nel sangue di concentrazioni di l-dopa sostanzialmente stabili, con conseguente riduzione delle fluttuazioni motorie e delle discinesie.

Il trattamento neurochirurgico

Verso la fine degli anni Ottanta, si è sviluppata una tecnica derivata dalla neurochirurgia stereotassica denominata *neurochirurgia funzionale*. Questa è oggi al centro dell'attenzione in neurochirurgia e neurologia, per le concrete possibilità che offre di modulare il funzionamento del cervello e di controllare i sintomi della malattia. Viene chiamata *stimolazione cerebrale profonda* (*deep brain stimulation*, Dbs) ed è stata eseguita per la prima volta agli inizi degli anni Novanta.

La Dbs utilizza un dispositivo medico impiantato chirurgicamente, simile a un pacemaker, che invia stimolazioni elettriche a una determinata frequenza a specifiche aree del cervello (talamo, nucleo sub-talamico e globo pallido). Gli interventi di Dbs hanno portato notevoli vantaggi rispetto alle metodiche chirurgiche antecedenti. Gli svantaggi sono costituiti dal costo elevato e dalla necessità di sostituire il generatore di impulsi una volta esaurito.

1.5 La ricerca e le speranze di cura

1.5.1 La ricerca sui fattori endogeni

È stato soprattutto lo studio delle forme genetiche di Parkinson ad ampliare le conoscenze attuali su questi meccanismi endogeni

Il ruolo dell'alfa-sinucleina

Questa proteina che solitamente non si accumula nell'encefalo di soggetti sani, è quella maggiormente rappresentata nei corpi di Lewy anche nelle forme sporadiche di Parkinson. Si è visto che essa si lega alla membrana delle vescicole sinaptiche, verosimilmente quindi con una funzione regolatoria sulla trasmissione neuronale; una sua alterazione potrebbe quindi essere in gioco nella regolazione del rilascio e/o del riassorbimento della dopamina (Pillantini et al., 2003).

Il ruolo della parkina

Lo studio delle forme ereditarie con alterazione della parkina ha permesso di comprendere come questa proteina sia strettamente coinvolta nei processi di eliminazione e ripulitura della cellula in cui un ruolo chiave è giocato dalla proteina ubiquitina. L'alterazione di questa proteina è stata postulata anche nella malattia di Parkinson sporadica, e porterebbe a un accumulo di proteine anomale, tra cui l'alfa-sinucleina, con effetto tossico sulla cellula conducendola a morte.

Il ruolo del glutammato

Il glutammato è una sostanza che agisce nel cervello come neurotrasmettitore di tipo eccitatorio. Una quantità aumentata di glutammato potrebbe stimolare eccessivamente i recettori situati sulle cellule dopaminergiche della sostanza nera, determinando un notevole afflusso di calcio nella cellula. Questo fenomeno, chiamato *eccitotossicità glutammatergica*, sembra presente in quantità molto elevate nei pazienti con malattia di Parkinson.

La ricerca sulla fase prodromica

La fase prodromica costituisce il periodo in cui la classica triade motoria della malattia di Parkinson non è ancora presente.

D'altro canto, la sostanza nera non è, di solito, la prima struttura interessata dal processo neurodegenerativo; altre regioni sono coinvolte più precocemente, anche se in modo più lieve e spesso clinicamente inapparente. Talvolta, però, questo interessamento raggiunge una soglia clinica e allora compaiono alcuni sintomi che caratterizzano la cosiddetta *fase premotoria* del Parkinson.

Ne sono stati individuati almeno 4 potenzialmente utili:

- 1- I disturbi dell'olfatto (ipo-anosmia)
- 2- La costipazione
- 3- La depressione
- 4- I disturbi comportamentali del sonno REM

1.6 Le cellule staminali adulte

Cellule staminali embrionali e adulte, loro origine e potenza

	TIPO DI CELLULA	ORIGINE	POTENZA DIFFERENZIATIVA
Totipotenza	Zigote e primi blastomeri	Fecondazione oocita e spermatozoo	Totipotenti, capaci di differenziare in tessuti embrionali ed extraembrionali e quindi in grado di generare un organismo vivente
Pluripotenza	Cellule staminali embrionali Cellule staminali pluripotenti indotte	Blastocisti Qualsiasi cellula somatica (attraverso manipolazione genica e/o farmacologica)	Pluripotenti (tutti i tipi di cellule dell'organismo)
Multipotenza (cellule staminali adulte)	Cellule staminali del cordone ombelicale Emopoietica Cellule staminali mesenchimali Cellule staminali neurali Cellule staminali epiteliali Cellule staminali del derma Periciti (da cui derivano i mesoangioblasti) Cellule staminali della retina	Cordone ombelicale Midollo osseo, sangue Midollo osseo, sangue periferico e tessuti mesodermici Zona subventricolare ed ependimale dell'encefalo, bulbi olfattivi, midollo spinale Epidermide, vie respiratorie, digerenti e urogenitali Derma Zona perivascolare dei capillari Retina	Tutti i tipi di cellule del sangue, muscolo cardiaco e scheletrico, osteoclasti Osteociti, condrociti, adipociti e altri tessuti connettivi come i tendini, muscolo liscio cardiaco e scheletrico Neuroni, astrociti e oligodendrociti Cellule epiteliali differenziate Follicoli piliferi e progenitori dell'epidermide Vasi arteriosi e venosi (muscolo scheletrico, muscolo liscio, muscolo cardiaco, osteoblasti adipociti) Tutti i tipi cellulari della retina

Cellule pancreatiche	staminali	Dotti pancreatici, isole di Langherans	Cellule alfa e beta, cellule endocrine del pancreas
-------------------------	-----------	---	--

In base alla definizione riportata dal National Institute of Health NIH, 2001:

Le cellule staminali adulte sono cellule indifferenziate, non specializzate, che non hanno ancora acquisito una funzione ben definita e specifica. È ormai comunemente accettato dalla comunità scientifica che queste cellule si trovano in numero molto limitato in ogni tessuto e organo terminalmente differenziato di qualsiasi organismo. Le prime a essere isolate e usate nella pratica clinica sono state le staminali del midollo osseo. Negli anni Sessanta infatti fu eseguito il primo trapianto di midollo osseo (Bone marrow transplantation, BMT), sede delle staminali emopoietiche: l'operazione consiste in un'infusione endovena per ristabilire la funzione midollare in pazienti con patologie midollari. Le cellule emopoietiche midollari vengono ottenute mediante espanto del midollo osseo della cresta iliaca, oppure vengono mobilizzate nel sangue periferico utilizzando fattori di crescita, quali il fattore di stimolazione delle colonie granulocitarie (Granulocyte colony stimulating factor, G-CSF).

Le cellule staminali sono in grado di creare copie identiche di loro stesse, senza differenziare per lunghi periodi di tempo. Questa capacità di proliferare a lungo termine è denominata *long-term self-renewal*. Inoltre, differenziando, possono dare origine a linee cellulari mature diverse tra loro, che possiedono particolari caratteristiche morfologiche e funzioni specifiche. Infatti alcune cellule staminali adulte hanno la capacità di differenziare in tipi cellulari appartenenti a tessuti di diversa origine embrionale. Ad esempio, le cellule staminali ematopoietiche riescono a differenziare in cartilagine e osso, ma anche in miociti. Questo dipende dal loro elevato grado di plasticità, che ne consente il transdifferenziamento (capacità differenziativa in *lineage* cellulari di diversa origine embrionale). Altre caratteristiche possedute dalle staminali adulte sono la capacità di trasformarsi a seconda del fabbisogno dell'organismo in cui si trovano o in cui sono impiantate e di essere in grado di rigenerare o riparare i tessuti danneggiati. Per caratterizzare le cellule staminali adulte, i ricercatori si basano sulla determinazione di specifici marker presenti sulla superficie cellulare e sull'osservazione dei loro profili di differenziamento. Le cellule staminali adulte si localizzano in aree specifiche, con una citoarchitettura ben definita, tale da essere in grado da mantenere un microambiente biochimicamente controllato, la già citata "nicchia" di staminalità, in cui le cellule possono rimanere in uno stato di parziale quiescenza, fino alla loro riattivazione in conseguenza di un danno o di uno stato patologico. *In vitro* le cellule staminali adulte tendono a perdere la capacità di proliferare dopo circa 100-200 cicli cellulari, andando incontro a senescenza, mentre *in vivo* continuano a proliferare durante l'intera vita di un organismo; ciò è probabilmente dovuto anche

alla loro prolungata quiescenza. Le cellule staminali adulte, oltre a contribuire allo sviluppo post-natale dell'individuo, svolgono il ruolo fondamentale di mantenere il normale turnover cellulare e di riparare i danni al tessuto in cui si trovano immerse.

Il processo di replicazione di queste cellule avviene secondo due modalità specifiche: esse possono andare incontro ad una divisione simmetrica, che permette la generazione di due cellule staminali identiche tra loro, oppure a una divisione asimmetrica, che invece permette la generazione di una cellula staminale identica a quella di partenza e di una cellula progenitrice. La capacità proliferativa dei progenitori cellulari è inferiore rispetto a quella delle cellule staminali da cui derivano: i progenitori cellulari possiedono, infatti, un *commitment differenziativo*, ovvero una sorta di programma che li induce a differenziare in un determinato tipo cellulare.

1.6.1 Cellule staminali adulte nel cervello

“once the development was ended, the founts of growth and regeneration of the axons and dendrites dried up irrevocably. In the adult centers, the nerve paths are something fixed, ended, and immutable. Everything may die, nothing may be regenerated. It is for the science of the future to change, if possible, this harsh decree” (Ramon Y Cajal, 1913).

Per molto tempo il sistema nervoso centrale (SNC) dei mammiferi adulti è stato considerato incapace di autoriparazione e rigenerazione. Negli ultimi dieci anni, invece, è stato scoperto che la neurogenesi ha luogo nel periodo post-natale in alcune regioni del cervello e che continua durante la vita adulta, prevalentemente nella zona subventricolare, in prossimità dell'ipotalamo, del giro dentato dell'ippocampo e nel sistema olfattivo.

1.6.2 Cellule staminali neurali

Le cellule staminali neurali (NCSs), isolate per la prima volta nel 1992 (Reynolds e Weiss), sono cellule multipotenti in grado di autorinnovarsi e di generare tutti i tipi cellulari del sistema nervoso centrale (neuroni, astrociti e oligodendrociti) mediante una divisione asimmetrica, sia *in vivo* che *in vitro* (Johnson et al., 1999; McDonald et al., 2004).

La prima evidenza di neurogenesi risale a studi effettuati negli anni '60 da Altman e Das. Infatti, tali ricercatori, utilizzando la tecnica innovativa dell'autoradiografia con 3H-timidina, scoprirono la presenza di neuroni di nuova formazione nel giro dentato dell'ippocampo (Altman and Das, 1965), nella neocorteccia (Altman, 1966) e nel bulbo olfattorio (Altman, 1969) di ratti adulti. Negli anni

'90 l'introduzione di nuovi metodi di marcatura delle cellule in divisione, come i retrovirus e la bromodeossiridina (BrdU), ha permesso di confermare la presenza di neurogenesi nel cervello di mammifero adulto, compresi pazienti umani (Eriksson et al., 1998).

Oltre a derivare dal SNC di molte specie di mammiferi a differenti stadi di sviluppo, le NSCs possono originare anche dalle cellule staminali embrionali, dalle cellule germinali e dai teratocarcinomi (carcinomi embrionali). Nei mammiferi durante le fasi dello sviluppo del cervello, il differenziamento dei progenitori neurali è determinato e influenzato da un ampio spettro di fattori neurotrofici e di crescita; questi sono responsabili della regolazione dell'espressione genica, determinando il destino e la funzione delle future cellule neurali.

La maggior parte dei neuroni del SNC è terminalmente differenziata e non ha capacità proliferativa *in vitro* e *in vivo*; tuttavia un numero ridotto di neuroni continua a nascere in molte regioni del SNC. Il processo differenziativo di queste cellule staminali porta alla formazione dei neuroni e questa neurogenesi tardiva permane per tutta la vita adulta dell'individuo. Queste cellule possono essere isolate da campioni di tessuti normali, oppure da altri geneticamente alterati o patologici e indotte a propagare *ex vivo*, con la stimolazione di particolari molecole, tra cui il fattore di crescita epidermico (EGF), o il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF-2). Se coltivate *in vitro*, le NSCs sono in grado di sopravvivere, proliferare e aggregarsi in gruppi cellulari isolati, chiamati *neurosfe*; queste sono costituite prevalentemente da progenitori cellulari *committed*, termine utilizzato per indicare una cellula che ha intrapreso una via differenziativa e non può tornare indietro, mescolati a neuroni ed astrociti differenziati. Benchè le cellule staminali rappresentino solo una piccola parte di questa popolazione cellulare eterogenea, esse esprimono uniformemente le caratteristiche morfologiche, biologiche e molecolari dei precursori neurali e gliali. Diversi esperimenti hanno dimostrato che i precursori neurali, precedentemente isolati, coltivati per lunghi periodi e successivamente trapiantati nel cervello di animali di laboratorio, sono in grado di differenziare in neuroni maturi e di popolare specifiche regioni del SNC. Il differenziamento delle neurosfere ha reso possibile lo studio della neurogenesi, del destino e del differenziamento cellulare.

1.6.2.1 La nicchia neurogenica

Le cellule staminali neurali sono localizzate in specifici microambienti, detti *nicchie*, struttura che gioca un ruolo fondamentale nel regolare la proliferazione, il differenziamento e la migrazione delle ANSCs (Alvarez-Buylla et al. 1998).

La neurogenesi è stata dimostrata senza dubbio in due zone: la zona subventricolare (SVZ) della parete laterale del ventricolo e la zona subgranulare del giro dentato (SGZ) dell'ippocampo.

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

La composizione e l'organizzazione tridimensionale della SVZ murina, è stata studiata, ultrastrutturalmente ed immunoistochimicamente, da Doetsch e collaboratori (Doetsch et al., 1997) che hanno identificato la presenza di quattro tipi cellulari: gli astrociti o cellule di tipo B1 e B2, i neuroblasti o cellule di tipo A, le cellule di tipo C e le cellule ependimali di tipo E. Le cellule di tipo B esprimono la Proteina Fibrillare Acida Gliale (GFAP), marker astrocitario, ma sono caratterizzate da una morfologia unipolare o bipolare con un numero inferiore di processi cellulari rispetto agli astrociti; inoltre, tali cellule mostrano alcune caratteristiche immunocitochimiche simili a quelle della glia radiale come l'espressione di vimentina, filamento intermedio espresso da precursori cellulari, e della nestina, marker di cellule staminali embrionali neuroepiteliali (Garcia et al., 2004). Gli astrociti B sono scarsamente proliferanti e comprendono due sottotipi: cellule di tipo B1 e di tipo B2. Gli astrociti B1 sono adiacenti allo strato ependimale che viene coperto da una lamina formata dai loro processi. Le cellule di tipo B2 sono, invece, localizzate all'interfaccia con il parenchima striatale. Talora gli astrociti B estendono un processo citoplasmatico tra le cellule ependimali a contatto con il ventricolo laterale ed esibiscono un unico piccolo ciglio caratteristico delle cellule staminali neuroepiteliali embrionali (Doetsch et al., 1996). Le cellule di tipo A sono precursori neuronali migranti e proliferanti che esprimono β -tubulina III, PSA-NCAM (poly-sialylated-neural cell- adhesion molecule) e DCX (doublecortin), markers di neuroni immaturi. Tali cellule costituiscono catene orientate parallelamente alla parete laterale del ventricolo laterale e disposte all'interno di strutture tubulari formate dagli astrociti B1 e B2 che separano le catene di cellule A rispettivamente dallo strato ependimale e dallo striato (Doetsch et al., 1997). Le catene, a loro volta, convergono nella via rostrale migratoria (RMS) attraverso la quale i neuroblasti A raggiungono i bulbi olfattori dove si differenziano in interneuroni granulari e periglomerulari (Luskin 1993; Lois and Alvarez-Buylla, 1994; Doetsch and Alvarez-Buylla, 1996). Le cellule di

tipo C sono precursori immaturi mitoticamente attivi che esprimono Dlx2, proteina che può funzionare come repressore trascrizionale e modulare la produzione di cellule della SVZ. Le cellule di tipo C si trovano generalmente in piccoli gruppi (clusters) e occasionalmente come cellule singole che contattano le catene di cellule A. Infine, la SVZ è separata dalla cavità ventricolare da un monostrato di cellule endodermali di tipo E positive al marker nestina. Negli anni '90 molti studi hanno cercato di chiarire a quale tipo cellulare della SVZ appartenesse la ANSC deputata, in vivo, alla genesi dei neuroni dei bulbi olfattori. Infatti, la mancanza di markers specifici per le ANSCs ne ha reso difficile l'identificazione. Johansson e collaboratori (1999) hanno identificato le ANSCs come le cellule endodermali di tipo E o una loro sottopopolazione, constatando l'espressione da parte di tali cellule del marker nestina e osservando la loro capacità di generare in vitro aggregati clonali, detti neurosfere, capaci di autorigenerarsi e dotati di multipotenzialità. Molti altri lavori hanno dimostrato la derivazione delle ANSCs dallo strato subependimale (Chiasson et al., 1999; Laywell et al., 2000; Morshead and Van der Kooy, 2001; Capela and Temple, 2002). Secondo l'ipotesi attualmente più accreditata i precursori primari dei neuroni dei bulbi olfattori sono gli astrociti B (GFAP+) che si dividono lentamente per dare origine alle cellule C mitoticamente attive (GFAP-Dlx2+) che, a loro volta, generano i neuroblasti A (GFAP- Dlx2+ PSANCAM+ DCX+) (Doetsch et al., 1999; Garcia et al., 2004). La transizione dagli astrociti B ai progenitori C altamente proliferanti coincide con una elevata espressione del recettore per EGF che si pensa sia implicato nella trasformazione di cellule relativamente quiescenti in cellule transientemente proliferanti capaci di espandere la popolazione di progenitori cellulari (Doetsch et al., 1999a,b). Questi studi dimostrano che le ANSCs nel SNC potrebbero avere caratteristiche citologiche e funzionali di cellule altamente specializzate in contrasto con l'idea comune che le cellule staminali siano elementi indifferenziati mancanti di markers antigenici tipici di cellule mature (Alvarez-Buylla et al., 2001). Il fatto che le ANSCs in vivo possano avere caratteristiche di cellule gliali suggerisce la possibilità che sia richiesto un processo di dedifferenziamento prima che venga selezionato un particolare fenotipo. Se, infatti, le ANSCs hanno caratteristiche gliali, la formazione dei precursori neuronali, che migrano al bulbo olfattorio, richiederebbe la soppressione dei markers gliali e l'espressione dei markers neuronali (Morshead and Van der Kooy, 2001).

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

marcati nella RMS e nel bulbo olfattorio. Cellule multipotenti, capaci di generare in vitro neurosfere e di differenziarsi nei tre fenotipi neurali, sono state anche isolate dalla SVZ e dalla SGZ di cervelli umani adulti (Kuklekov et al., 1999). Nell'uomo, la SVZ è composta da quattro strati distinti con diversa composizione cellulare. Lo strato I è costituito da un monostrato di cellule ependimali dotate di microvilli apicali ed espansioni basali parallele o perpendicolari alla superficie ventricolare (Quinones- Hinojosa et al., 2006). Adiacente allo strato I, Sanai e collaboratori (2004) hanno osservato un “gap” (strato ipocellulare o strato II) in cui le espansioni ependimali dello strato I interagiscono strettamente con processi GFAP+. Nello strato II non sono presenti corpi cellulari, fatta eccezione per qualche astrocita e qualche raro corpo cellulare neuronale (Quinones-Hinojosa et al., 2006). Accanto allo strato II, è presente un nastro di cellule con caratteristiche immunocitochimiche (positività alla GFAP) ed ultrastrutturali simili a quelle degli astrociti (strato III). Sanai e collaboratori (2004), osservando la capacità da parte di una sottopopolazione di questi astrociti di generare, in vitro, neurosfere e di differenziarsi nei tre fenotipi neurali, hanno suggerito la possibilità che rappresentino le ANSCs. Nel nastro di cellule dello strato III sono stati osservati anche oligodendrociti e gruppi di cellule ependimali. Lo strato IV è caratterizzato dalla presenza di mielina e segna la transizione tra il nastro di astrociti e il parenchima cerebrale circostante (Quinones-Hinojosa et al., 2006). La presenza di progenitori neuronali proliferanti e di una RMS nel cervello umano rimane tuttora oggetto di dibattito (Curtis et al., 2007; Sanai et al., 2007).

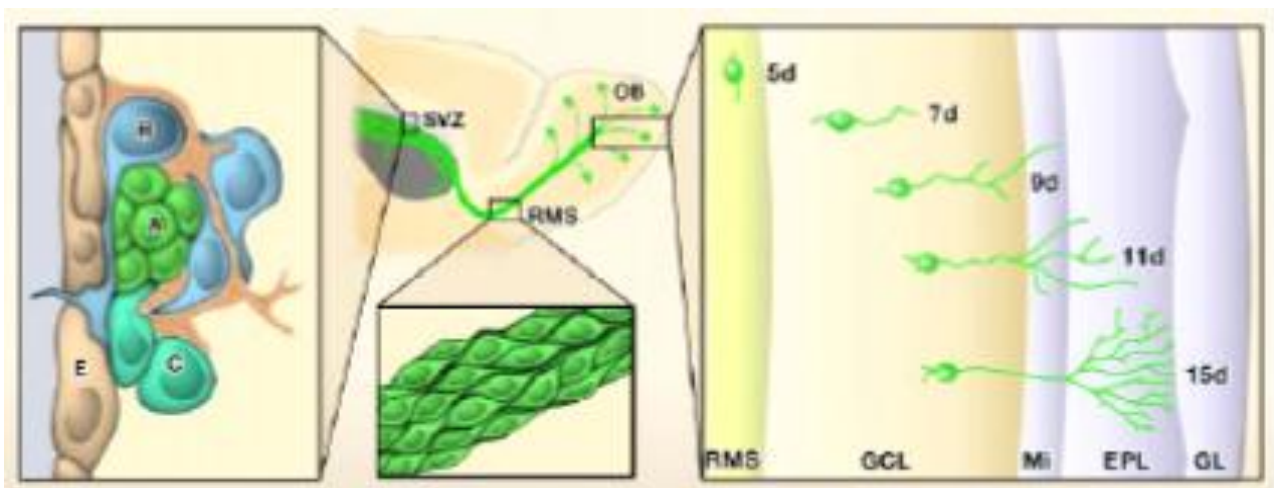


Figura 2: neurogenesi nella zona subventricolare (Zhao C., et al. 2008)

Le cellule progenitrici (A-C) nella SVZ sono adiacenti alle cellule ependimali (E) che circondano il ventricolo e interagiscono con la lamina basale della vascolatura locale. I neuroni neonati raggiungono il bulbo olfattivo (OB) attraverso una migrazione a catena e vanno incontro a cambiamenti morfologici e fisiologici prima di integrarsi come neuroni granulari nello strato granulare (GCL) e come neuroni periglomerulari nello strato granulare (GL).

1.6.3 Plasticità delle cellule staminali

Le cellule staminali adulte, spesso indicate anche come “somatiche” sono cellule che presentano due caratteristiche principali:

1. Si dividono per lunghi periodi di tempo;
2. Danno origine ai tipi cellulari maturi che hanno morfologie caratteristiche e svolgono funzioni specializzate del tessuto di appartenenza.

Svolgono le importanti funzioni di mantenimento dell'omeostasi cellulare e di sostituzione di cellule morte in seguito a danno o malattia (Leblond, 1964; Holtzer, 1978).

Molti esperimenti hanno recentemente dimostrato che alcune cellule staminali adulte (ASCs), oltre a differenziare nei tipi cellulari specializzati derivanti dal foglietto embrionale d'appartenenza (differenziamento ortodosso), possiedono la capacità di generare cellule specializzate di tessuti diversi. Questa proprietà è nota sotto il nome di *plasticità*, transdifferenziamento o differenziamento non ortodosso.

Per poter dichiarare che una cellula staminale è in grado di mettere in atto questo processo, è importante innanzitutto dimostrare che la popolazione esistente nel tessuto di partenza mostri caratteristiche tipiche delle cellule staminali e che la cellula adulta in questione sia in grado di dare origine ai tipi cellulari che risiedono in quel tessuto, che è inoltre in grado di integrarsi nel nuovo tessuto, di sopravvivere e funzionare in modo adeguato (NIH report, 2001). E' stato riportato ad esempio che cellule del midollo osseo possono produrre epatociti (Petersen et al., 1999; Theise et al., 2000), cellule endoteliali e del miocardio (Lin et al., 2000; Orlic et al., 2001), neuroni e cellule gliali (Brazelton et al., 2000; Mezey et al., 2000; Priller et al., 2001). E' stato inoltre dimostrato che cellule staminali neurali possono produrre cellule del sangue e del sistema immunitario (Bjornson et al., 1999), del muscolo scheletrico (Galli et al., 2000) e se iniettate in una blastocisti, possono dare origine ai tipi cellulari embrionali (Clarke et al., 2000).

1.6.3.1 Differenziamento cellulare

Il differenziamento cellulare è il processo per cui da una cellula staminale o da un progenitore si ottiene una cellula specializzata. Questo cambiamento avviene in maniera fisiologica in ogni organismo vivente, ma può essere ottenuto *in vitro* mediante modificazione della composizione dei terreni di coltura utilizzati per la coltivazione delle cellule. Il differenziamento cellulare prevede cambiamenti che riguardano prevalentemente l'aumento dell'espressione di fattori trascrizionali che promuovono l'espressione genica specifica per ogni cellula differenziata. Questo porterà alla

produzione di proteine strutturali peculiari del tessuto di appartenenza. Contemporaneamente si ha una riduzione della capacità proliferativa, in un processo irreversibile che porterà la cellula a entrare in uno stato di quiescenza e infine a senescenza e a morte. In generale, in base a stimoli specifici una cellula staminale attiva fattori trascrizionali che porteranno, attraverso l'attivazione a cascata di geni coinvolti, al differenziamento in cellule mature quali neuroni, cardiomiociti, osteociti, linfociti e così via.

In mancanza di markers specifici che identifichino in modo inequivocabile le ANSCs, le caratteristiche che, comunemente vengono considerate, in vitro, per l'identificazione sono la capacità autorigenativa e la multipotenzialità. Le cellule della SVZ, infatti, possono essere isolate ed espanse in vitro in condizioni appropriate ed in presenza di fattori di crescita come EGF e FGF-2 (Raynolds e Weiss, 1992; Gritti et al., 1996). L'espansione in vitro delle ANSCs può essere ottenuta sia seguendo un protocollo che comporta la formazione di neurosfere, sia seguendo un protocollo che comporta la proliferazione delle cellule in monostrato. Il protocollo di coltura "a neurosfera" permette di selezionare positivamente le ANSCs dalla coltura primaria eterogenea in quanto i progenitori e le cellule mature muoiono rapidamente, mentre le ANSCs sopravvivono e proliferano. Le ANSCs proliferando danno origine a cellule che rimangono attaccate le une alle altre e generano "clusters" sferici (le neurosfere) che flottano in sospensione. Le ANSCs proliferanti possono dividersi sia in modo simmetrico, con formazione di due ANSCs, sia in modo asimmetrico, con formazione di una ANSC ed un precursore cellulare oppure di una cellula apoptotica.

Ogni neurosfera è, quindi, costituita da un insieme di ANSCs, progenitori cellulari e cellule terminalmente differenziate. Per questo si preferisce indicare questa popolazione cellulare mista con il termine ANSCs/ANPCs. Le sfere possono essere successivamente dissociate enzimaticamente e/o meccanicamente a singole cellule che possono essere ripiastrate nelle medesime condizioni di crescita. Come nelle colture primarie le cellule differenziate ed i progenitori cellulari muoiono rapidamente, mentre le ANSCs continuano a proliferare generando neurosfere secondarie (Galli et al., 2003). L'identità in vivo delle cellule che in vitro sono capaci di generare neurosfere non è ancora del tutto chiara. Doetsch e collaboratori (2002) hanno dimostrato che la maggior parte delle cellule che proliferano in vitro, in risposta al fattore di crescita EGF, non derivano dalle cellule B relativamente quiescenti in vivo, ma dai precursori C Dlx2+ altamente proliferanti. Quando tali cellule vengono esposte ad EGF riducono l'espressione di Dlx2 ed arrestano la produzione neuronale. Distruggendo in vivo le cellule Dlx2+ si osserva una riduzione sia della risposta all'EGF sia della formazione, in vitro, di neurosfere. La rimozione dei fattori di crescita e l'aggiunta di un substrato di adesione induce il differenziamento della popolazione di ANSCs/ANPCs nei tre fenotipi neurali: astrociti, oligodendrociti e neuroni (Gage et al., 2000; Quian et al., 2000; Van der

Kooy e Weiss, 2000). Il differenziamento delle ANSCs/ANPCs può essere influenzato da molti fattori extracellulari come i mitogeni “Platelet-derived Growth Factor” (PDGF), “Ciliary Neurotrophic Factor” (CNTF), ormone tiroideo T3, “Brain Derived Neurotrophic Factor” (BDNF) e da fattori di adesione come poli-D-ornitina, laminina e fibronectina. Diverse combinazioni di substrati e mitogeni inducono cambiamenti nel tasso di crescita e nella capacità differenziativa delle ANSCs (Whittemore et al.,1999).

La mancanza di un marker specifico per le ANSCs che permetta di isolare una popolazione pura, limita fortemente lo studio della biologia di queste cellule e le applicazioni terapeutiche. Per tale motivo in lavori recenti si è cercato di arricchire in ANSCs la popolazione di cellule isolate da SVZ. A questo scopo, Rietze e collaboratori (2001) e Capela e Temple (2002) hanno utilizzato PNA^{low}/HSA^{low} ed il carboidrato Lewis X. Goodel e collaboratori (1997), utilizzando Hoechst 33342 e osservando le cellule al citofluorimetro hanno osservato la presenza di due popolazioni distinte di cellule isolate dal midollo osseo adulto: una popolazione caratterizzata da bassa fluorescenza, detta “side- population” (SP), e una popolazione caratterizzata da elevata fluorescenza, detta “non side-population” (non-SP). La frazione SP comprende circa l’1% delle cellule del midollo osseo e possiede tutta l’attività staminale ematopoietica. La presenza di una popolazione SP dipende da un diverso efflusso del colorante a seguito di una maggiore attività di proteine di trasporto della famiglia “ATP-binding cassette”. Kim e Morshead (2003) marcando una popolazione eterogenea di ANSCs e ANPCs, derivata da neurosfere, con il colorante Hoechst 33342, hanno ottenuto una popolazione SP arricchita di cellule staminali. Tale lavoro ha dimostrato che la più elevata capacità di eliminare le tossine è una caratteristica comune alle cellule staminali adulte, indipendentemente dal tessuto di origine. Combinando la separazione della SP con il marker LewisX è stato osservato un ulteriore arricchimento in ANSCs. Corti e collaboratori (2006) hanno descritto l’isolamento di ANSCs da neurosfere e da tessuto dissociato sfruttando l’attività dell’enzima aldeide-deidrogenasi (ALDH). Dopo incubazione delle cellule con Aldefluor, un substrato fluorescente della ALDH, è stata isolata, al citofluorimetro, una popolazione con basso “side scatter” (SSC lo) ed elevata attività della ALDH (ALDH br). Tale popolazione SSC lo ALDH br è capace di autorinnovarsi, generare neurosfere ed è multipotente. Tale protocollo, oltre ad essere semplice ed altamente riproducibile, è più sicuro e meno tossico rispetto a protocolli che prevedono l’utilizzo di coloranti che si intercalano nel DNA; inoltre permette di discriminare tra cellule vive e cellule morte in quanto solo le cellule con una membrana intatta e una attività enzimatica funzionale possono essere marcate.

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

1.6.3.2 Saggi “*in vitro*” e “*in vivo*”

Le cellule staminali vengono caratterizzate *in vitro* per le loro caratteristiche essenziali: l’autorinnovamento e il potenziale differenziamento. L’*autorinnovamento* viene valutato in base alla capacità di generare miliardi di cellule a partire da una; si producono curve di crescita, ma si analizzano anche il cariotipo e il genotipo per scongiurare eventuali trasformazioni.

Per validare la *plasticità* di una cellula staminale si usano saggi differenziativi che possono essere condotti in piastre di coltura o direttamente *in vivo* in tessuti rigeneranti.

Colture cellulari possono essere indotte al differenziamento mediante stimoli appropriati quali fattori di crescita, eliminazione di nutrienti e, passato un periodo sufficiente al differenziamento, si ricorre a tecniche di immunofluorescenza, di biochimica e di biologia molecolare per analizzare l’espressione di marker tardivi del differenziamento.

Senza dubbio però i saggi più informativi sono quelli effettuati *in vivo* che dimostrano chiaramente la capacità di partecipare alla rigenerazione tissutale. Esistono quindi diversi modelli animali immunocompromessi per garantire l’attecchimento delle cellule esogene. Spesso si ricorre a danni di tipo ischemico per creare i presupposti di rigenerazione tissutale e verificare le potenzialità terapeutiche delle cellule staminali che possono essere di tipo paracrino o differenziativo.

In tutte le possibili applicazioni terapeutiche si usano modelli preclinici proprio per mettere a punto protocolli sperimentali destinati poi a trial clinici. Il modello animale più studiato e conosciuto è sicuramente il topo.

1.7 Potenzialità terapeutiche delle cellule staminali

Le cellule staminali rappresentano oggi un potenziale terapeutico importante per la cura di un gran numero di patologie fino ad ora intrattabili. La lista comprende malattie cardiache e muscolari come l’infarto e la distrofia muscolare, la malattia di Parkinson, il diabete, disordini del sistema immunitario, tumori. Il potenziale delle cellule staminali risulta evidente nella cura di patologie cronico-degenerative, nelle quali complesse strutture cellulari hanno perso la loro funzione. La cellula staminale esprime, in questo caso, la sua caratteristica di plasticità in quanto è in grado di differenziarsi ripristinando la funzione del tessuto o dell’organo danneggiato.

1.7.1 Meccanismo d'azione nella terapia cellulare

Sebbene siano stati effettuati grandi passi nell'utilizzo delle cellule staminali nella terapia clinica, il meccanismo attraverso il quale la terapia cellulare possa apportare un beneficio alla funzione dei tessuti da riparare è ancora poco chiaro. Tre sono le teorie più accreditate: transdifferenziamento, fusione cellulare e rilascio di mediatori paracrini.

Il termine *transdifferenziamento* indica la capacità di una cellula staminale di adottare le caratteristiche biologiche e fisiologiche di un tipo di cellula altamente differenziata.

La *fusione cellulare* consiste nell'unione di una cellula ospite con la cellula staminale trapiantata, con conseguente trasferimento del contenuto cellulare e delle informazioni necessarie per svolgere le funzioni cellulari.

Un altro modo che potrebbe spiegare gli effetti benefici della terapia cellulare è il *rilascio paracrino* di fattori di crescita e di sopravvivenza. In questo caso la cellula trapiantata apporta effetti benefici attraverso il rilascio di citochine e fattori di crescita in grado di stimolare la sopravvivenza delle cellule differenziate e il differenziamento delle cellule staminali residenti.

1.7.2 Patologie neurodegenerative

Le malattie neurodegenerative come la malattia di Parkinson, quella di Alzheimer e quelle successive a un trauma che coinvolgono il sistema nervoso, come i traumi della colonna vertebrale, determinano nel paziente un severo declino della funzionalità motoria e muscolare con un deterioramento della qualità di vita.

Attualmente i tipi cellulari che potrebbero essere usati nel trattamento di queste patologie sono le cellule staminali embrionali e le cellule staminali adulte.

Un importante passo nello studio terapeutico di queste malattie è stata la scoperta di cellule staminali neurali (NSCs) o NSC-simili in alcune regioni del parenchima cerebrale adulto; queste cellule posseggono caratteristiche di *self-renewal* e sono in grado di differenziarsi in neuroni, astrociti e oligodendrociti. Trapianti di NSCs endogene sono già stati testati in un gran numero di modelli animali di malattie nervose, come la malattia di Parkinson, la corea di Huntington, ictus e danni alla colonna vertebrale; si sono ottenuti buoni risultati nel recupero della funzionalità neuromotoria. L'attenzione dei ricercatori si è focalizzata anche sui progenitori neurali (NSPCs), ovvero le cellule formanti le neurosfere, isolate da tessuti cerebrali di feti umani o di modelli animali di differenti malattie neurodegenerative, per determinare le loro potenzialità terapeutiche.

Dopo averle espanse in colture a lungo termine e trapiantate nelle regioni lese del cervello, vengono valutate le funzioni sensomotorie e cognitive. I risultati indicano un notevole miglioramento neurologico da parte delle NSPCs in seguito al danno e mostrano la loro abilità di migrare nelle zone lese, differenziare in neuroni maturi e formare sinapsi con i circuiti neuronali ospiti.

1.7.2.1 Patologie degenerative del SNC

Le terapie a base di cellule staminali neurali, sia con NSCs che con NPSCs, hanno trovato applicazione in una serie di patologie neurodegenerative come la SM, la SLA, la malattia di Parkinson e altri disordini neurologici. Due sono le strategie principali per indurre riparo al tessuto nervoso danneggiato: l'induzione della capacità rigenerativa endogena e il trapianto di cellule esogene. Le patologie su cui finora si sono fatti più passi in avanti e su cui ci sono più studi in atto sono la malattia di Parkinson e la SM. Studi di trapianto di cellule neurali in modelli murini hanno dato buoni risultati per quanto riguarda la regressione dei sintomi e il rinnovamento della parte lesionata. I primi trial effettuati sull'uomo hanno dimostrato un aumento della funzione dopaminergica neuronale, visualizzata attraverso la PET. Quando vengono impiantate nel cervello, le cellule sono in grado di migrare nelle regioni lese, differenziare in neuroni e cellule gliali, e correggere i difetti funzionali di queste malattie neurologiche secernendo costitutivamente neurotrasmettitori e/o fattori di crescita capaci di supportare la sopravvivenza e la rigenerazione dei neuroni endogeni (Bjorklund e Lindvall, 2000).

1.6.2.2 Cellule staminali neurali prelevate sei ore dopo la morte (T6)

Queste cellule, studiate ampiamente in precedenza e ancora attualmente indagate nei nostri laboratori, derivano dalla SVZ (principale regione germinale deputata alla genesi dei neuroni e delle cellule gliali del cervello di mammifero adulto) e sono state estratte da encefali di topo. La caratteristica principale che distingue questa nuova classe di CSN è la loro capacità di resistere ad un insulto ischemico (Marfia et al). Esse infatti vengono raccolte a sei ore dalla morte del donatore e presentano una marcata attivazione di HIF1 α ed esprimono eritropoietina ed il suo recettore. Dall'animale sacrificato sono state preparate le colture primarie e le PM-NSCs si sono dimostrate in grado di generare neurosfere e di differenziare dando origine a tutti e tre i tipi di cellule neurali: queste cellule si differenziano prevalentemente in neuroni, 45-50% contro il 12-15% delle NSC raccolte alla morte del donatore.

Il differenziamento di queste cellule dipende dalla produzione endogena di EPO, poiché l'esposizione agli anticorpi per EPO o per EPOR inibisce il loro differenziamento verso il fenotipo neuronale.

Abbiamo osservato che queste cellule migrano al sito di lesione e sopravvivono all'attacco dei macrofagi.

La percentuale di cellule che differenzia in senso neuronale è maggiore di quella osservata nelle classiche cellule staminali neurali. Tutte le PM-NSCs differenziate in senso neuronale esprimono i classici neurotrasmettitori.

2. OBIETTIVI DEL LAVORO DI RICERCA

L'obiettivo può sembrare fantascientifico, ma forse non lo è del tutto. Rappresenta il terreno di sfida più stimolante della medicina del futuro: la sorprendente scoperta che dopo 6 ore dalla morte, sia ancora possibile isolare le ANSCs dalla SVZ, portando a definire questo tipo di ANSCs resistenti alla morte (DR-NSC). Sfruttare le proprietà delle cellule staminali cerebrali prelevate dalla zona sottoventricolare del ventricolo laterale, estratte da encefali di topo 6 ore dopo la morte (T6), capaci di generare nuove cellule nervose, per riparare l'organo più complesso e misterioso: il cervello. Un terreno che, per quanto impervio, inizia a fare intravedere concrete speranze terapeutiche per le malattie del sistema nervoso.

Da diversi anni infatti presso il nostro laboratorio si apprezzano le proprietà di queste cellule. Esse, già ampiamente caratterizzate dal punto di vista biologico, infatti si sono dimostrate in grado di generare neurosfere e di differenziare dando origine a tutti e tre i tipi di cellule neurali: neuroni, astrociti ed oligodendrociti.

L'ipotesi è un domani poter curare questo tipo di disturbi visto che sono sempre più presenti nella popolazione anziana. C'è una necessità di bloccare la progressione di queste malattie. E dalle ultime pubblicazioni in letteratura la strada per arrivare alla cura del Parkinson passa attraverso la terapia cellulare, dove il campo più promettente è sicuramente quello che utilizza le cellule staminali.

In questo studio è stato preso in esame il modello murino indotto con la neurotossina MPTP e l'analisi è stata effettuata allo scopo di evidenziare la deficienza del sistema dopaminergico e comprendere meglio la fase post degenerativa in seguito a trapianto intrastriatale.

Ad oggi non è riportato in letteratura il trapianto di Cellule Staminali Neurali adulte post-mortem applicato al modello murino parkinsoniano indotto con MPTP quindi è opportuno testare queste cellule e verificare se in sede di lesione queste hanno la capacità di differenziare e successivamente di migrare compensando così il danno nigrostriatale.

3. MATERIALI E METODI

Per questi studi sono stati utilizzati sia topi CD1 (Charles River), topi adulti C57/bl e C57/bl-GFP (The Jackson Laboratory) del peso di circa 24-26g. I topi transgenici C57BL/6-Tg(UBC-GFP)30Scha/J esprimono costitutivamente la GFP sotto il diretto controllo del promotore C dell'ubiquitina umana. Questi topi sono vitali, fertili e non mostrano anomalie fisiche o comportamentali. Questi animali esprimono la GFP in tutti i tessuti esaminati.

Tutti i protocolli sperimentali sono stati approvati dal comitato etico dell'Università degli Studi di Milano in conformità alla normativa vigente e alle linee guida italiane per i laboratori in cui vengono utilizzati animali, le quali, a loro volta, sono uniformate alle direttive della comunità europea del novembre 1986 (86/609/EEC) e all'attuale normativa vigente dello stato italiano che regola la sperimentazione e il welfare degli animali da esperimento (legge 116 del 1991). I metodi di ricerca hanno incluso una serie di paradigmi sperimentali in vivo in uso nel nostro laboratorio.

3.1 Competenze culturali

Neuroanatomia e mappatura molecolare nel sistema nervoso centrale; studi sulla plasticità strutturale nel sistema nervoso adulto, con particolare riferimento a neurogenesi spontanea adulta, migrazione cellulare ed analisi in vivo delle nicchie staminali neurali. Da diversi mesi stiamo studiando l'SVZ come principale fonte di cellule staminali e di precursori neurali neogenerati nell'encefalo del modello post-mortem T6. Attualmente ci stiamo concentrando sulla citoarchitettura a livello dei proiezioni nigrostriatali lesionate seguite da impianto di PM-NSCs.

3.2 Studi di proliferazione mediante bromodesossiridina (BrdU)

Gli studi di proliferazione cellulare sono stati eseguiti mediante incorporazione di bromodesossiridina (BrdU). La BrdU è un analogo nucleotidico della timina e questa sostanza si intercala nel DNA cellulare in fase di divisione. La BrdU viene somministrata mediante iniezione intraperitoneale alla dose di 50mg/Kg, 12 o 2 ore prima del sacrificio. L'incorporazione della BrdU viene valutata mediante analisi di immunofluorescenza utilizzando un anticorpo monoclonale anti-BrdU.

Anticorpo I	Specie	Diluizione	Mo/Po	Type	localization	Company
BrdU	Rat	1:200	Mo	IgG	nuclear	AbD Serotec
Doublecortin	Goat	1:200	Po	IgG	cytoplasmatic	Santa Cruz
Gfap	Rabbit	1:1000	Po		cytoplasmatic	Covance
PCNA	Mouse	1:100	Mo	IgG	nuclear	Chemicon

Figura 3: elenco degli Anticorpi e delle relative diluizioni utilizzati per studiare attraverso saggi di immunofluorescenza l'SVZ.

3.3 Colture cellulari

I tessuti sono stati prelevati da encefali ottenuti da ceppi C57/bl-GFP. La regione da cui sono state estratte le cellule staminali è la SVZ. Il brain viene estratto e preservato in una soluzione fredda di PBS, glucosio (0.6%), penicillina (100 U/ml), streptomina (100U/ml).

La dissezione della zona sottoventricolare avviene tagliando una fetta di 2 cm circa in sezione coronale a livello della metà della lunghezza rostro caudale del cervello. Viene quindi prelevata la regione attorno al ventricolo laterale cercando di evitare di includere il corpo calloso e lo striato. Una volta solati i tessuti vengono tagliati in frammenti di piccole dimensioni allo scopo di facilitare la successiva digestione enzimatica.

Successivamente dopo aver isolato l'SVZ, essa è stata posta in una soluzione di cisteina (Sigma) (0,2mg/ml), EDTA (Sigma) (0,2 mg/ml) e papaina (Worthington DBA) (1mg/ml) in EBSS (Enhanced Balanced Salt solution) (GIBCO) per la digestione enzimatica in un incubatore a 37°C per 1h in un' atmosfera di CO₂ del 5%. Successivamente sono state eseguite 3 centrifughe e alla fine il preparato è stato piastrato con un terreno (Neurobasal + B27) in cui sono stati aggiunti fattori di crescita come EGF (20ng/ml) e bFGF (20ng/ml) ed inoltre contiene 2mM L-Glutamina. In queste condizioni le cellule staminali sono indotte a crescere formando neurosfere. Dopo 3-5 giorni queste raggiungono una dimensione di circa 100 - 150um e a questo punto è opportuno trattare le neurosfere effettuando una dissociazione meccanica che permette di ripiastrare ad una concentrazione adeguata sotto forma di singole cellule. In ogni passaggio successivo la coltura si arricchisce in cellule staminali (Gritti et al., 1996, 1999). Va ricordato che la neurosfera è una struttura non omogenea formata da cellule staminali ma anche di progenitori, cellule apoptotiche e differenzianti.

3.3.1 Differenziamento neurale

Al fine di verificare la multipotenzialità delle cellule staminali neurali, esse vengono sottoposte al test di differenziamento in vitro, che mediante specifica induzione, permette di ottenere cellule differenziate nei tre tipi cellulari del SNC adulto; neuroni, oligodendrociti ed astrociti (Gritti et al., 1996, 1999). Per ottenere cellule differenziate, facilmente processabili per ulteriori analisi dei marcatori di differenziamento, quali MAP-2 per i neuroni, NG2 per gli oligodendrociti e GFAP per gli astrociti, si piastrano le cellule staminali alla densità di 60000 – 30000 - 15000 cellule/pozzetto in una multiwell da 48 pozzetti. Prima del piastramento, sul fondo dei pozzetti, vengono adagiati vetrini porta-oggetto del diametro di 1cm, pretrattati con 200ul di una soluzione contenente Matrigel, siero 1% e priva di fattori di crescita ad azione mitogena. Tale soluzione viene incubata a 37°C per almeno 1 ora e poi rimossa. Le cellule in fase di differenziamento vengono inizialmente coltivate in terreno F costituito da Neurobasal e B27 includente il solo FGF come fattore di crescita; dopo due giorni di coltura in terreno F, il medium di coltura viene sostituito con terreno controllo costituito da Neurobasal B27 in assenza di fattori mitogeni ma addizionato con fetal bovine serum (FBS) alla concentrazione finale dell'1% e le cellule vengono incubate per 5 o 12 giorni in queste condizioni a 37°C e 5% di CO₂.

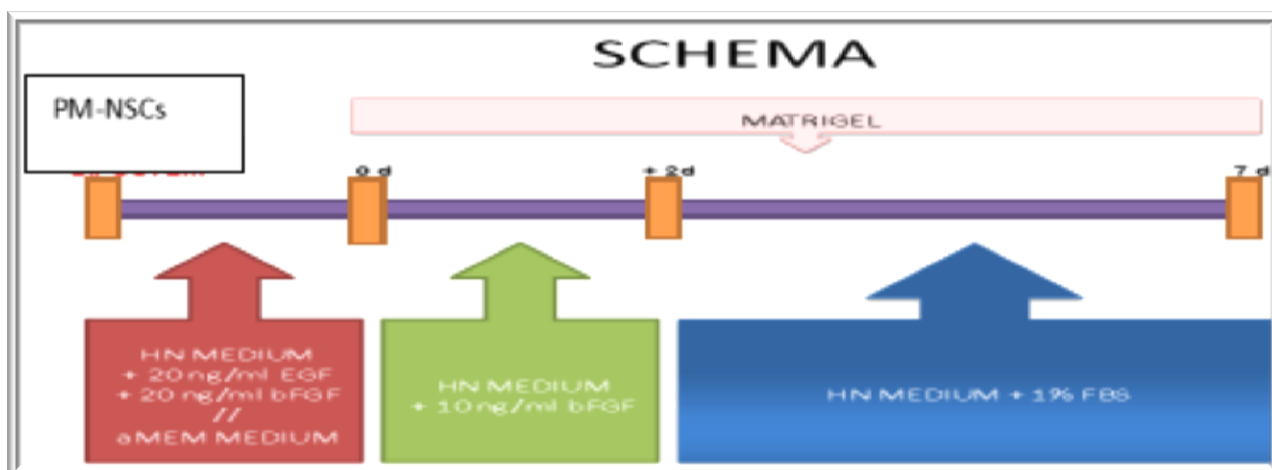


Figura 4: evidenzia lo schema adoperato per il differenziamento

3.4 Generazione e Mantenimento dei topi per l'impianto cellulare

Il ceppo utile per l'esperimento è il c57/bl. Il c57/bl è stato utilizzato sia per la lesione dopaminergica che per l'estrazione delle cellule staminali GFP + da SVZ. È consigliabile utilizzare lo stesso ceppo, così non si presenta una reazione immunogena dopo il trapianto di cellule staminali PM-NSCs neurali GFP+ nel modello murino lesionato.

	Ctrl-MPTP	Ctrl+MPTP	MPTP + T6 GFP
Tot.	11	9	11

Figura 5: indica il numero degli animali esaminati per l'analisi comportamentale.

3.5 Lesione dopaminergica nigro-striatale avvenuta grazie alla somministrazione di MPTP

L'ipotesi di questo lavoro di ricerca è di analizzare i topi C57/bl ai quali viene somministrata tramite i.p. l'MPTP-HCl (n° cat. M0896) alla dose di 36 mg/kg (Langston e Ballard; Corsini et al., 2002). L'MPTP è un composto lipofilico, attraversa facilmente la barriera emato-encefalica, si incorpora all'interno degli astrociti ed è convertito a MPP⁺ ad opera delle MAO-B nei neuroni dopaminergici. MPP⁺ entra nel citoplasma attraverso il DAT (Korpin and Markey, 1988; Zigmond et al., 1990), si concentra all'interno dei mitocondri provocando un notevole stress ossidativo causando morte dei neuroni (Nicklas et al., 1985,1987; Vyas et al., 1986; Ramsay et al., 1991; Hasegawa et al., 1990; Cleeter et al., 1992). Si utilizzano i C57/bl perché è il ceppo sensibile all'MPTP. Dopo sette giorni è stata ri-somministrata l'MPTP alla dose di 20mg/Kg .

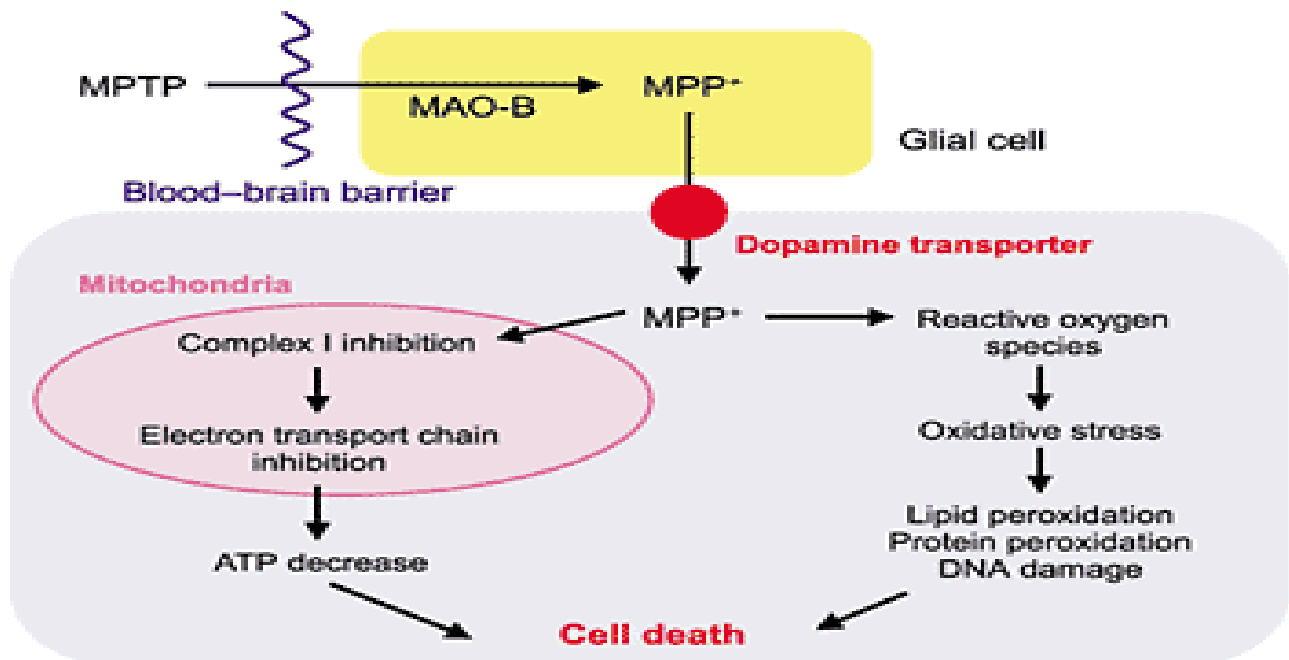


Figura 6: mostra la cascata di eventi che avviene nel Sistema Nervoso conseguente alla somministrazione di MPTP.

3.6 Il Trapianto

Il trapianto di cellule staminali mediante iniezione intrastriatale nel topo è da effettuarsi quando la degenerazione nigrale dopaminergica è massima (almeno dopo sette, nove giorni nell'MPTP). L'iniezione cellulare si effettua attraverso l'utilizzo di una siringa Hamilton da 10ul contenente 100000 di PM-NSCs sospese in 3ul di PBS e grazie all'ausilio dello stereotassico ci permette di centrare in maniera molto precisa lo striato utilizzando le seguenti coordinate (AP 0; L +2; DV -2) (Cui et al., 2010)

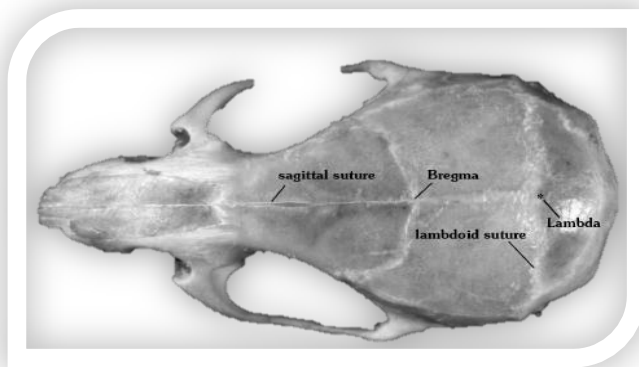


Figura 7: immagine vista dall'alto delle strutture ossee del cranio del topo

Figura 8: apparato stereotassico

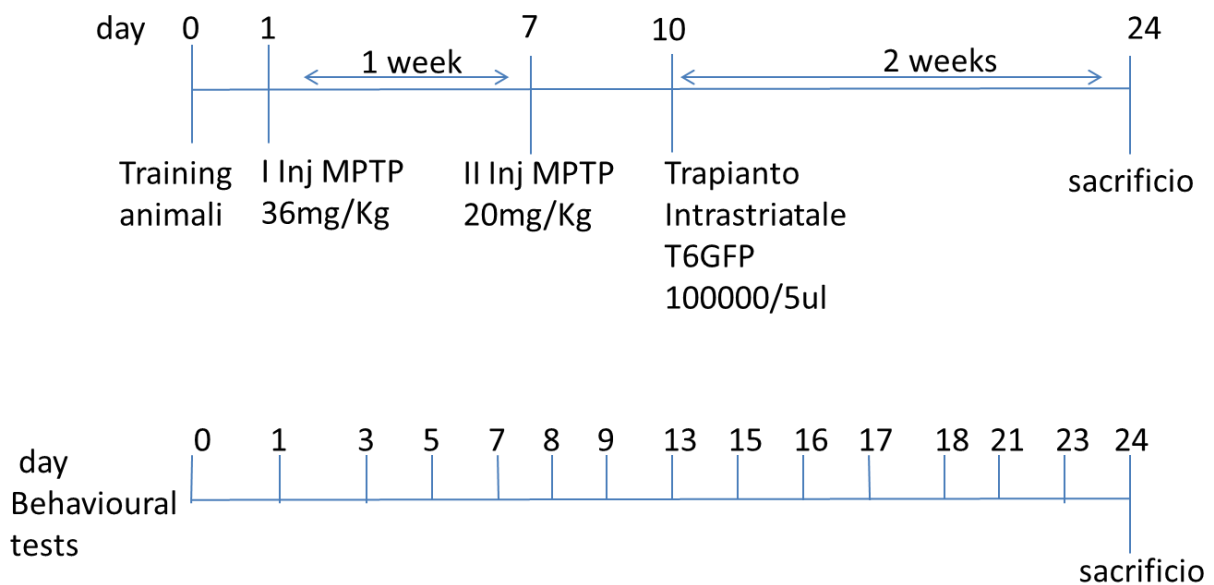


Figura 9: diagramma sperimentale

3.7 Cure post-operatorie

Nei giorni successivi al trapianto gli animali sono seguiti giornalmente e vengono somministrati, quotidianamente per una settimana, sottocute 100ul di ampicillina alla dose di 100mg/kg di peso.

3.8 Immunoistochimica

3.8.1 *Processo di preparazione di tessuto cerebrale adulto.*

Dopo un mese gli animali sono stati anestetizzati con cloralio idrato (350 mg/kg, i.p.) e sacrificati tramite perfusione transcardiaca di soluzione fisiologica a freddo (4°C), seguita da soluzione di fissativo (4% di paraformaldeide in PBS). I cervelli sono stati dissezionati e conservati nel liquido di perfusione per almeno 72 ore a 4°C; successivamente sono stati crioprotetti in una soluzione di saccarosio al 30% in PBS o/n a 4°C e poi congelati; in seguito, i cervelli sono stati tagliati con un criostato a livello dello striato e della SN con fettine dello spessore di 20 µm.

3.8.2 Immunofluorescenza

L'immunofluorescenza è una metodica utilizzata per verificare la presenza di una proteina di interesse nel tessuto o nelle cellule oggetto di studio. Il processo su cui si basa l'immunofluorescenza è il riconoscimento di un epitopo presente su un determinato tipo di proteina da parte di uno specifico anticorpo, detto anticorpo primario (Ab I). Il passaggio successivo prevede l'impiego di un altro anticorpo, detto anticorpo secondario (Ab II), che identifichi l'AbI precedentemente usato: l'AbII, infatti riconosce un epitopo specie-specifico per l'animale in cui è stato prodotto l'AbI e, quindi, lega soltanto l'AbI, a sua volta legato alla proteina specifica contro cui è diretto, sempre che essa sia presente nel campione analizzato. L'AbII è solitamente coniugato a un fluorocromo, una molecola in grado di emettere ad una lunghezza d'onda rilevabile da un microscopio a fluorescenza se stimolata con una luce di lunghezza d'onda opportuna; ciò permette di determinare e quantificare la presenza o meno della proteina d'interesse.

3.8.2.1 Immunoistochimica

Le reazioni per l'immunofluorescenza in vivo sono state effettuate sulle sezioni coronali, sagittali e trasversali di encefalo di topo ottenute al criostato. Il metodo di colorazione prevede 3 lavaggi in

PBS da 5' ciascuno. Dopo i lavaggi si permeabilizza la membrana con soluzione di PBS contenente NGS 10% sciolta in PBS e Triton 0,2% disciolto in PBS per 1h e 30' a RT: ciò è indispensabile per consentire l'ingresso dell'anticorpo primario nel citosol (Triton), e per saturare i siti aspecifici del tessuto cui potrebbe legarsi l'anticorpo primario (NGS). L'anticorpo primario, diluito in buffer di PBS contenente NGS5% e Triton 0,2% viene incubato O/N a RT. Di nuovo si effettuano 3 lavaggi in PBS da 5' ciascuno, per eliminare i residui di AbI che non si sono legati alla proteina bersaglio, e si incubano le sezioni per 2h a RT in cameretta umida con l'AbII (a concentrazione specifica) diluito in un buffer di PBS contenente NGS 5% e filtrato prima dell'uso. Si effettuano ulteriori 3 lavaggi in PBS da 5' ciascuno, per eliminare i residui di AbII che non si sono legati al primario e che potrebbero interferire con il segnale rilevato dal microscopio confocale. Per evidenziare i nuclei si utilizza il marcatore nucleare DAPI (Sigma), una molecola intercalante il DNA in zone ricche di A-T alla concentrazione finale di 1ug/ml e lo si lascia agire per 10' al buio. Dopo 3 lavaggi con PBS 5' ciascuno, si bagna il vetrino con il Fluorsave (Calbiochem), un agente utilizzato per proteggere l'AbII coniugato al fluorocromo dal photobleaching, così da migliorare e da prolungarne il segnale di fluorescenza. Quindi si monta il vetrino coprioggetto, che verrà fissato con dello smalto. Le sezioni vengono osservate al microscopio a fluorescenza (Leica) o microscopio confocale TCS SP2 (Leica). Una volta visionati, i vetrini possono essere conservati a 4°C per un breve periodo di tempo, oppure a -30°C per un periodo più lungo.

AbI	concentrazione	Prodotto	AbII	Concentrazione	prodotto
MAP-2	1:500	Chemicon	Anti Rabbit rosso	1:1000	Alexa
ChAT	1:1000	Chemicon	Anti Mouse rosso	1:1000	Alexa
TH	1:1000	Chemicon	Anti chicken rosso	1:1000	Alexa
GABA	1:500	Covance	Anti Goat rosso	1:1000	alexa
NG2	1:400	Covance			

Figura 10: anticorpi primari e secondari utilizzati nelle immunofluorescenze

3.8.2.2 Metodica immunoenzimatica per la tirosina idrossilasi (TH)

I neuroni DA vengono identificati tramite una reazione immunistochemica per la tirosina idrossilasi (TH). Tale enzima è responsabile della trasformazione della tirosina in L-DOPA, prima tappa della sintesi delle catecolamine. È ben noto che i neuroni TH-positivi presenti nel mesencefalo ventrale sono di natura DA (Dahlstrom e Fuxe, 1964).

L'immunoreattività per la TH viene eseguita sulle sezioni secondo una metodica descritta in precedenza (Sternberger, 1970) apportando alcune modifiche. Inizialmente alle sezioni poste nei pozzetti vengono effettuati due lavaggi in PBS+Triton (0,1M) per 15 minuti ciascuno. Di seguito vengono incubate 15 minuti in H₂O₂ allo 0,3% (in PBS+Triton), per inattivare le perossidasi endogene. Nuovamente vengono effettuati due lavaggi, dopo di che è introdotto l'NGS (normal goat serum) al 10% in PBS+Triton, trattamento che permette di diminuire i legami aspecifici dell'Ab primario. Dopo un'ora viene aggiunto l'Ab primario anti-TH alla concentrazione 1:1000, l'incubazione viene fatta a 4°C per 24 ore. Successivamente ad un doppio lavaggio viene incubato l'Ab secondario biotinilato per almeno 2 ore; a questo punto viene incubato con il complesso Avidina-Biotina per 30 minuti seguito da due lavaggi. Infine lo sviluppo della colorazione avviene grazie alla reazione della perossidasi con il cromogeno DAB e all'aggiunta del substrato H₂O₂, questo dà luogo alla formazione di una colorazione marrone dei neuroni DA. Avvenuta la colorazione le sezioni sono montate su vetrini utilizzando una soluzione di gelatina liquida (1% gelatina in 40% etanolo), in seguito attraverso una serie di passaggi in soluzioni a concentrazione alcoliche crescenti vengono disidratati, passati in xilolo e chiusi con un vetrino coprioggetto e un montante solubile in xilolo, infine osservati al microscopio ottico. Le immagini sono raccolte usando una fotocamera e analizzate con l'ausilio di un software dedicato.

3.9 Test comportamentali

Allo scopo di valutare il grado di lesione ricevuta ed il successivo recupero motorio in seguito al trapianto delle cellule T6 GFP, è stata effettuata per diversi giorni l'analisi comportamentale degli animali usando varie tecniche: l'Horizontal Grid Test, la Vertical Grid Test e la Forepaw stride length during walking.

3.9.1 Horizontal grid test

Questa metodica descrive un test semplice e poco costoso che misura deficit comportamentali a lungo termine in topi trattati con dosi moderate di MPTP (J.L. Tillerson & W. Miller).

L'apparato è costituito da una griglia orizzontale 12 cm x 12 cm. Nel costruire questo strumento, particolare attenzione è stata dedicata per evitare qualsiasi danno agli animali e da non limitare il movimento dell'animale sulla griglia. Gli animali vengono posizionati al centro della griglia e viene invertita, gli animali rimangono appesi alla griglia e vengono ripresi per trenta secondi a testa in giù grazie all'ausilio di una telecamera. I video riprodotti vengono analizzati in slow motion frame-by-frame. Mediante questa tecnica è possibile ottenere numerosi dati rilevanti (Percent Wall Time, Forepaw Faults, Step Distance) che permettono di apprezzare meglio le differenze tra gli animali semplicemente lesionati con la neurotossina e gli animali che hanno subito la lesione e successivamente il trapianto delle cellule T6GFP.

3.9.1.1 *Percent Wall Time*

È il tempo trascorso al contatto fisico dell'animale con la parete circostante diviso per il tempo totale sulla griglia (30 secondi). Il contatto con la parete di supporto è stato definito come il contatto fisico dell'animale con la parete di sostegno sia con la testa o con il tronco del corpo. Il contatto effettuato con la coda non viene considerato. Quando l'animale sta esplorando la rete e giunge a contatto con la parete ma non si ferma e sposta il peso per appoggiarsi contro di essa, in questo caso non è considerato contatto diretto.

Se l'animale si sposta avanti e indietro sulla griglia e continuamente si appoggia contro la parete, in questo caso il contatto alla parete viene considerato.

3.9.1.2 *Forepaw faults*

È il numero di passi delle zampe anteriori falliti dell'animale capovolto diviso per il numero totale dei passi delle zampe anteriori sulla griglia (30 secondi). Un passo utile è stato definito quando collocando la zampa anteriore durante il movimento, il passo permette di spostare tutto il peso corporeo dell'animale.

3.9.2 **Vertical grid test** (S. T. Kim et al., 2010)

La struttura Vertical Grid è una scatola aperta posizionata in verticale, delle dimensioni di 8cm x 55cm x 5cm. La griglia è costituita da una maglia di griglia di 0,8cm x 0,8cm questa metodica unisce i vantaggi del test della griglia orizzontale e del test del palo.

Precedente alla somministrazione di MPTP, i topi sono stati abituati a scendere

Il topo viene posto con la testa rivolta verso l'alto a tre centimetri dal bordo superiore dell'apparato ed è delle dimensioni da permettere al topo di potersi girare e di conseguenza scendere. L'animale viene ripreso con la telecamera mentre si volta e scende sino a giungere alla base della torre. Viene calcolato così il tempo totale (in secondi) della discesa dell'animale

3.9.3 **Forepaw stride length during walking** (Tillerson et al., 2002)

Vengono marcate con inchiostro rosso le zampe anteriori dell'animale e successivamente viene fatto camminare su un foglio A4. Viene calcolata la media della lunghezza (in centimetri) dei passi delle zampe anteriori.

4 RISULTATI

Come già ricordato dall'introduzione una delle zone a più intensa attività neurogenica e gliogenica del cervello adulto è la SVZ, ampiamente studiata nei roditori. Nonostante esista un consistente numero di studi sul comportamento in vitro delle cellule staminali neurali, ottenute sia da tessuti embrionali che adulti, molto poco si conosce riguardo ai fattori che agiscono in situ su tali cellule. D'altronde, è stato dimostrato che esistono numerose molecole solubili e proteine di membrana che ne controllano proliferazione, migrazione e differenziazione.

Per valutare la distribuzione e il numero di cellule positive per marker di proliferazione e migrazione, è stata eseguita un'analisi di immunohistochimica in encefali di topo prelevati immediatamente dopo il sacrificio (T0) e dopo 6 ore (T6). L'esame istologico del tessuto è avvenuto utilizzando diversi Ab deputati al legame di marcatori proliferanti e migranti (vd Materiali e Metodi).

Le tecniche di immunohistochimica sono state associate ad una analisi dei preparati in microscopia a fluorescenza, prima, e microscopia con il confocale dopo, nella quale gli Ab diretti contro marcatori di proliferazione e differenziamento venivano associati ad Ab noti per riconoscere marcatori ben definiti di questa popolazione proliferante quali BrdU somministrata in vivo.

4.1 Valutazione mediante immunohistochimica delle potenziali cellule B

Nella SVZ dei topi T0 e T6 tutte le cellule BrdU positive sono marcate con l'anticorpo per GFAP che inoltre marca tutte le cellule gliali di rivestimento delle pareti del ventricolo. La percentuale di cellule GFAP positive che colocalizzano con il marker esogeno BrdU, non ha mostrato differenze importanti con il topo T0.

Come si può osservare dai nostri dati a tempi brevi dalla somministrazione di BrdU (2h) la differenza tra T0 e T6 è dell'ordine del 25% e quindi significativa.

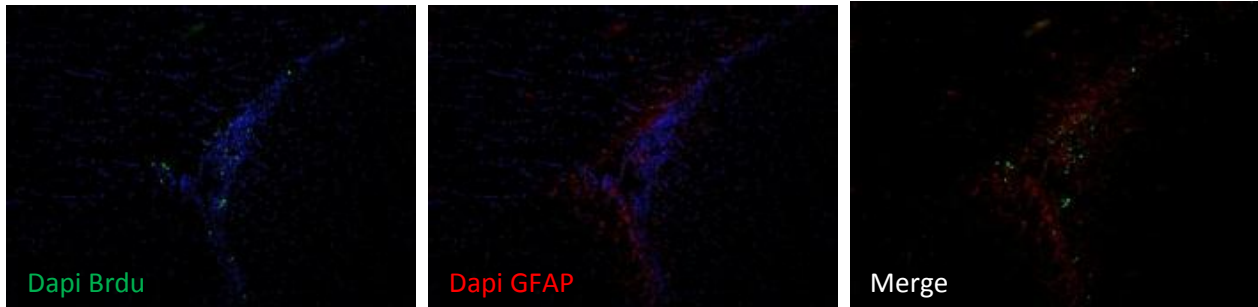
Questa differenza diventa meno importante valutando gli animali con la somministrazione a 12 h di BrdU.

Si può notare che a 12h, la percentuale di cellule marcate di BrdU e GFAP scende di circa del 12%. Questo conferma il fatto che con il passare delle ore il marcatore BrdU tende a diluirsi a causa della proliferazione dei precursori neurali.

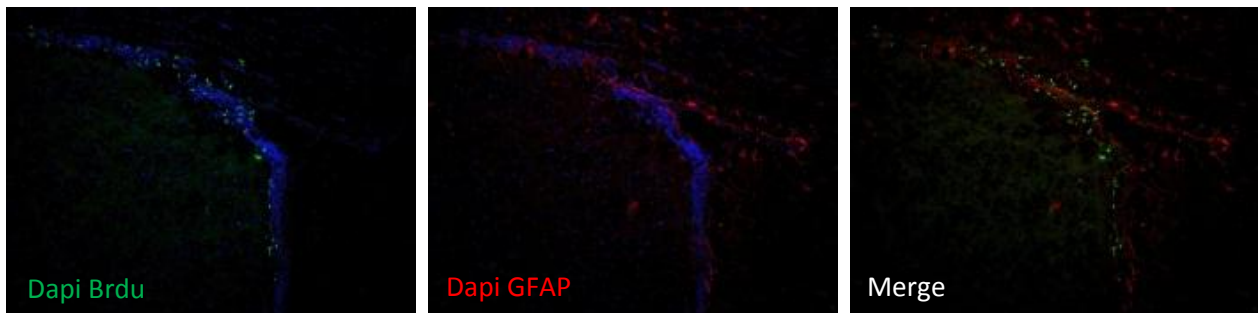
Questo fa assumere una maggiore rilevanza ai dati ottenuti a 2h che suggerivano come nelle ore postmortem vi possa essere una maggiore proliferazione di precursori neurali in seguito

all'esposizione del fattore neurofico EPO che è stato precedentemente descritto nel nostro gruppo (cit.)

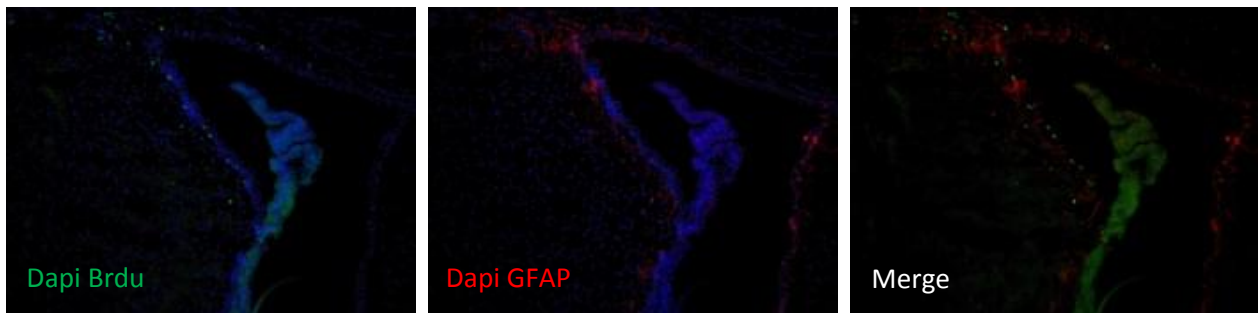
I nostri dati mostrano che non si osservano differenze significative tra gli animali con BrdU somministrata 12 ore prima del sacrificio rispetto a quelli con somministrazione 2 ore prima del sacrificio.



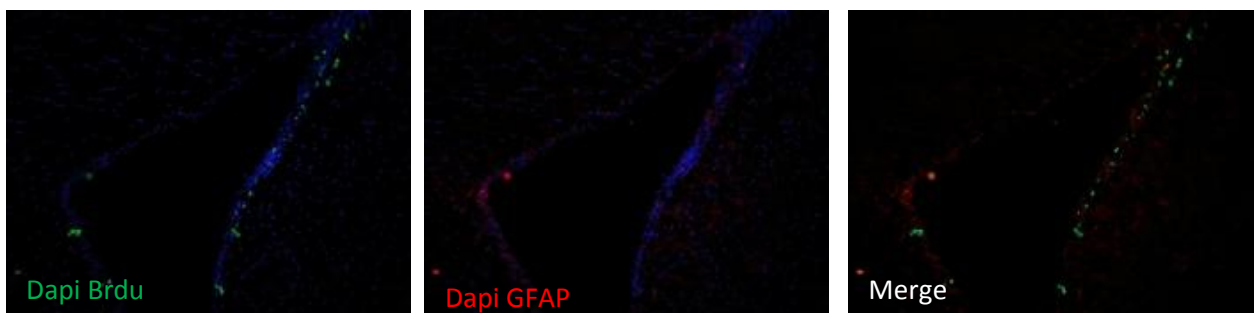
T6 12h BrdU



T0 12h BrdU



T6 2h BrdU



T0 2h BrdU

Figura 11 : Analisi immunoistochimica con Ab diretti contro la BrdU e la GFAP

La figura 11 mostra immagini che esibiscono la marcatura di GFAP in rosso e dalla incorporazione di BrdU in verde di SVZ di animali T6 eT0.

Le immagini qui riportate sono rappresentative di uno di sei esperimenti condotti con lo stesso protocollo e che hanno consentito di ottenere risultati analoghi.

I due grafici mostrati nella figura12 rappresentano la media dei risultati ottenuti

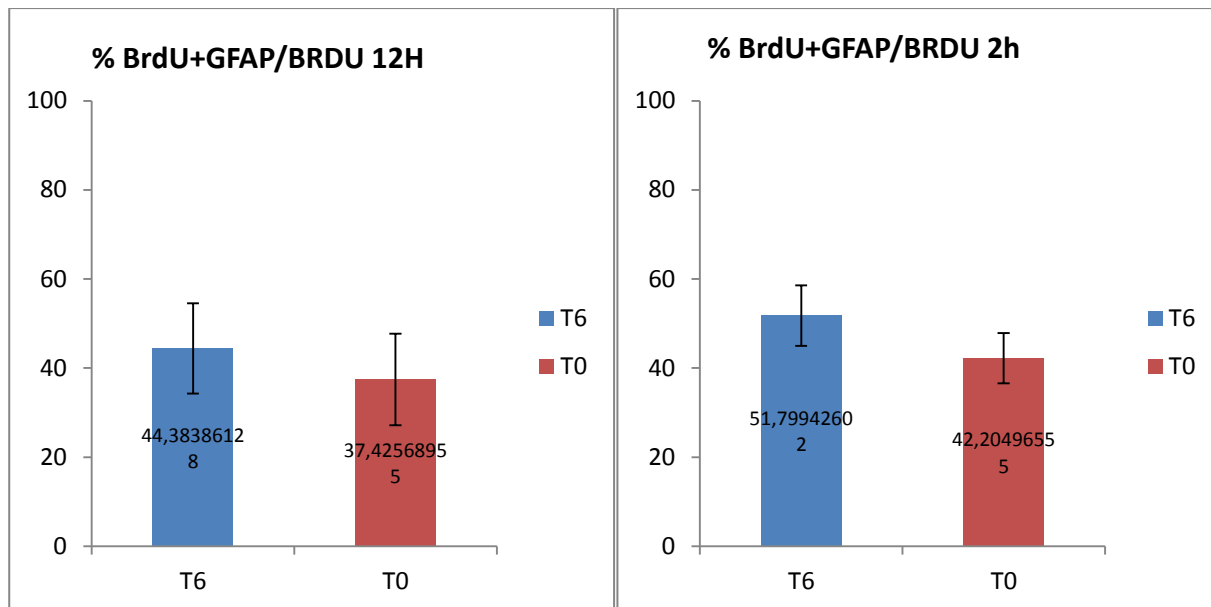


Figura 12: Grafico relativo alla percentuale di cellule BrdU positive che coesprimono anche con il marcatore GFAP rilevato dall'analisi dell' SVZ di campioni di topi, con somministrazione di BrdU 12 ore e 2 ore prima del sacrificio, T6 e controlli T0.

4.2 Valutazione mediante immunostochimica delle potenziali cellule C

Le cellule C dell'SVZ vengono identificate grazie alla loro alta proliferatività, sono quindi marcate da BrdU e dal Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)(Valero et al., 2004).

Tutte le cellule della figura 18 evidenziano che le cellule Brdu+ siano marcate anche per PCNA confermando così i dati della letteratura e questo vale sia per le cellule staminali T6 che per le T0.

La quantificazione delle immagini è riportata nella figura 19. In questo caso si evidenzia come le cellule C siano equiparabili nei 2 gruppi e le cellule che esprimono il comarcatore BrdU e PCNA sono circa il 50% del totale delle cellule.

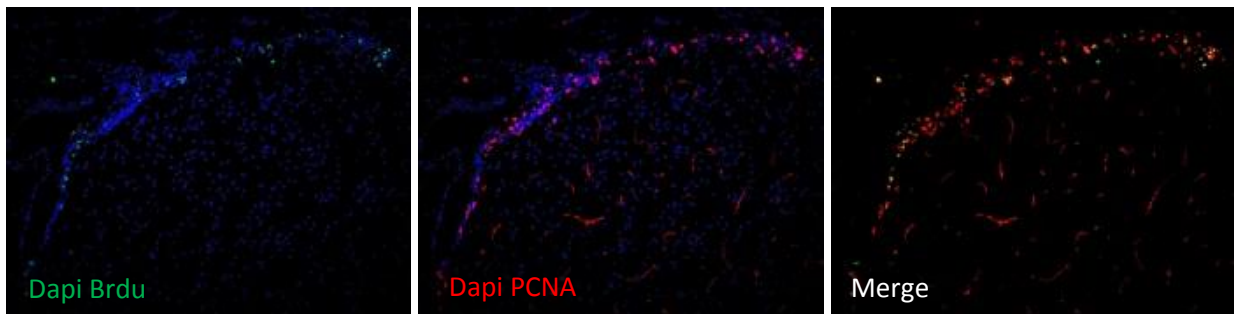
Questo è evidente a 12h in cui abbiamo un reclutamento maggiore di cellule. A 2h, il reclutamento BrdU-PCNA è leggermente inferiore.

Questi dati confermano ciò che è scritto in letteratura, infatti PCNA è espresso durante la tarda fase G1 e durante l'inizio della fase S prima della replicazione del DNA, e la sua concentrazione diminuisce durante la fase G2 e durante la mitosi (J. Valero et al., 2004).

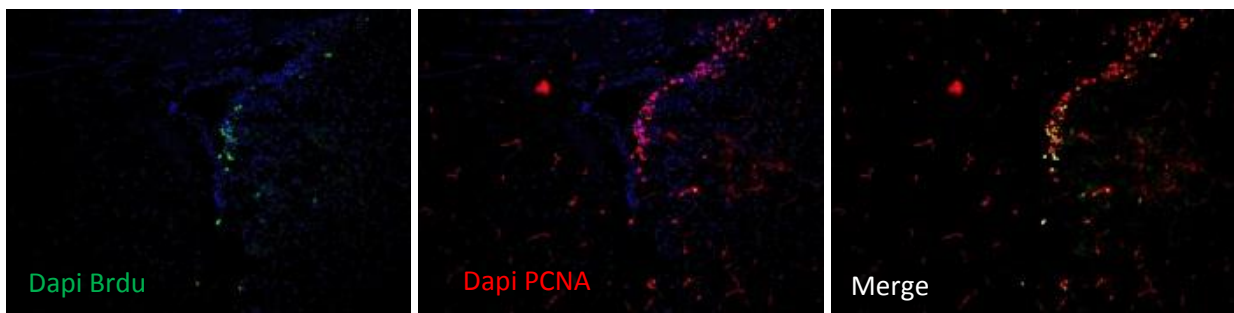
BrdU, invece, analogo della timidina, si incorpora nelle cellule proliferanti durante la fase S.

La figura mostra immagini che esibiscono la marcatura di PCNA in rosso e di BrdU in verde di SVZ di animali T6 e T0.

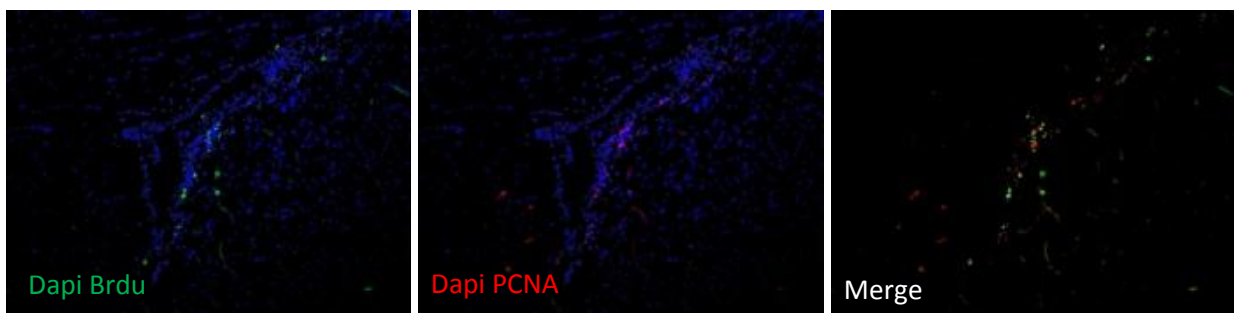
Le immagini qui riportate nella figura 13 sono rappresentative di uno di sei esperimenti condotti con lo stesso protocollo e che hanno consentito di ottenere risultati analoghi.



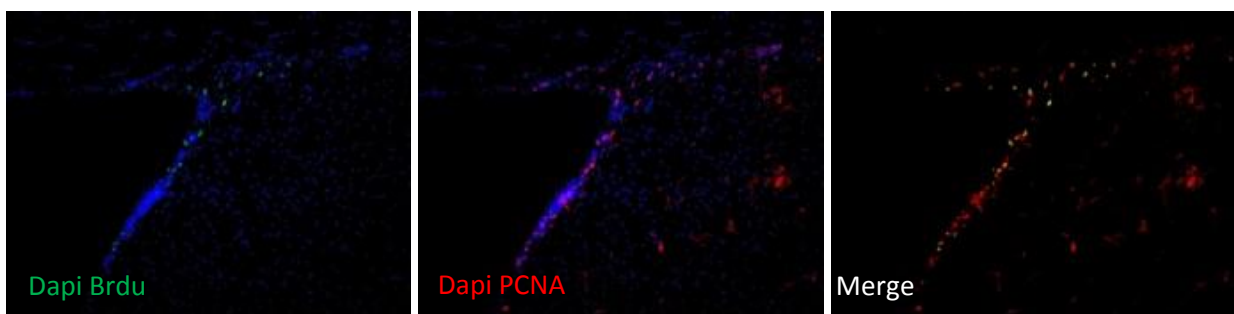
T6 12h BrdU



T0 12h BrdU



T6 2h BrdU



T0 2h BrdU

Figura 13 : Analisi immunoistochimica con Ab diretti contro la BrdU e la PCNA

Anche in questo caso, sia in animali con iniezione di BrdU 12 ore prima del sacrificio, sia in animali con iniezione di BrdU 2 ore prima del sacrificio, la percentuale di cellule PCNA positive che coesprimono anche per BrdU è paragonabile con la percentuale del controllo T0.

I due grafici rappresentano la media dei risultati ottenuti.

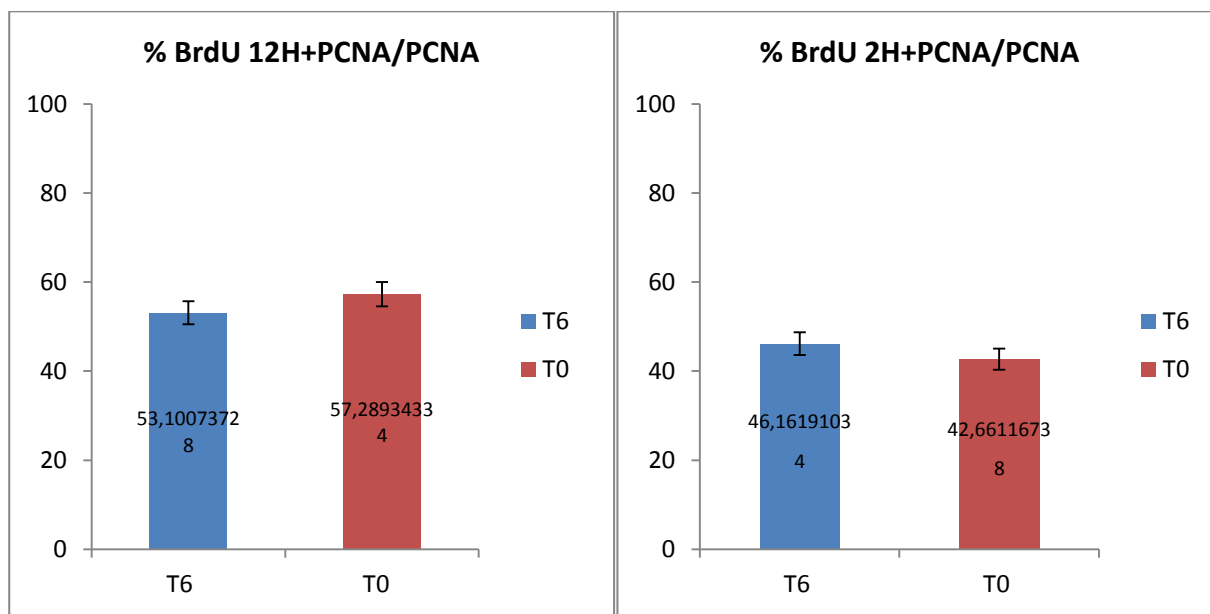


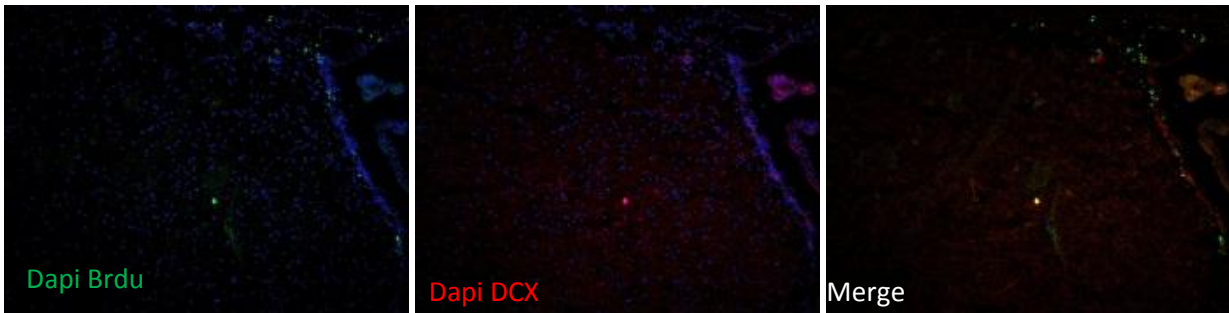
Figura 14: Grafico relativo alla percentuale di cellule BrdU positive che coesprimono anche con il marcatore PCNA rilevato dall'analisi dell' SVZ di campioni di topi, con somministrazione di BrdU 12 ore e 2 ore prima del sacrificio, T6 e controlli T0.

4.3 Valutazione mediante immunistoichimica delle potenziali cellule A

Sulla base di questi risultati e dell'ipotesi che la migrazione cellulare è conseguenza della proliferazione, è stata condotta un'ulteriore analisi immunistoichimica sempre a livello della nicchia neurogenica. Mediante l'utilizzo di un Ab specifico per la DCX, sono state così esaminate potenziali differenze nei topi T6 rispetto ai controlli T0. Le cellule positive per DCX sono localizzate principalmente lungo la stria migratoria e tale marcatore è coinvolto e probabilmente insieme a PSANCAM regolano la migrazione neuronale. L'analisi dell'espressione della DCX non ha evidenziato differenze rilevanti nell'area neurogenica tra il T6 rispetto al T0.

Le immagini qui riportate sono rappresentative di uno di sei esperimenti condotti con lo stesso protocollo e che hanno consentito di ottenere risultati analoghi.

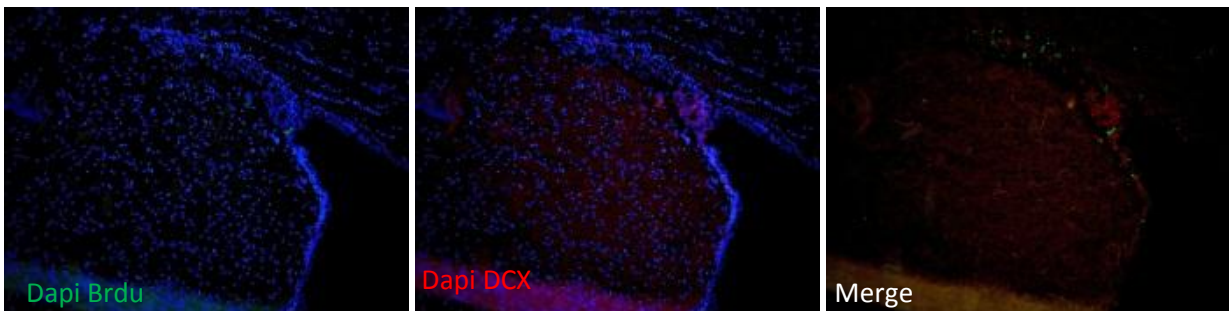
La figura mostra immagini che esibiscono la marcatura di DCX in rosso e di BrdU in verde di SVZ di animali T6 e T0.



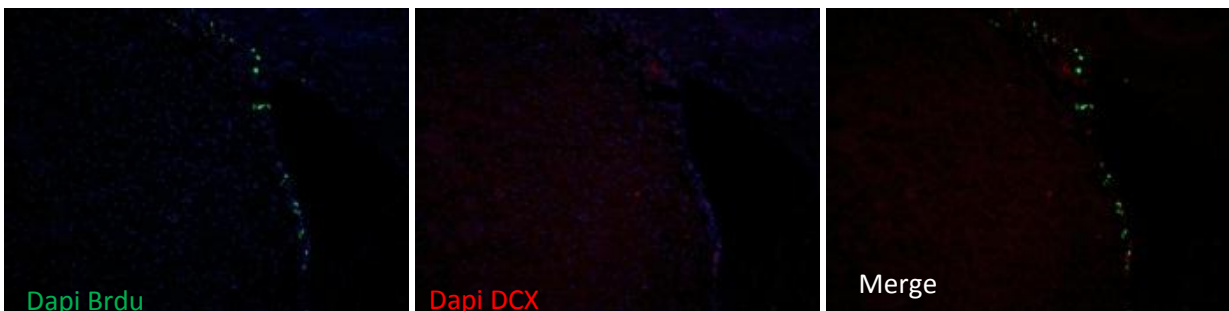
T6 12h BrdU



T0 12h BrdU



T6 2h BrdU



T0 2h BrdU

Figura 15 : Analisi immunoistochimica con Ab diretti contro la BrdU e la DCX

I due grafici rappresentano la media dei risultati ottenuti.

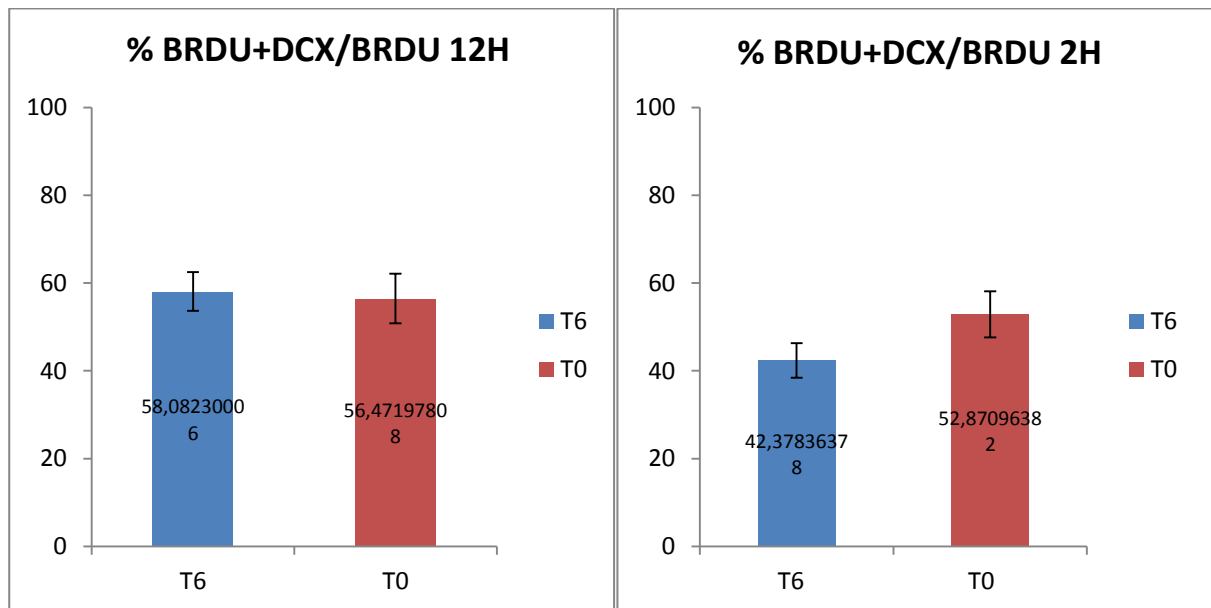


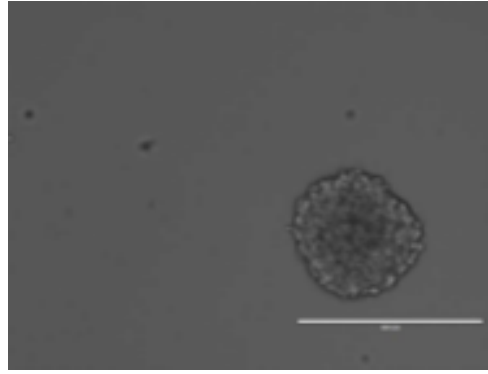
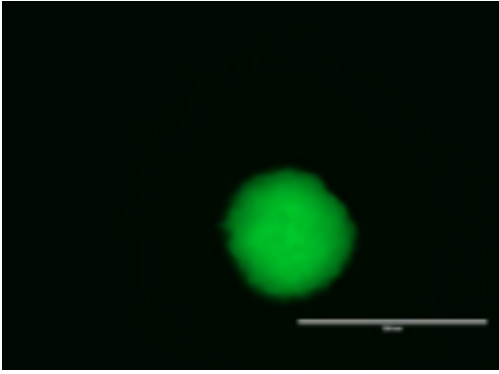
Figura 16 : Grafico relativo alla percentuale di cellule BrdU positive che coesprimono anche con il marcatore DCX rilevato dall'analisi dell' SVZ di campioni di topi, con somministrazione di BrdU 12 ore e 2 ore prima del sacrificio, T6 e controlli T0.

La quantificazione illustrata nella figura 21 mostra come le cellule proliferanti BrdU+ siano per oltre il 50% indirizzate verso un destino neuroblastico questo è evidenziato negli animali in cui è stata somministrata la BrdU a 12h prima del sacrificio.

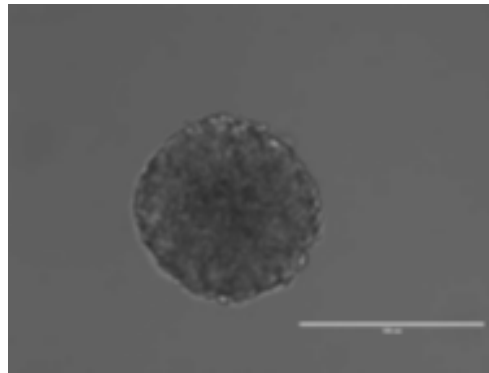
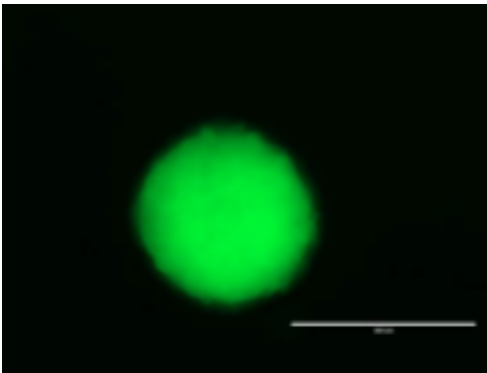
Nel presente lavoro abbiamo osservato che:

la proliferazione è stata dimostrata verificando appunto l'espressione di BrdU in cellule proliferanti.

1. Nel modello T6 la coespressione di BrdU e PCNA è paragonabile al controllo T0 indicando una paragonabile proliferazione cellulare.
2. BrdU colocalizza anche con antigeni associati alla migrazione, Dcx ma anche in questo caso non sono state ritrovate differenze significative.



Neurosfera indifferenziata, *in vitro*, proveniente dalla zona sub-ventricolare di un topo adulto C57/blGFP (20x) prelevata 6 ore dopo la morte (T6). La totalità delle cellule nella sfera sono reattive per la GFP (verde)



Neurosfera indifferenziata, *in vitro*, proveniente dalla zona sub-ventricolare di un topo adulto C57/blGFP (20x) subito dopo la morte (T0). La totalità delle cellule nella sfera sono reattive per la GFP (verde).

La capacità di automantenimento e differenziamento è prerogativa delle cellule staminali. Al fine di verificare se le cellule da noi isolate avessero, oltre alla capacità di proliferazione, anche quella di differenziamento, abbiamo effettuato saggi di differenziamento neurogenico, seguendo dei protocolli già riportati in letteratura, valutando la presenza di marcatori di tipo neurale come MAP2, GFAP e NG2, dopo differenziamento *in vitro*.

I test effettuati *in vitro* sulle colture in studio hanno fornito i seguenti risultati:

le cellule delle colture sono state sottoposte a tre diverse concentrazioni cellulari e dopo sette o quattordici giorni sono state fissate mediante paraformaldeide al 4% ed è stata valutata l'espressione del marcatore neuronale MAP2, di quello astrocitario GFAP e di quello oligodendrocitario NG2.

4.4 Differenziamento neurale in vitro con 60000 cellule per pozzetto

Dopo 7 o 14 giorni, le cellule sono state fissate e tramite immunocitochimica siamo andati a valutare la presenza di marcatori di tipo neurale (MAP2, GFAP e NG2). I risultati ottenuti sulle colture sono mostrati nei due istogrammi.

Gli istogrammi evidenziano che a questa densità cellulare la maggior parte delle cellule si differenziano in cellule GFAP+, mentre quelle con marcatura neuronale, (MAP2+) sono al di sotto del 20%.

A tempi brevi si può notare come sia interessante la percentuale di cellule NG2, dopo 14 giorni di coltura la percentuale di cellule NG2* si dimezza notevolmente, indicando che a questa densità le cellule oligodendrocitarie si trasformano in cellule GFAP+, oppure muoiono, invece le cellule GFAP+ continuano a crescere in percentuale.

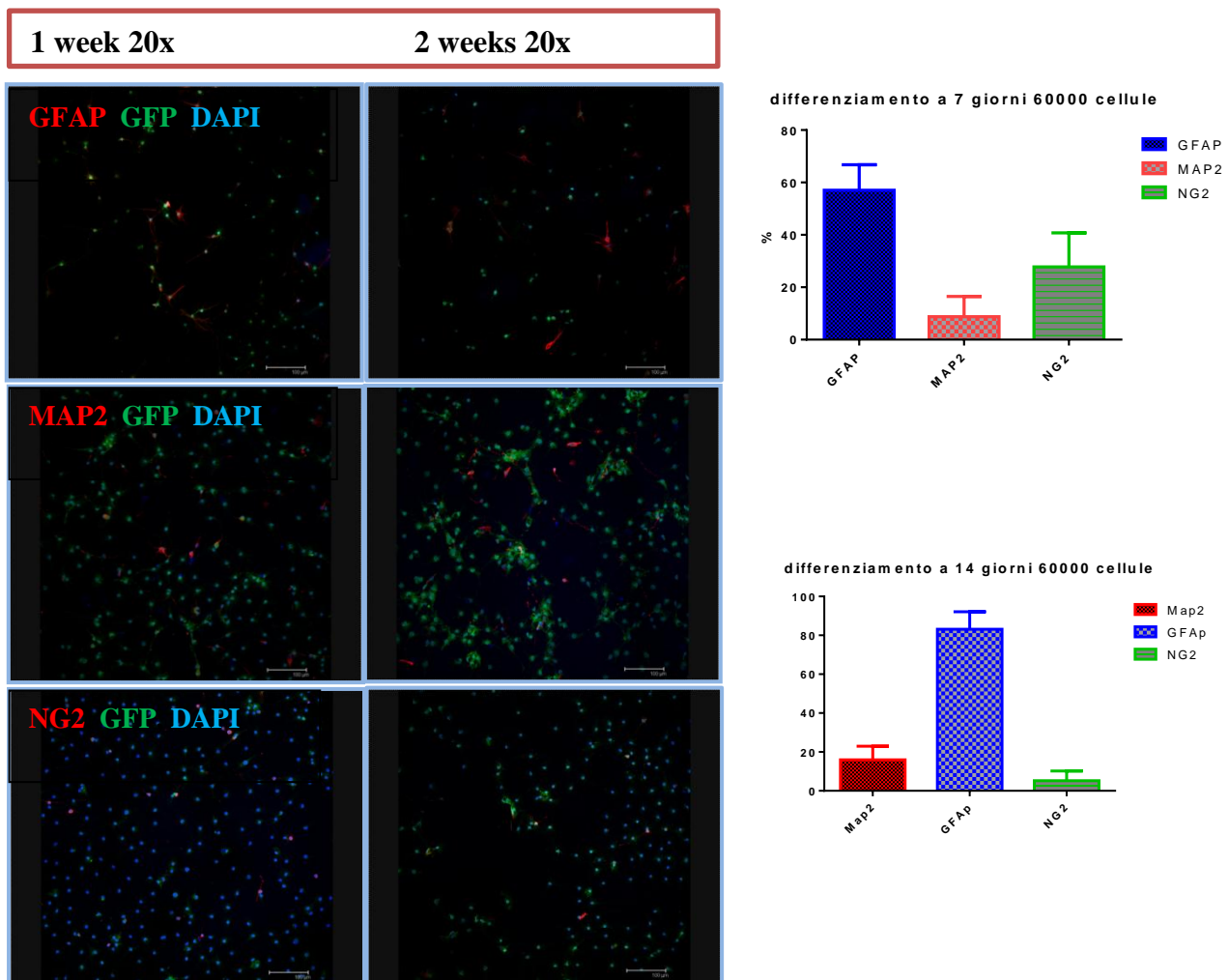


Figura 17: analisi immunocitochimica con Ab diretti contro la GFAP, MAP2 e NG2

I due grafici sono relativi alla percentuale di cellule differenziate; le cellule T6GFP alla densità cellulare di 60000 cellule sono state fissate ad una settimana ed a due settimane.

4.5 Differenziamento neurale in vitro con 30000 cellule per pozzetto

A questa densità cellulare si può immediatamente osservare come le cellule GFAP+ si stabilizzano intorno al 60% per entrambi i tempi di osservazione.

Mentre le cellule MAP2 a 7 giorni sono circa al 40% e dopo 14 giorni scendono al 20%.

Destino simile per i precursori oligodendrocitari che a 7 giorni sono intorno al 15%, mentre a 14 giorni si riducono del 50%.

Questo suggerisce che anche a questa concentrazione cellulare vi sia una certa fragilità delle cellule MAP2 ed NG2 +, e questo calo suggerisce la loro morte o transdifferenziamento in cellule GFAP+.

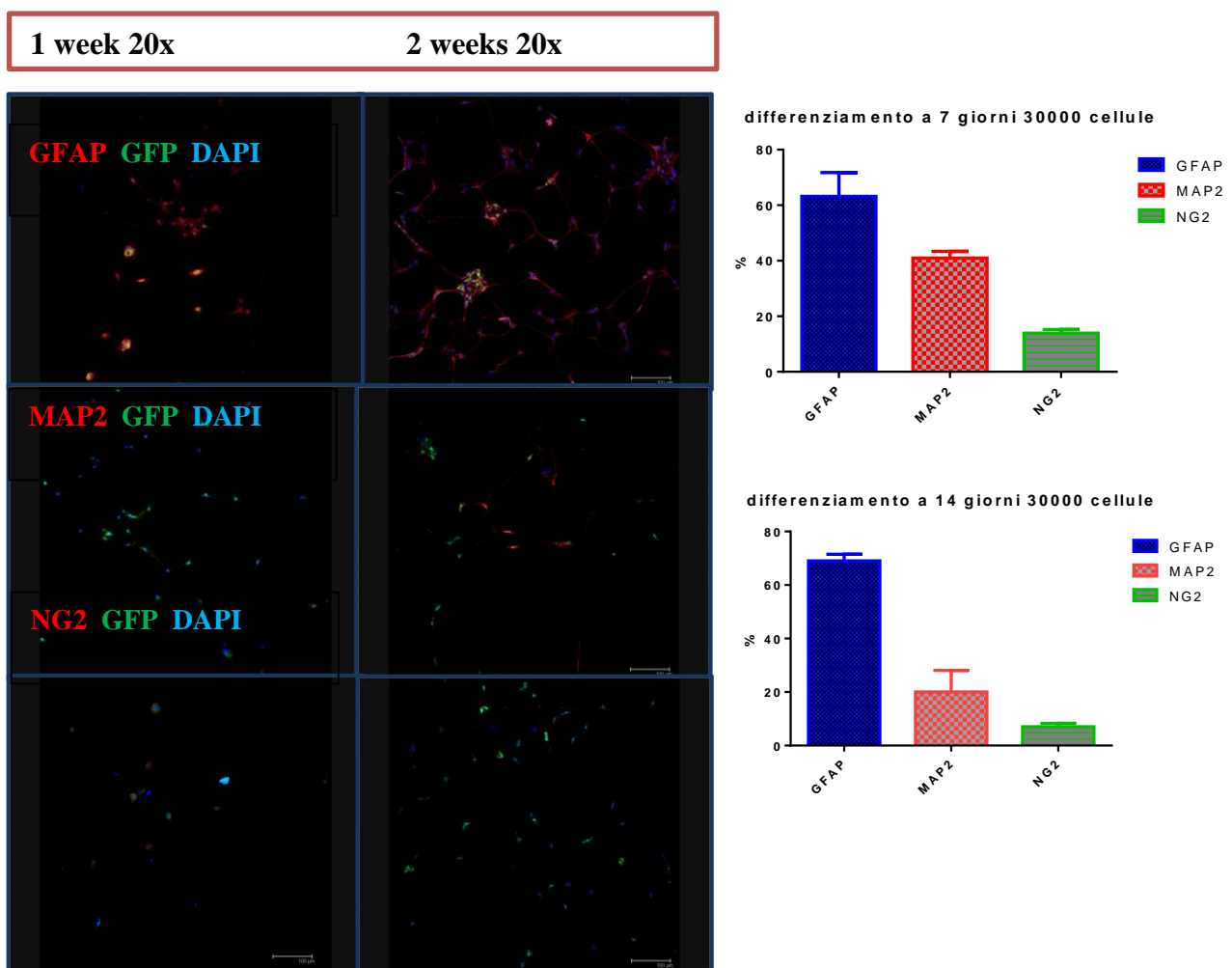


Figura 18: analisi immunostochimica con Ab diretti contro la GFAP, MAP2 e NG2

I due grafici sono relativi alla percentuale di cellule differenziate, le cellule T6GFP alla densità cellulare di 30000 cellule sono state fissate ad una settimana ed a due settimane.

4.6 Differenziamento neurale in vitro con 15000 cellule per pozzetto

Con una simile densità lo sviluppo verso il destino neuronale ed oligodendrocitario è del tutto paragonabile alle cellule T0 con una percentuale che oscilla di circa l'8-10%.

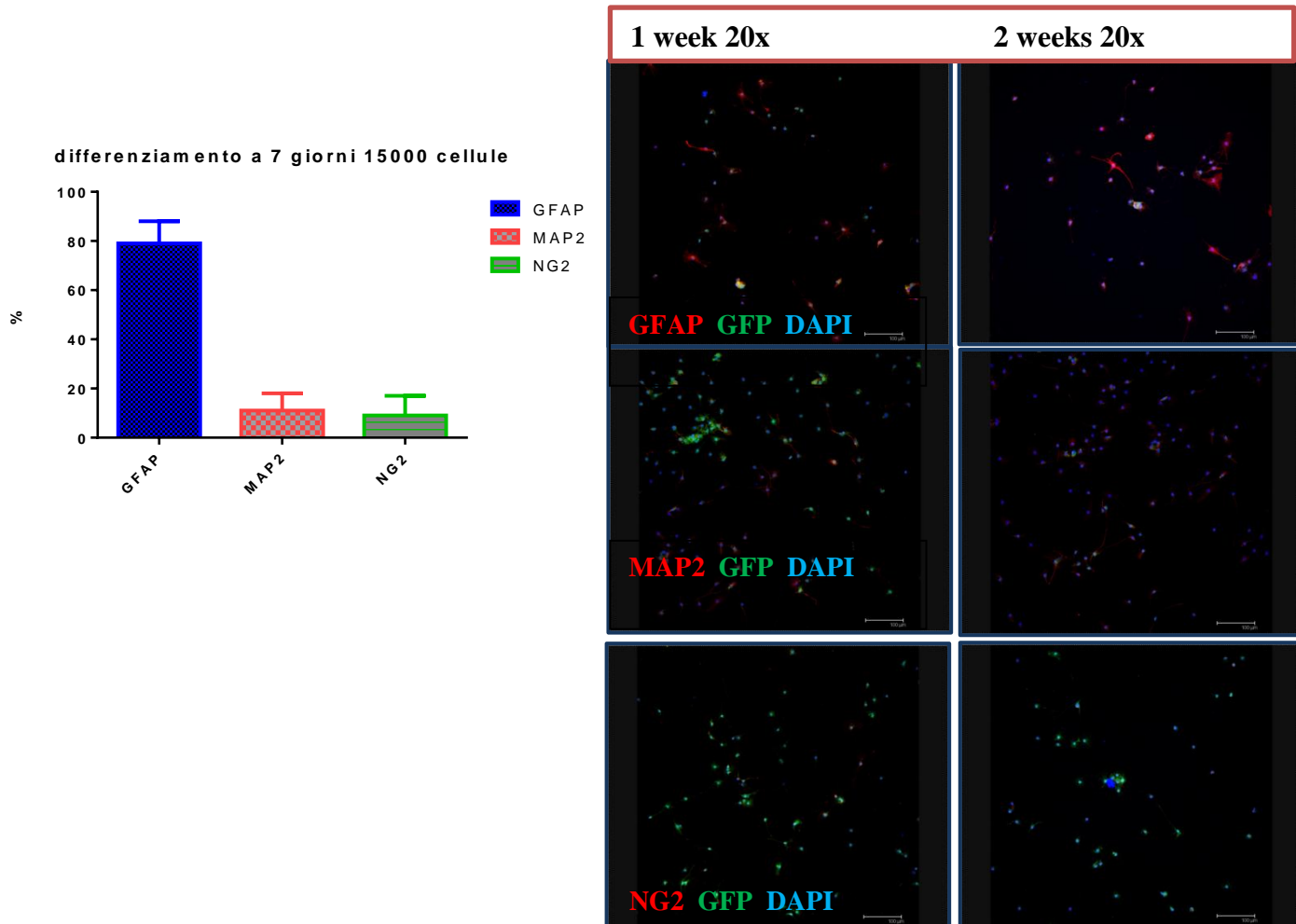


Figura 19: analisi immunoistochimica con Ab diretti contro la GFAP, MAP2 e NG2

I due grafici sono relativi alla percentuale di cellule differenziate, le cellule T6GFP alla densità cellulare di 15000 cellule sono state fissate ad una settimana ed a due settimane.

4.7 Azione neurotrofica delle cellule T6 in un modello murino di malattia di Parkinson

In conclusione questi tipi di esperimenti indicano che le nostre T6 differenziano maggiormente in neuroni con una densità cellulare pari a 30000 cellule, mentre a concentrazioni superiori o inferiori, tale concentrazione si riduce di oltre il 50%.

Inoltre questi esperimenti indicano che il differenziamento a 7 giorni è il tempo ideale per ottenere una buona percentuale di cellule neuronali MAP2 +

Dopo aver effettuato innumerevoli saggi di differenziamento per studiare la multipotenzialità delle cellule T6GFP è stato condotto il trapianto cellulare nel modello indotto con l'MPTP. Com'è stato descritto in precedenza, gli animali trattati con la neurotossina MPTP mostrano disturbi motori extrapiramidali correlati alla deplezione dopaminergica del sistema nigrostriatale.

Scopo di questo lavoro è stato quello di analizzare le proprietà terapeutiche delle cellule T6 GFP in seguito a trapianto intrastriatiale con l'utilizzo dello stereotassico.

I topi C57/bl-GFP hanno consentito di prelevare le cellule staminali neurali adulte GFP dall'SVZ. Le cellule staminali T6GFP, essendo perennemente fluorescenti, hanno permesso di determinare più facilmente dopo il trapianto su animali MPTP, la localizzazione, il numero e l'acquisizione di un possibile fenotipo differenziativo (dopaminergico, colinergico e gabaergico) e successivamente di poter dimostrare che le cellule trapiantate sopravvivano e si integrino correttamente lungo il pathway nigrostriatale del topo che ha subito la lesione.

Le procedure chirurgiche sono avvenute secondo i criteri riportati in letteratura. L'analisi del recupero motorio negli animali trapiantati e dei relativi controlli, trapiantati con sola soluzione fisiologica, è stata eseguita mediante l'Horizontal Grid Test, Vertical Grid tTest e la Forepaw stride length during walking precedentemente descritte nei Materiali e Metodi.

4,8 Tempo di permanenza nei pressi della parete laterale (Wall Time)

Gli animali sani tendenzialmente si spostano lungo la griglia con grande facilità esplorando tutto il territorio per cui il tempo di permanenza nei paraggi delle pareti laterali, che danno loro sicurezza è ridotto rispetto a quello degli animali che in seguito alla lesione con MPTP hanno problemi di coordinamento motorio. Questa ridotta sicurezza di spostamento laterale riduce la loro capacità esplorativa ed aumentano i tempi di permanenza presso il rifugio sicuro rappresentato dalla parete laterale.

Questo problema comportamentale è la conseguenza diretta della riduzione di livelli di dopamina nello striato in seguito alla lesione con la neurotossina MPTP.

Il trapianto di cellule T6 GFP nel modello murino indotto con MPTP è stato condotto in maniera precisa ed accurata e l'analisi del recupero motorio degli animali trapiantati e dei relativi controlli (MPTP e CTRL) è stata valutata a differenti giorni.

Il grafico evidenzia che nei giorni precedenti al trapianto delle T6GFP, la percentuale del WallTime degli animali che hanno subito la lesione con la neurotossina MPTP è significativamente maggiore rispetto agli animali controllo che non hanno ricevuto la tossina.

Nella figura 20 si può evidenziare come negli animali in cui è stata presente l'MPTP aumenti gradualmente la percentuale del tempo di parete per raggiungere il valore massimo dopo 9 giorni (dopo aver somministrato l'MPTP per 2 volte). Da notare grande e molta significativa differenza tra i controlli lesionati e non lesionati passando da meno del 5% per i controlli ad oltre il 35% per i lesionati con la neurotossina MPTP.

Nel gruppo verde al decimo giorno vengono somministrate le cellule T6, e come si può vedere, già al tredicesimo giorno, il tempo di permanenza attorno alla parete diminuisce in maniera molto significativa rispetto all'animale lesionato ed in questo gruppo, il tempo di permanenza oscilla tra il 25-35%.

Con il passare dei giorni il gruppo degli animali che hanno ricevuto le cellule T6, mostrano disinvoltura nello spostarsi ed una significativa riduzione del tempo di permanenza alla parete che si riduce con valori paragonabili al gruppo di controllo non lesionato che hanno un valore dell'ordine di circa il 5%.

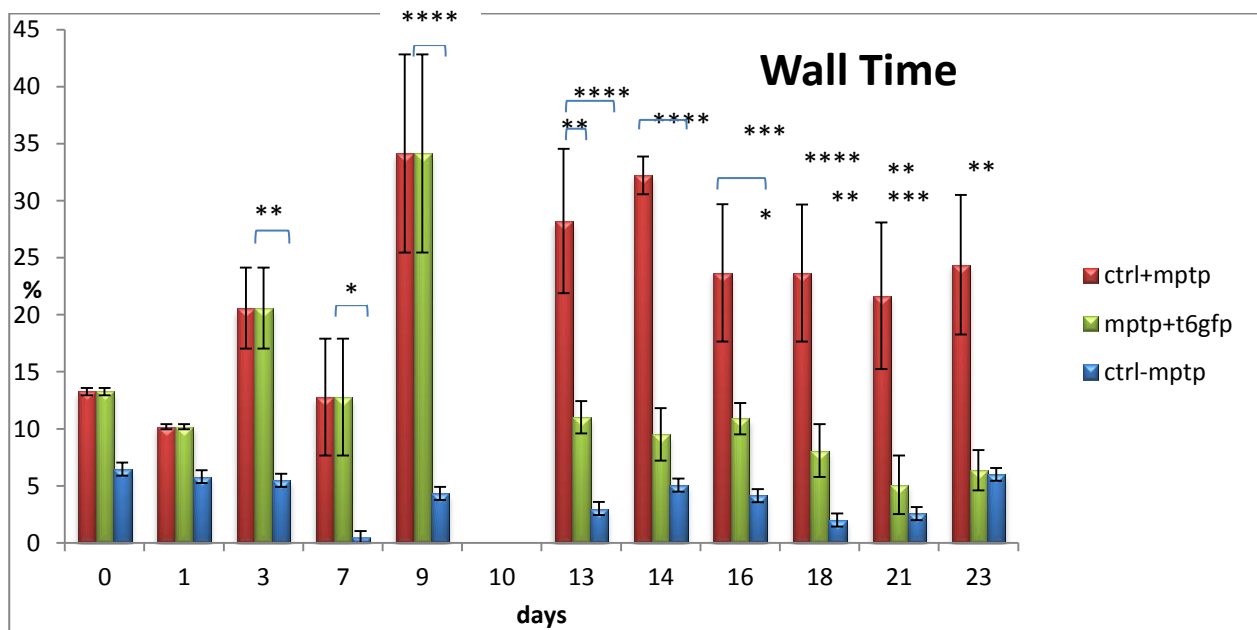


Figura 20: risultati del trapianto sul recupero motorio degli animali trattati con le cellule

4.9 Percent Forepaw Faults

La performance motoria degli animali trapiantati è stata valutata osservando anche la percentuale dei passi falsi delle zampe anteriori che compie l'animale che ha subito l'iniezione della neurotossina.

Il grafico evidenzia che nei giorni precedenti al trapianto intrastriatiale, la percentuale dei passi falsi degli animali lesionati è maggiore rispetto agli animali controllo che non hanno ricevuto la tossina. Come si può notare dall'istogramma sotto elencato, l'impianto delle cellule T6GFP, effettuato al giorno 10, ha determinato nei giorni successivi al trapianto un recupero motorio significativamente differente negli animali MPTP+T6GFP rispetto agli animali che hanno subito la lesione con la neurotossina MPTP. Inoltre l'analisi della performance motoria ha coinvolto la valutazione dei passi negativi (forepaw faults) ovvero il numero di passi delle zampe anteriori falliti dell'animale capovolto diviso per il numero totale dei passi delle zampe anteriori sulla griglia (vedi Materiali e Metodi). La percentuale dei passi negativi nei MPTP+T6GFP diminuisce raggiungendo valori paragonabili agli animali non lesionati, e questo recupero motorio rimane costante per tutto il periodo in cui vengono effettuati i test motori.

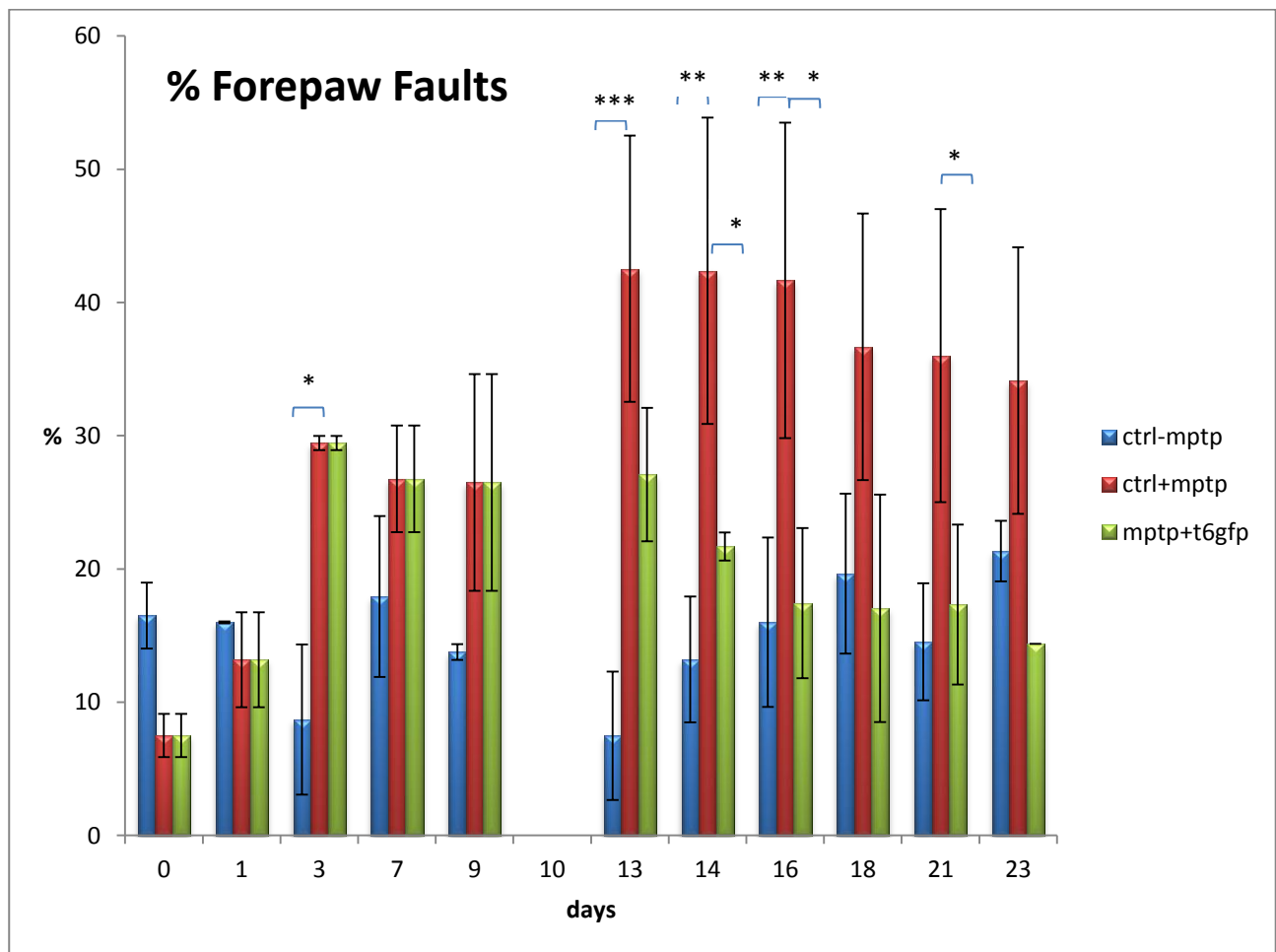


Figura 21: risultati del trapianto sul recupero motorio degli animali trattati con le cellule

4.10 Vertical Grid Test

La Vertical Grid Test, la cui metodica è stata descritta ampiamente nei materiali e metodi, ha arricchito i nostri risultati confermando quanto precedentemente descritto.

L'istogramma, sotto elencato, ha evidenziato che il tempo totale impiegato per scendere la griglia dai topi MPTP, misurato in secondi, è significativamente maggiore rispetto al tempo impiegato dell'animale che non ha subito alcuna lesione.

La figura 22 mostra come la lesione modifichi fortemente la capacità degli animali di controllare le loro azioni quando appesi alla griglia e la loro abilità nel girarsi ed a scendere.

Normalmente l'animale impiega 20 secondi a scendere e con il passare dei giorni tali valori diminuiscono ulteriormente.

Con la somministrazione di MPTP i valori aumentano sino a 160 secondi per poi scendere a 60 secondi 23 giorni.

L'applicazione delle cellule contrasta gradualmente questa ascensione tra il nono ed il sedicesimo giorno, per cui il tempo degli animali lesionati si mantiene sino al diciottesimo giorno, poi l'azione delle cellule si manifesta in maniera chiara nei test successivi al ventunesimo ed al ventitreesimo.

Questa valutazione comportamentale conferma i dati precedenti su un'azione neurotrofica protettiva a livello dello striato ad opera delle cellule trapiantate.

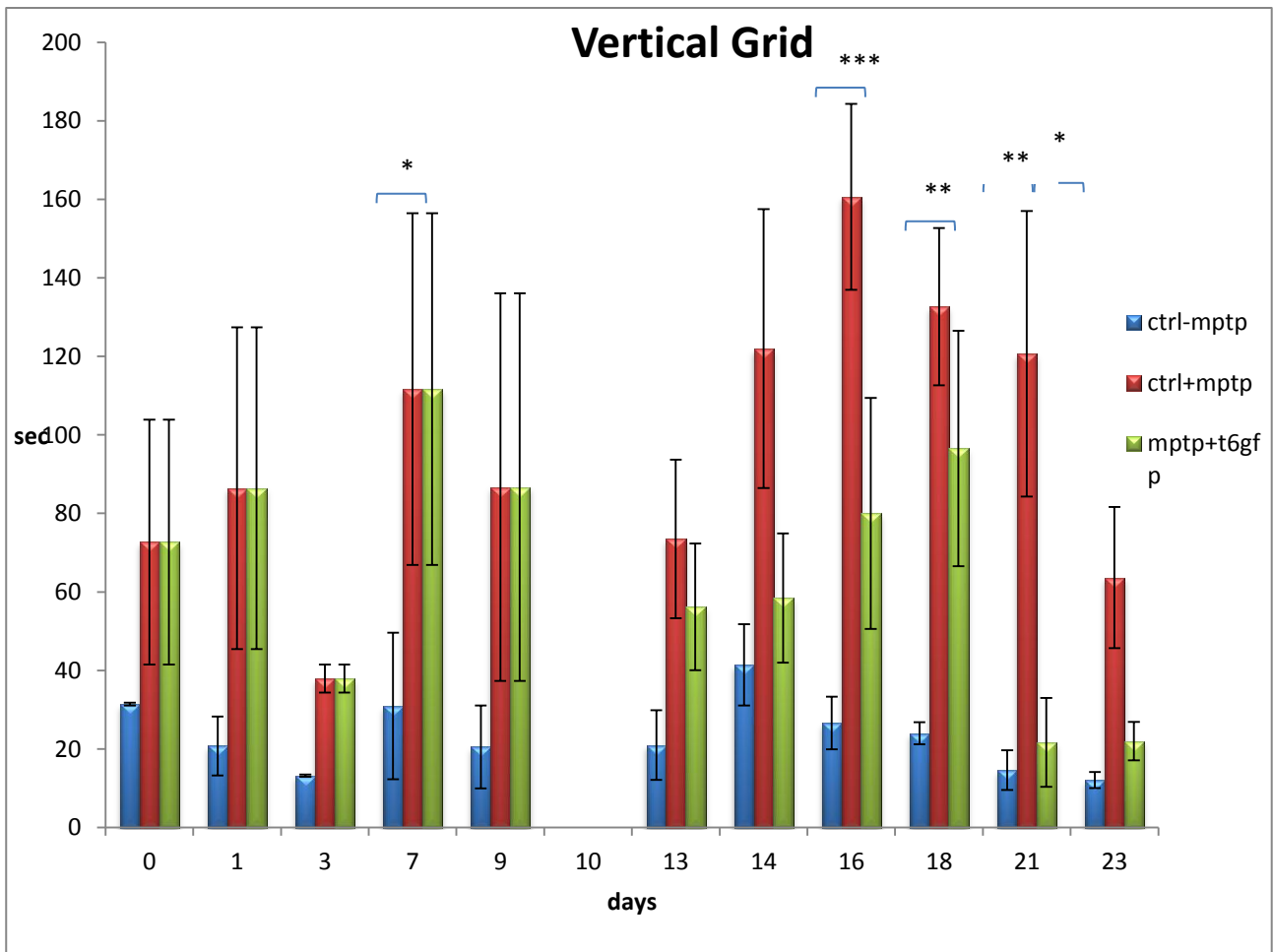


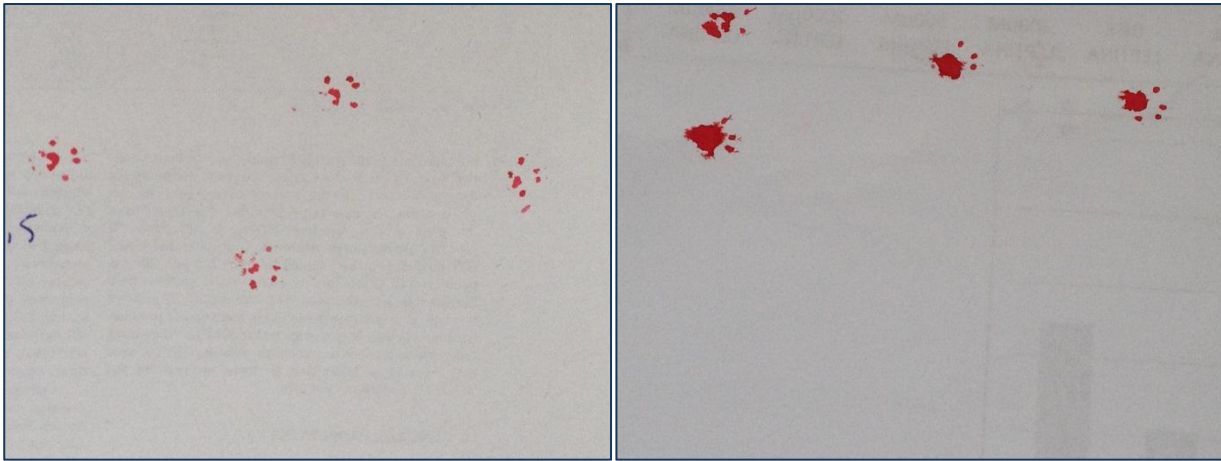
Figura 22: risultati del trapianto sul recupero motorio degli animali trattati con le cellule

4.11 Forepaw stride length during walking

La valutazione della lunghezza del passo degli arti anteriori conferma l'azione delle cellule T6 poichè di fatto, mentre l'animale non lesionato mantiene una lunghezza intorno ai 7 centimetri, quello lesionato da 7 a 4 centimetri, graduale nel tempo.

L'azione protettiva si osserva anche in questo caso al ventunesimo ed al ventitreesimo giorno.

Concludendo si può affermare che gli animali trapiantati in aggiunta ad un migliore controllo e spostamento lungo la griglia, sono in grado di migliorare anche il loro passo tendendo a raggiungere la normalità.



MPTP + T6GFP

MPTP

Figura 23: fotografie che evidenziano l'impronta delle zampe anteriori sia degli animali lesionati che di quelli in cui è stata eseguita la lesione e successivamente il trapianto cellulare.

Le immagini evidenziano una differenza sostanziale nella distribuzione del peso dell'animale sulle zampe anteriori durante il movimento. In particolare l'impronta dei topi MPTP risulta più marcata rispetto a quella dei topi MPTP+T6GFP.

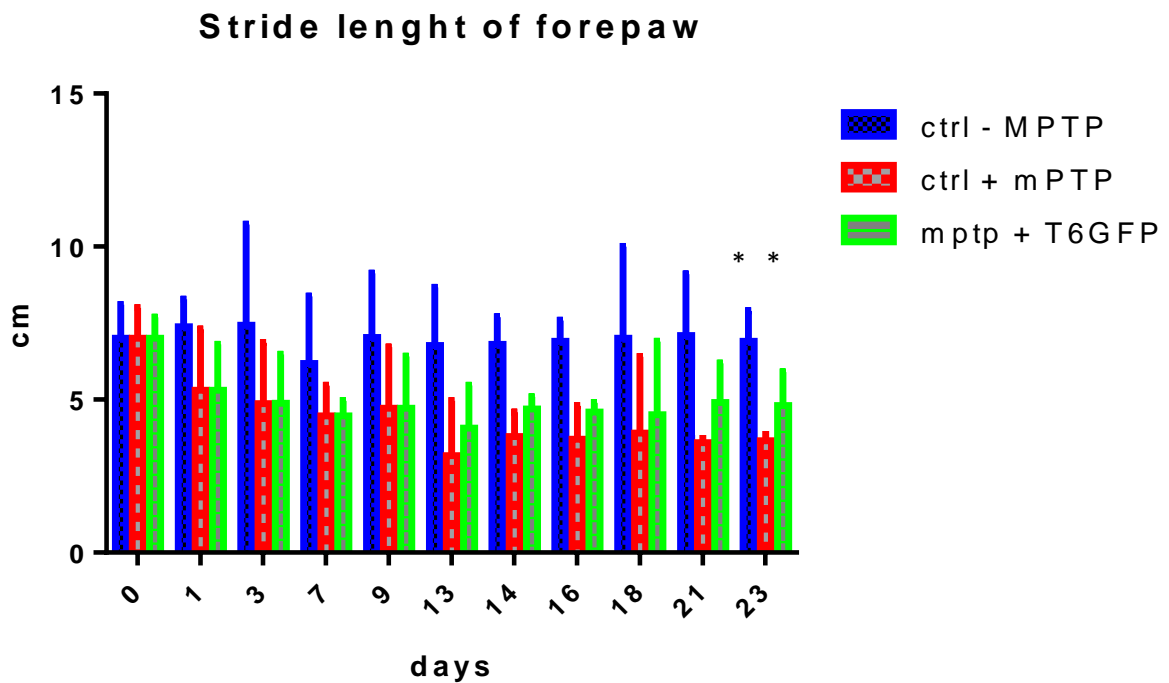


Figura 24 : risultati del trapianto sul recupero motorio degli animali trattati con le cellule

4.12 Struttura e posizionamento nel sito di lesione delle cellule T6GFP in seguito a trapianto intrastriatale

Dopo due settimane dal trapianto, gli animali utilizzati nei nostri esperimenti sono stati perfusi e dopo aver estratto l'encefalo, mediante l'utilizzo del criostato, sono state ottenute sezioni coronali, sezioni sagittali e sezioni trasversali permettendoci di studiare in maniera accurata la migrazione ed il differenziamento delle cellule T6-GFP in seguito al trapianto. È stato osservato che esse, in seguito all'impianto, sono situate all'interno o nell'immediate vicinanze dello striato, sono ben delimitate in gruppi, le cellule appaiono rotonde od ovali con una lunghezza della cellula di circa 30um e sono facilmente identificabili dal loro contenuto di GFP fluorescente.

Dopo il sacrificio, gli undici animali lesionati che hanno ricevuto il trapiantato con le cellule T6GFP, mostrano reattività verde fluorescente, tipico della presenza delle cellule GFP nel sito di lesione.

Il trapianto intrastriatale delle cellule T6 GFP in animali lesionati con l'MPTP pone la domanda di quale sia il loro destino nel modello parkinsoniano. La presenza di cellule verdi nel sito striatale a due settimane dalla somministrazione, è stata studiata mediante osservazione al microscopio confocale. Il segnale della marcatura osservata *in vivo*, ha permesso di individuare la presenza delle cellule T6GFP non solo nella zona di iniezione.

Le cellule T6GFP iniettate all'interno del nucleo striatale si localizzano con una gran percentuale nel sito di iniezione e questo è evidenziato nella figura 25 ove le cellule fluorescenti formano una striscia come ad indicare la striscia dell'ago che le ha iniettate.

All'apice di questa striscia, dopo immunostochimica, si osserva che una percentuale di queste è NG2 + (figura 26), mentre la figura 27, mostra come molte altre cellule siano diventate (MAP2) e quindi abbiano intrapreso destino neuronale.

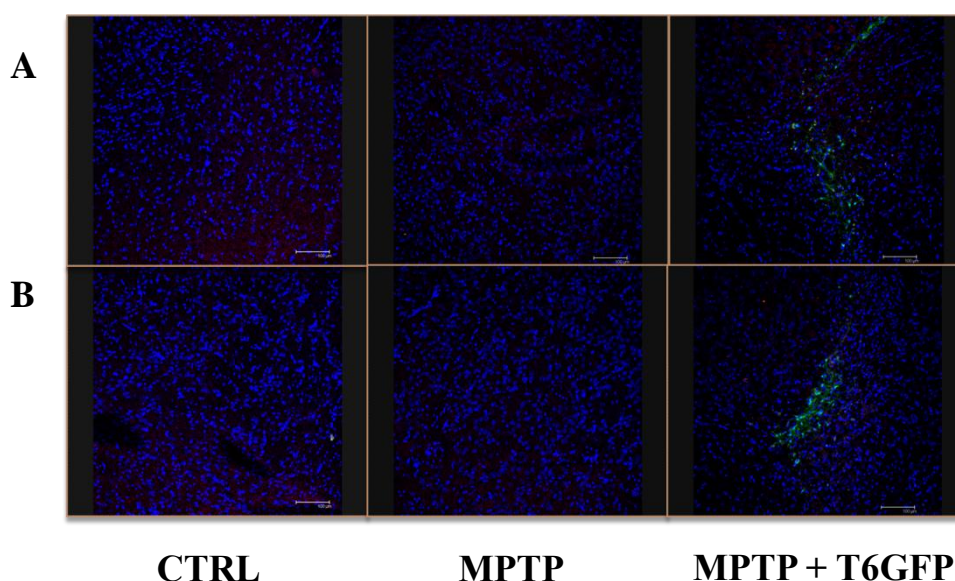


Figura 25: sezione coronale di encefalo di topo C57/bl in posizione striatale che evidenzia in verde le T6-GFP.

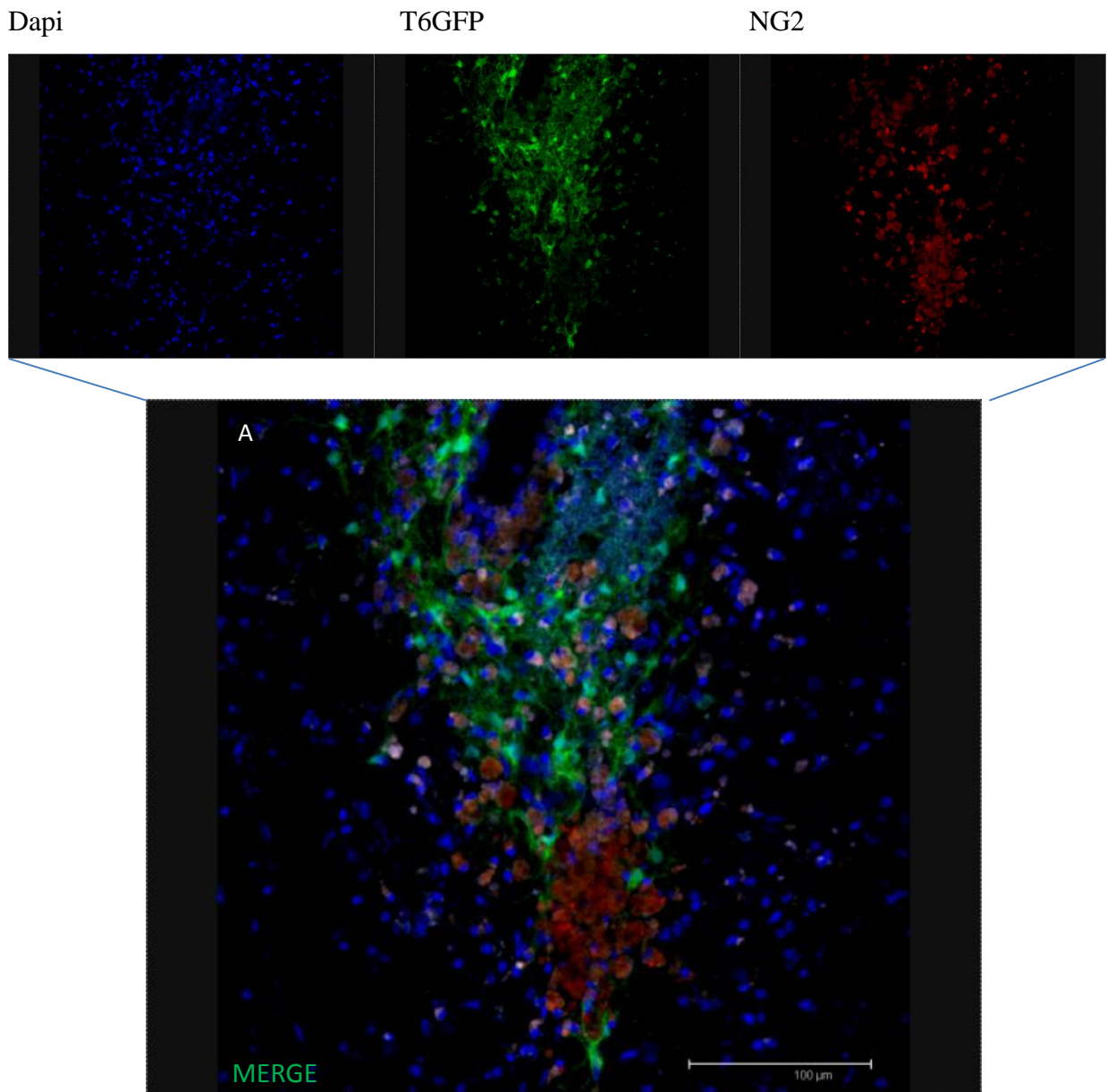


Figura 26: monostaining per NG2 (A), marker oligodendrocitario..

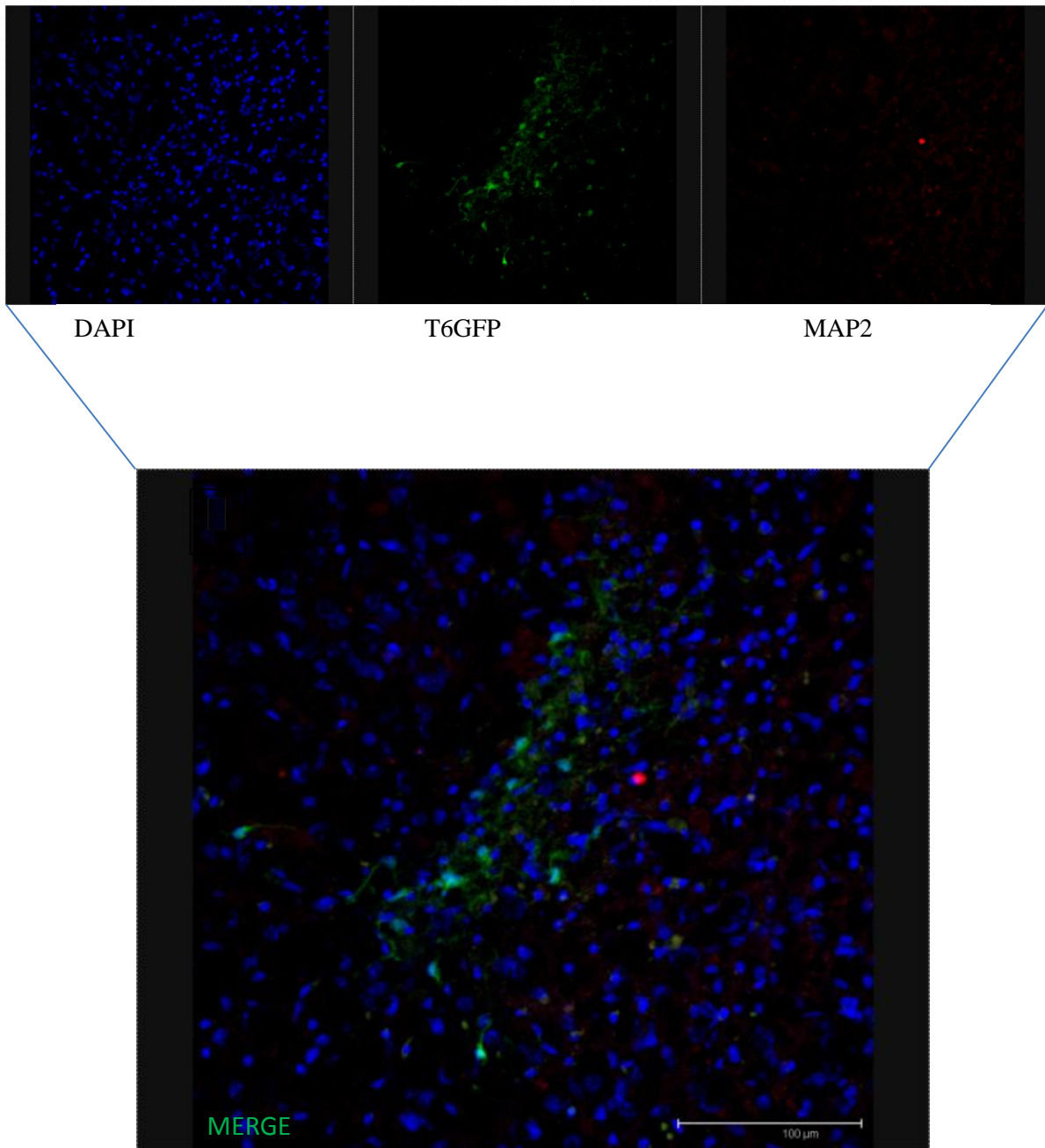


Figura 27: monostaining per MAP2, marker neuronale

Per quanto concerne la reattività delle cellule T6GFP, abbiamo osservato una positività maggiore all'anticorpo anti MAP2 (neuronal) pari al $56,22\% \pm 7,942$ rispetto alla marcatura effettuata con l'anticorpo anti NG2 $36,69 \pm 6,191$ (oligodendrocitario).

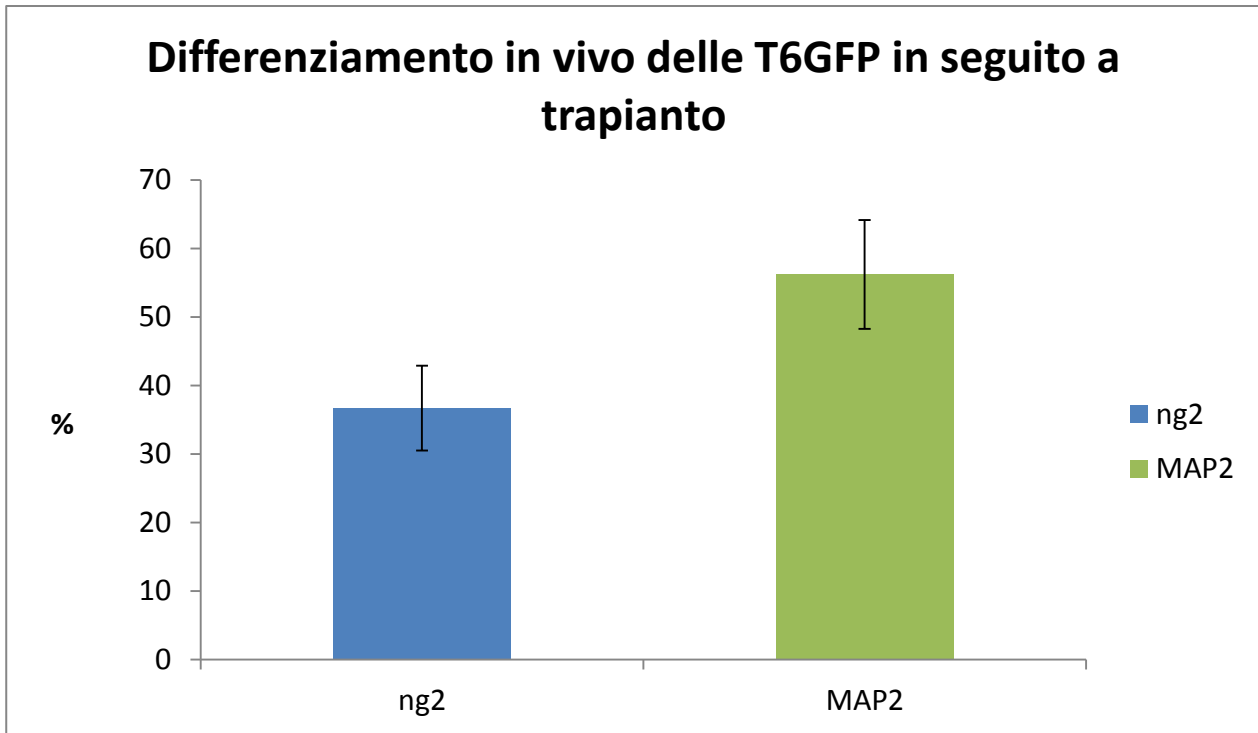


Figura 28: quantificazione in percentuale del differenziamento in vivo delle cellule trapiantate sul sito di lesione

Sapendo che la maggior parte delle cellule trapiantate nello striato differenziano maggiormente verso un destino neuronale (MAP2), questa percentuale ci ha suggerito di eseguire innumerevoli analisi immunohistochimiche condotte con anticorpi che marcano cellule neuronali specifici. Abbiamo trovato che un numero significativo di cellule impiantate sono positive per la tirosina-idrossilasi, indicando la conversione dei precursori cellulari post-mortem in cellule simili ai neuroni dopaminergici. Un maggior ingrandimento di un riquadro dell'immagine posizionata a sinistra, evidenzia che alcune cellule trapiantate presentano marcatura per Tirosina idrossilasi (enzima limitante della sintesi della dopamina): dunque, queste cellule pare che si siano differenziate in cellule catecolaminergiche.

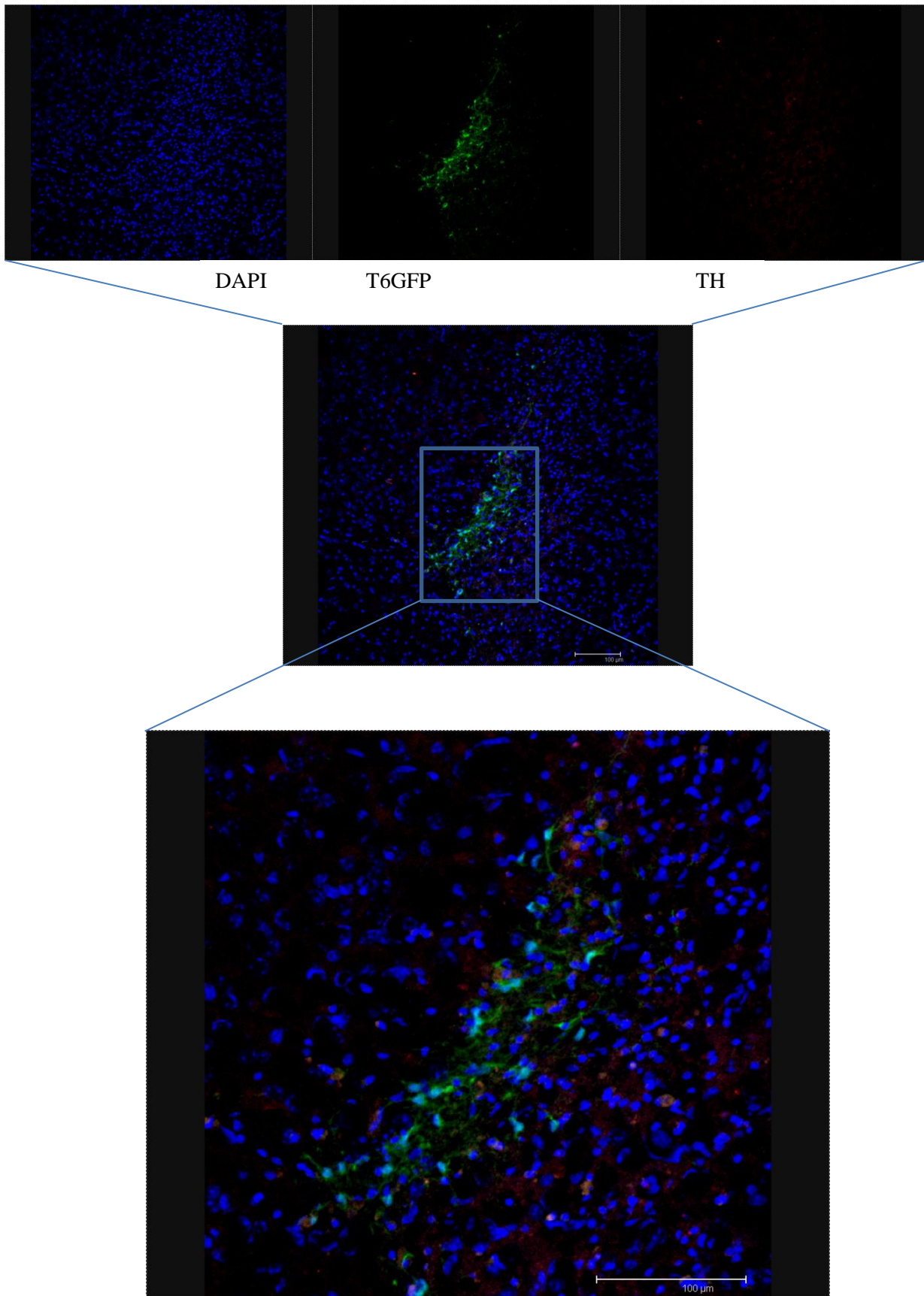


Figura 29: la loro abilità nel promuovere la rigenerazione delle vie nervose è testimoniata dalla marcata quantità di fibre catecolaminergiche positive in rosso per la TH. Il DAPI in blu indica i nuclei cellulari

Nella figura 29 si evidenzia come molte di queste cellule T6 siano positive all'anticorpo anti TH, indicando un destino differenziativo di tipo dopaminergico.

Da quanto osservato dalle immagini sopra elencate, sembra che le T6GFP, somministrate per via intrastriatale, raggiungono grazie allo stereotassico, specificatamente e in quantità significativa la lesione, dove si differenziano in cellule neurali.

Quindi, sembrerebbe che, le cellule staminali adulte iniettate, hanno originato una base adeguata alla rigenerazione dopaminergica attraverso l'iniezione intrastriatale.

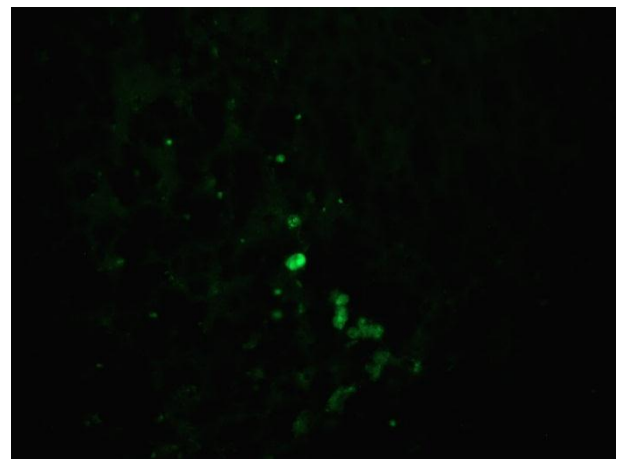
4.13 DAB sezioni coronali striato T6GFP/TH

Per confermare la marcatura delle cellule staminali T6GFP trapiantate su animali lesionati MPTP, è stata eseguita un'analisi immunoenzimatica su sezioni coronali di striato di topo. L'esame istologico del tessuto è avvenuto utilizzando l'Ab anti TH affiancato al cromogeno DAB .

È quindi ben noto che una buona percentuale delle cellule GFP TH+ trapiantate presenti nello striato sono di natura catecolaminergica.



TH-DAB



T6GFP

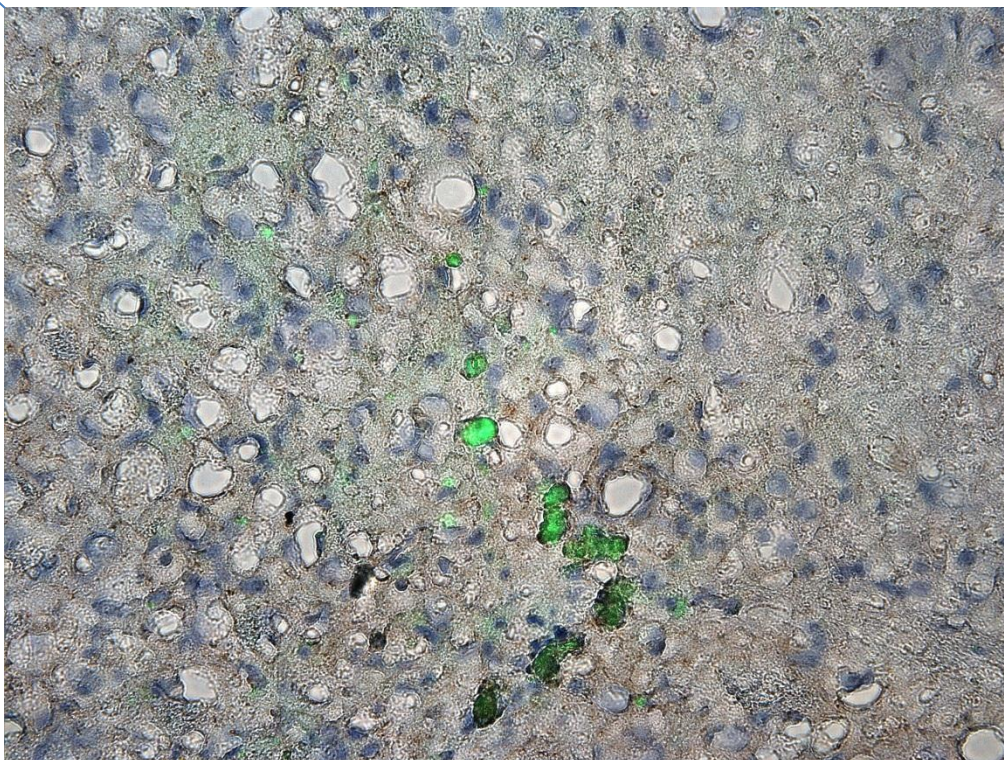


Figura 30: valutazione in vivo della presenza di cellule marcate mediante DAB, a due settimane dal trapianto nel sito di lesione. Colorazione TH (DAB); DAPI (blu); T6GFP (verdi). Il tondino in alto evidenzia una cellula che esprime il marcatore TH.

4.14 Sezioni coronali e sagittali ChAT

Inoltre, sapendo dalla neuroanatomia che nel neostriato vi sono anche cellule colinergiche, sono state condotte altre analisi realizzate sempre su sezioni di encefalo di topo, sia su sezioni coronali che sagittali, e hanno evidenziato che alcune cellule T6GFP situate lungo lo striato sono positive per l'enzima chiave della sintesi dei neuroni colinergici; particolarmente interessante è stato osservare che buona parte delle cellule T6GFP trapiantate esprimono questo importante enzima.

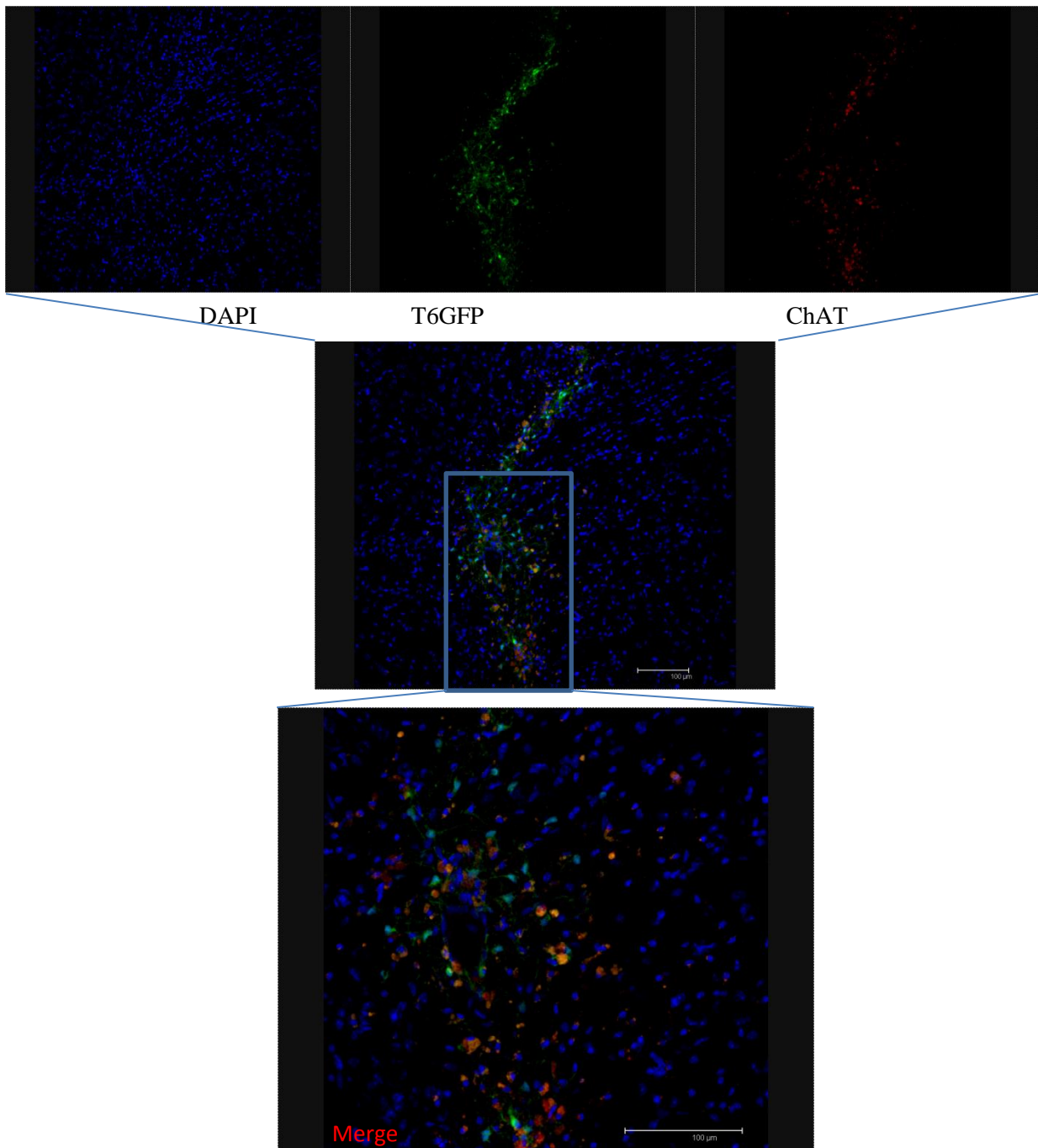


Figura 31: immagine fluorescente di sezione coronale striatale di topo. È possibile osservare ChAT in rosso e in verde le cellule T6GFP; la sovrapposizione delle due ne dimostra la coespressione

Sapendo che I neuroni dopaminergici della Substantia Nigra interagiscono con la parte dorsale dello striato: la neurodegenerazione di questi neuroni porta al parkinson, questi neuroni interagiscono con i neuroni gabaergici dello striato permettendo di modulare finemente il tono muscolare, i movimenti volontari e l'attenzione motoria.

Di conseguenza abbiamo eseguito immunocolorazioni con anticorpi anti GABA.

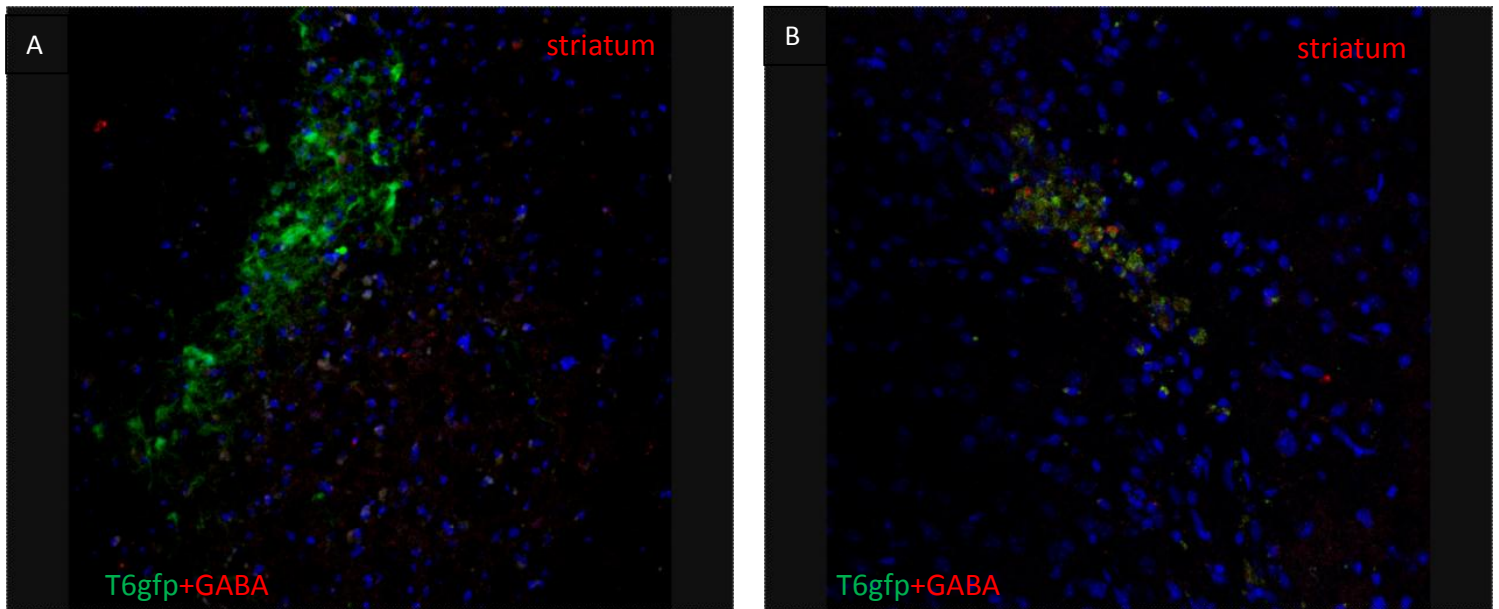


Figura 32: immagine fluorescente di sezione coronale (A) striatale di topo. È possibile osservare GABA in rosso e in verde le cellule T6GFP; la sovrapposizione delle due ne dimostra la coespressione; immagine fluorescente di sezione sagittale (B) striatale di topo. È possibile osservare GABA in rosso e in verde le cellule T6GFP; la sovrapposizione delle due ne dimostra la coespressione;

Particolarmente interessante è stato osservare che parte delle cellule T6GFP trapiantate esprimono il GABA.

4.14 Differenziamento in vivo T6GFP

La quantificazione delle cellule T6GFP positive per MAP2 ci hanno invitato ad eseguire la quantificazione sia per TH, per CHAT e per GABA, calcolando che TH e ChAT sono espresse nella metà delle cellule neuronali mature trapiantate.

I dati ottenuti suggeriscono un sinergismo dei due marcatori TH e ChAT nel differenziamento e nella migrazione delle cellule trapiantate anche se non sono state osservate differenze statisticamente significative ($P < 0,05$).

Il grafico sotto elencato rappresenta la media dei risultati ottenuti

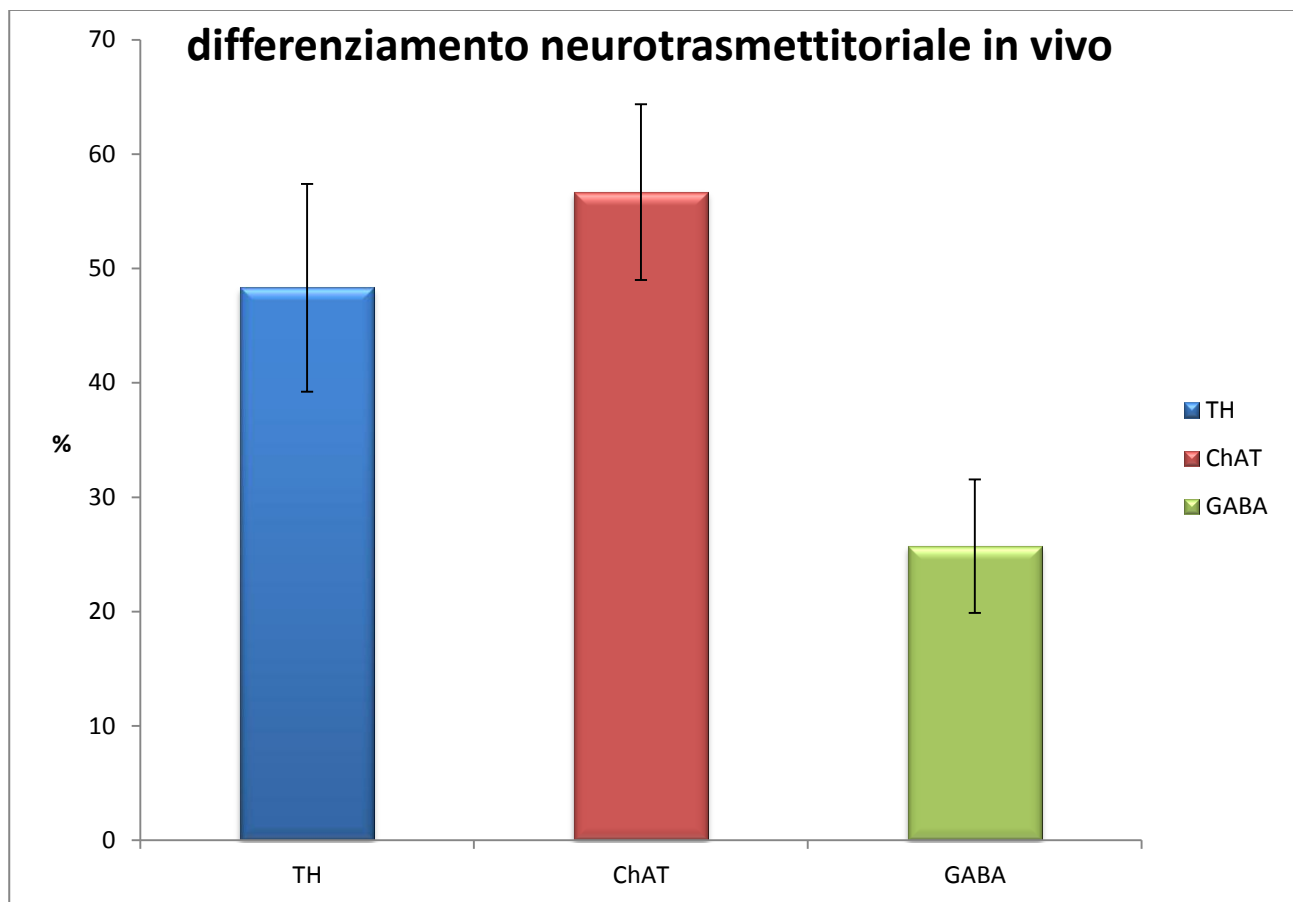


Figura 33: sottolinea la percentuale di cellule trapiantate marcate per MAP2, TH e ChAT.

4.15 Costruzione di sezioni sagittali e coronali per verificare la lunghezza della migrazione delle cellule trapiantate

Sulla base di questi risultati e dell'ipotesi che la migrazione cellulare in seguito al trapianto nello striato leso è conseguenza della lesione, è stata condotta un'ulteriore analisi immunohistochimica che ci ha permesso, grazie all'ausilio del microscopio confocale, di costruire con sezioni sagittali e coronali il percorso che hanno compiuto le cellule T6GFP in seguito al trapianto intrastriale. Le figure mostrano immagini che esibiscono la marcatura di TH in rosso e di GFP in verde di cellule T6GFP lungo lo striato.

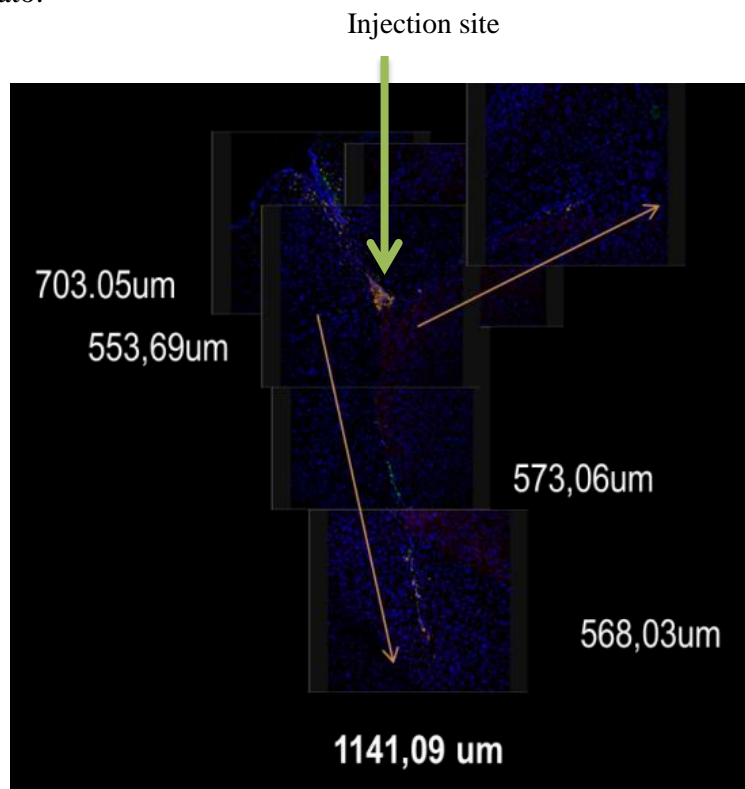


Figura 34: migrazione delle cellule trapiantate su sezioni sagittali, micrometri percorsi per sezione

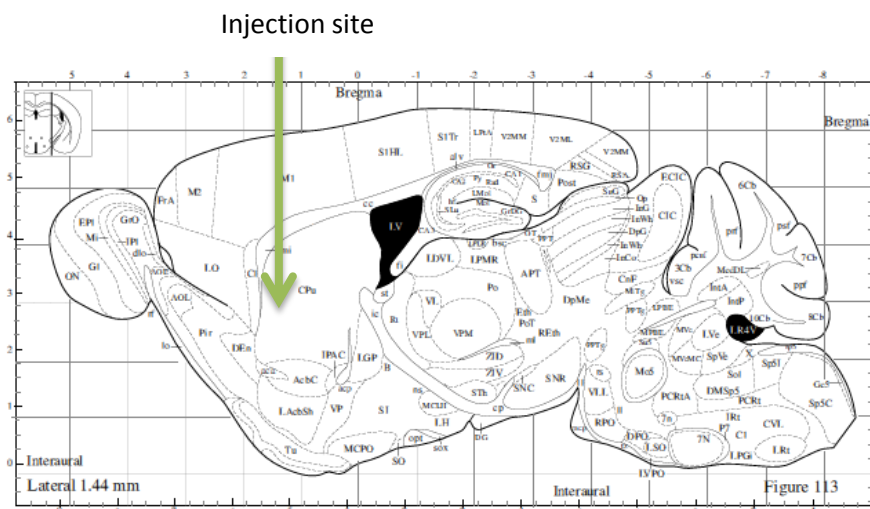


Figura 35: diagramma sagittale che evidenzia in nero il ventricolo laterale dell'encefalo di topo

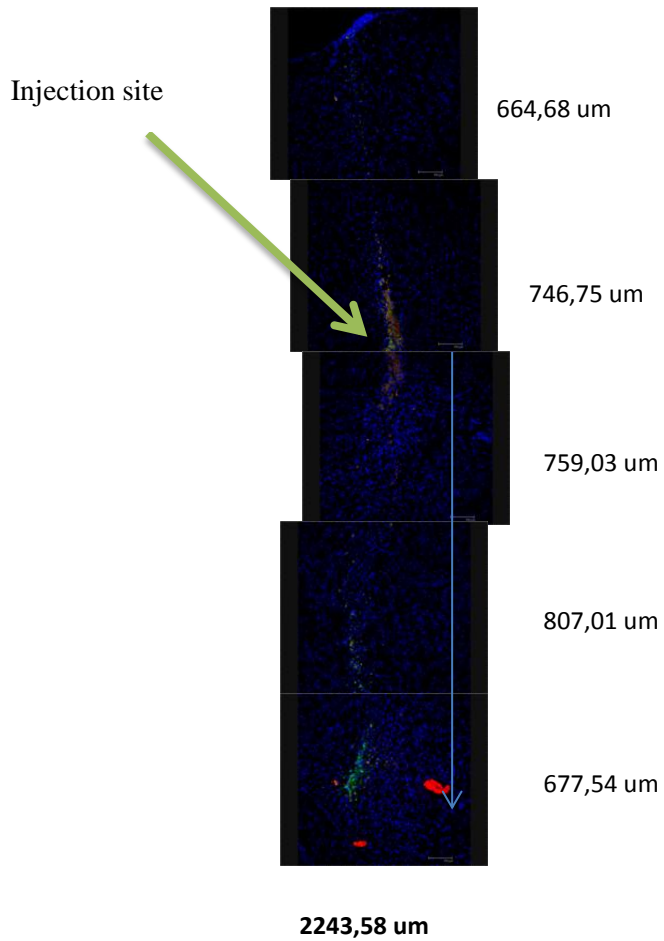


Figura 36: migrazione delle cellule trapiantate su sezioni coronali, micrometri percorsi per

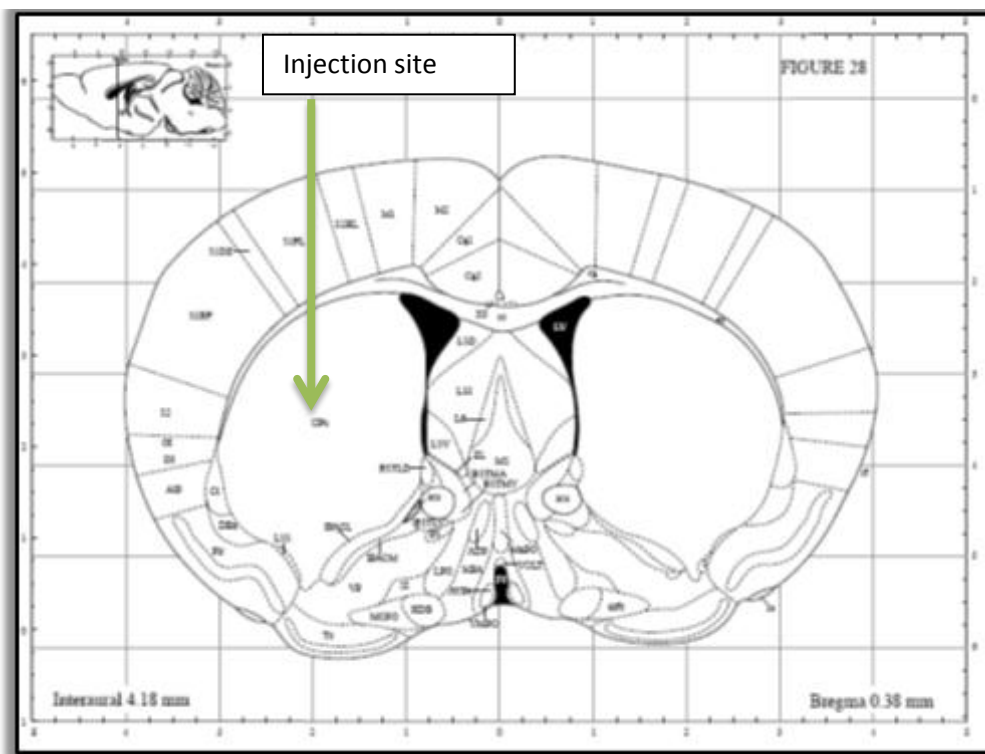


Figura 37: diagramma coronale che evidenzia I due striati di topo adiacenti ai due ventricoli laterali in nero.
 "the Mouse Brain in Stereotaxic Cordinates. George Paxinos and Keith B.J. Franklin.

4.16 Dab-TH ChAT red

Vista la complessità del sistema extrapiramidale, vista la versatilità delle cellule staminali T6GFP, avendo osservato in queste, successive al trapianto, equa reattività sia per TH che per ChAT, abbiamo voluto effettuare in ultimo una tripla immunoistochimica utile per discriminare meglio la marcatura delle cellule staminali trapiantate nel modello murino leso.

L'analisi al microscopio ha confermato i dati ottenuti precedentemente elencati, riassumendo: una buona parte delle cellule trapiantate è TH+(DAB) o ChAT+(Anti Goat Rosso); l'aspetto interessante è che alcune cellule di quelle iniettate sembra che esprimano sia la TH che la ChAT.

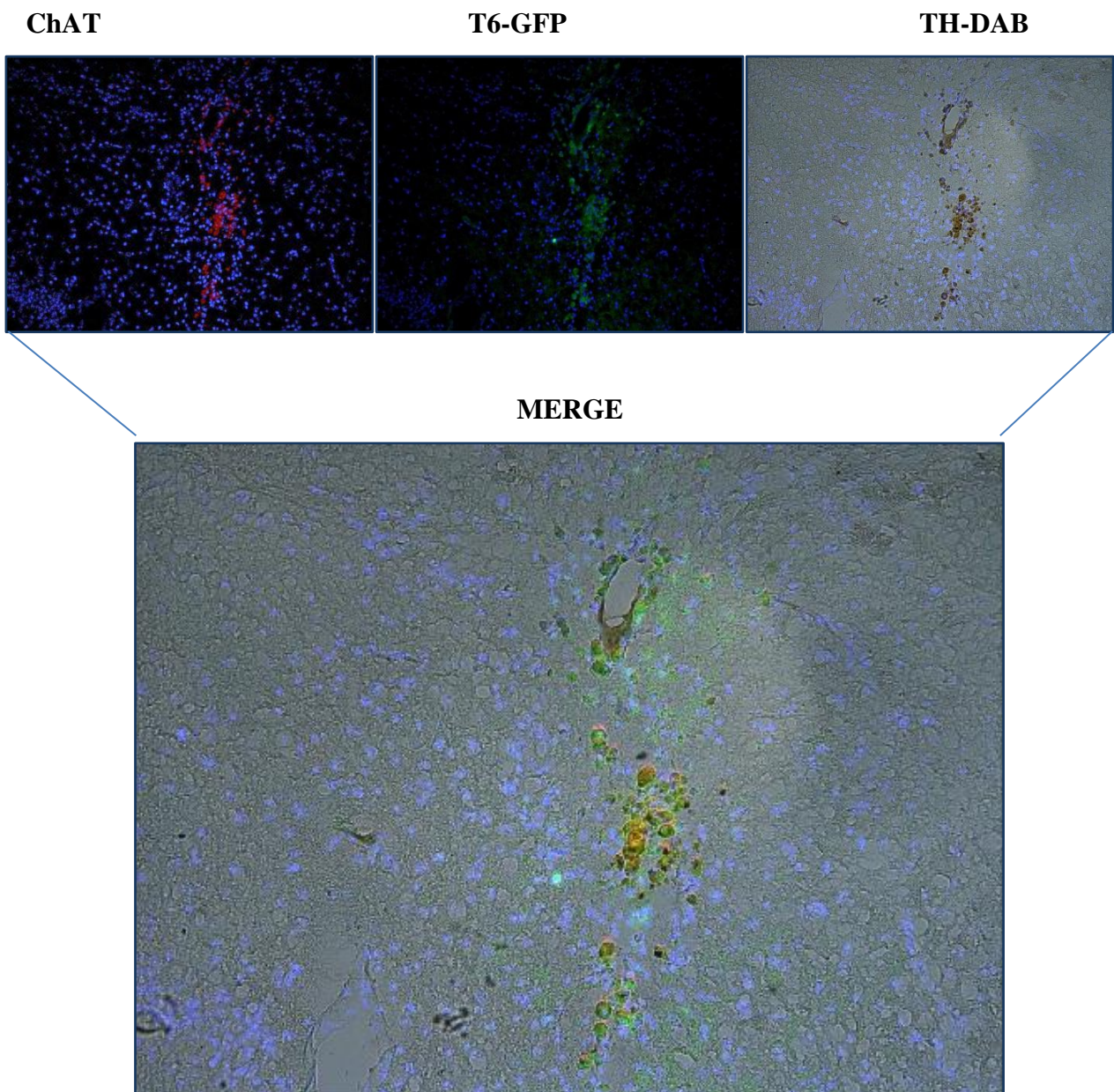


Figura 38: analisi immunoistochimica che evidenzia in verde le cellule T6GFP, in rosso le cellule ChAT positive, in marrone le cellule TH positive e in blu i nuclei cellulari (DAPI).

% T6GFP-Th % T6GFP- ChAT % TH-ChAT T6GFP

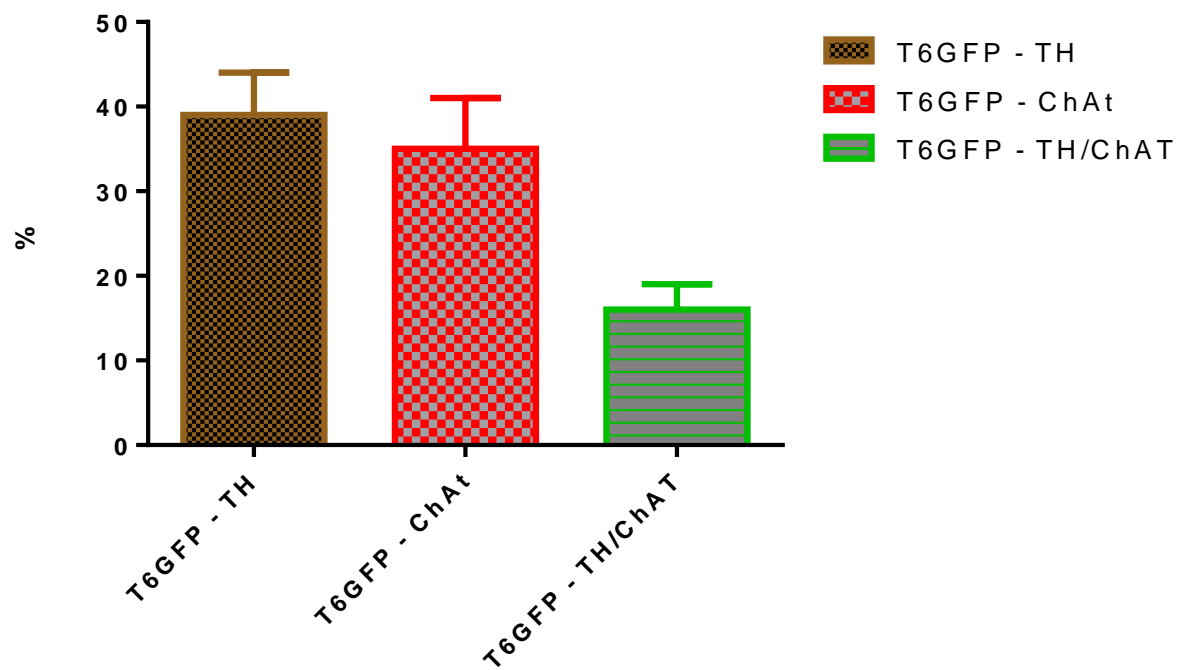


Figura 39: grafico che indica il differenziamento in vivo delle T6GFP verso un destino dopaminergico, acetilcolinergico o presenza di entrambi gli enzimi.

4.17 Migrazione delle cellule trapiantate T6gfp nel modello animale indotto con MPTP

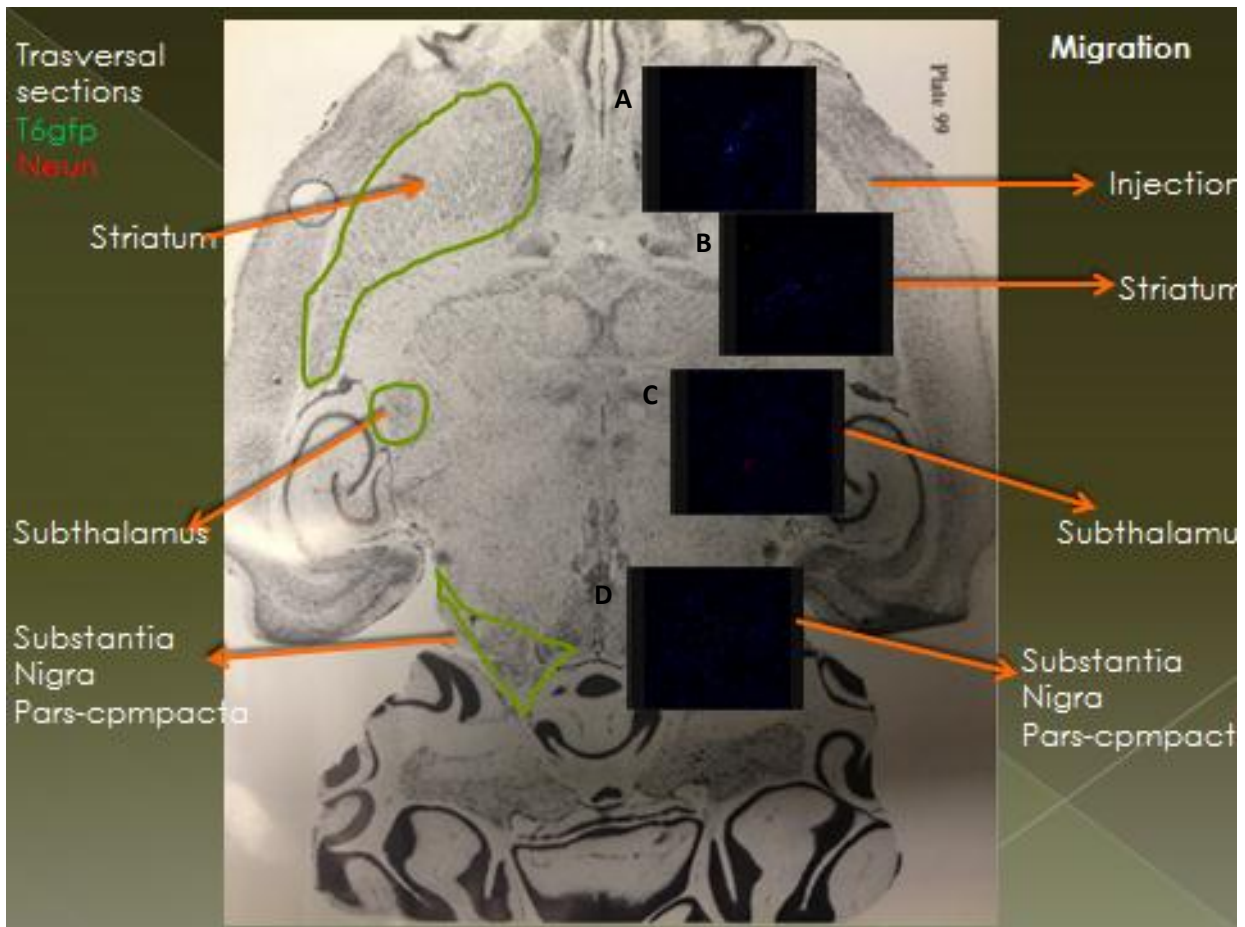


Figura 40: migrazione delle cellule trapiantate su sezioni trasversali, micrometri percorsi per sezione

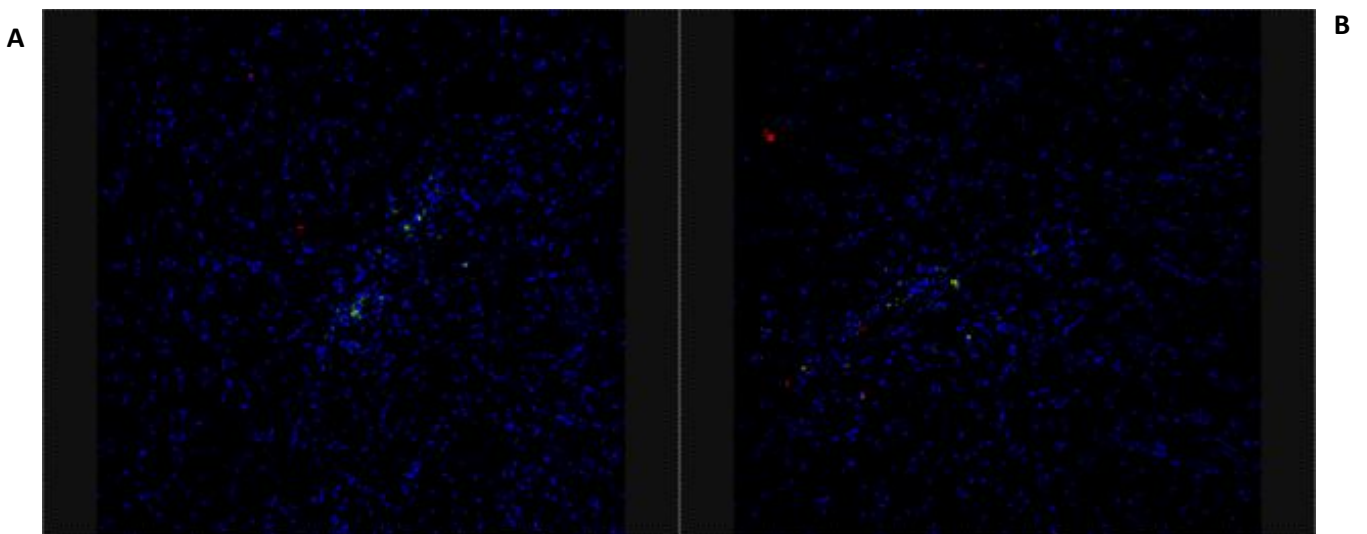


Figura 40A: Injection site;

Figura 40B: Striatum

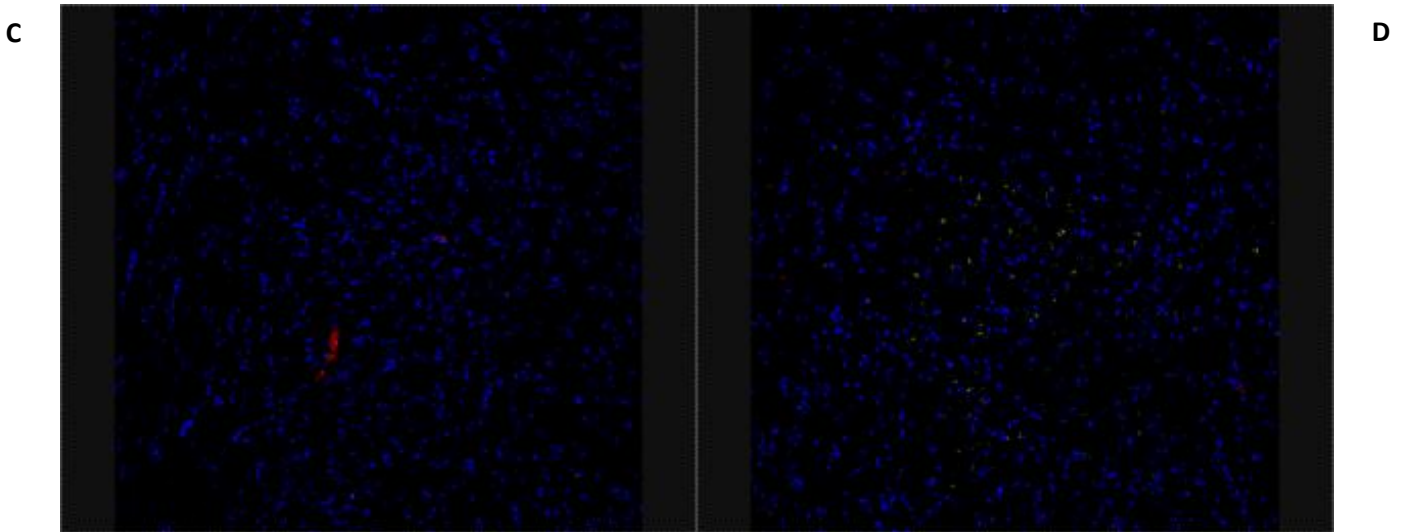


Figura 40C: Subthalamus

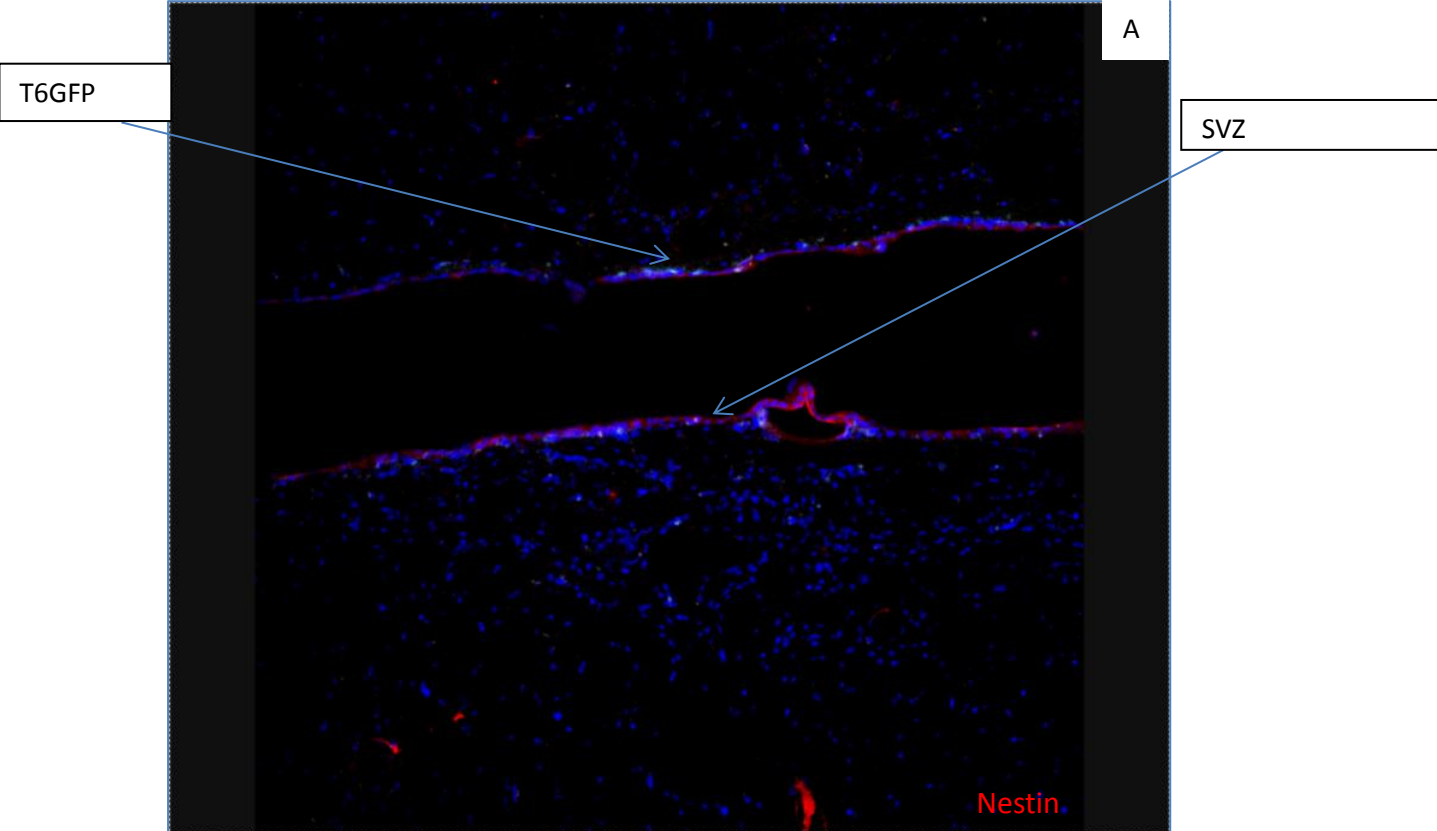
Figura 40D: SNpc

4.18 Le cellule trapiantate migrano lungo la parete laterale dei ventricoli laterali

La SVZ di roditori e primati contiene cellule capaci di generare nuovi neuroni. Neuroni dopaminergici della *substantia nigra pars compacta* proiettano i loro assoni nella SVZ controllandone proliferazione e migrazione (Hoglinger G.U et al., 2004).

Le cellule staminali della SVZ possiedono infatti i recettori dopaminergici D1L e D2L: in particolare le cellule di tipo A possiedono quelli di tipo D1L nella membrana plasmatica mentre quelle di tipo C nel citoplasma; il recettore D2L si trova invece sia nella membrana plasmatica che nel citoplasma delle cellule di tipo C. Questo recettore viene espresso in misura minore nella membrana plasmatica delle cellule di tipo A (Hoglinger G.U et al., 2004). La dopamina proveniente dalla *substantia nigra pars compacta* influirebbe sulla proliferazione delle cellule della SVZ interagendo con il recettore D2L. La formazione di nuovi neuroni sembrerebbe però essere compromessa, nel Parkinson sporadico, dalla drastica riduzione della dopamina (Hoglinger G.U et al., 2004). Nei primati, la degenerazione dei neuroni dopaminergici, indotta dalla neurotossina MPTP, compromette la proliferazione della aNSC (Freundlieb N. et al., 2006). Per determinare gli effetti terapeutici delle cellule post-mortem T6GFP, abbiamo effettuato un'ulteriore indagine a livello della nicchia neurogenica SVZ. Le nostre ricerche, indicano che in vivo, in seguito ad un immunostaining eseguito con un anticorpo anti nestina, marcatore specifico per le cellule staminali,

su sezioni trasversali di encefali MPTP trapiantati, analizzando la migrazione delle cellule esogene è stata osservata la presenza di T6GFP anche a livello della parete laterale dei ventricoli laterali.



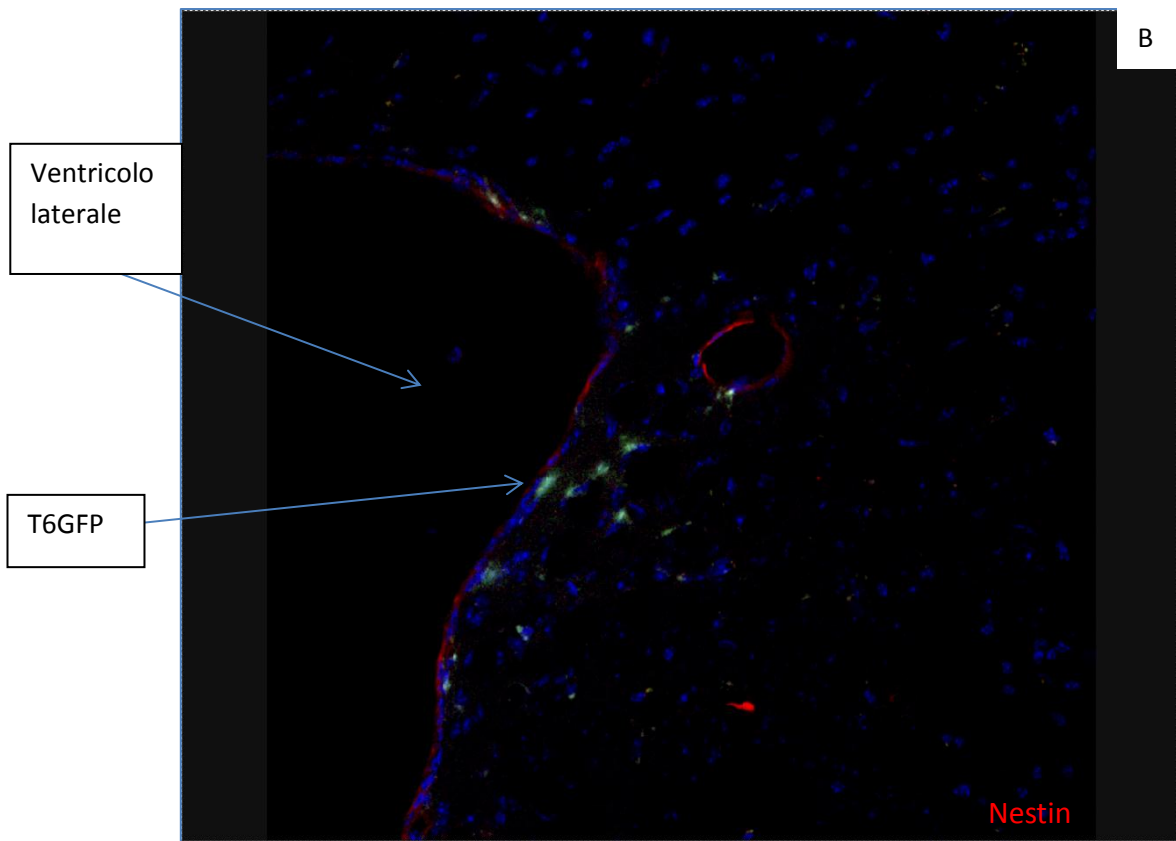


Figura 41: A & B presenza delle cellule staminali T6GFP alivello della parete laterale dei ventricoli laterali

5 DISCUSSIONE

Come indicato nell'introduzione, la letteratura che descrive i meccanismi alla base della neurodegenerazione ad esso conseguenti è alquanto robusta e numerosa.

Nonostante le migliaia di pubblicazioni riportate ad oggi, rimane evidente la necessità di individuare delle terapie adeguate e migliorare i processi degenerativi e favorire la rigenerazione neurale.

Nel nostro laboratorio, ad esempio, è stato riportato che l'eritropoietina, che viene riprodotta nel SNC quando la tensione di ossigeno scende, è in grado di prevenire la degenerazione secondaria e favorire il recupero motorio dopo lesione traumatica del midollo spinale.

Più recentemente avevamo anche identificato una popolazione di cellule staminali adulte prelevate dall'SVZ che sono in grado di rilasciare l'eritropoietina.

La ricerca di queste cellule aveva motivo, per il fatto ampiamente dimostrato in letteratura che le cellule staminali embrionali e adulte, una volta raggiunto il sito di lesione, sopravvivono per un periodo limitato per poi morire fagocitate dai macrofagi.

Proprio per cercare cellule staminali prodotte in condizioni così difficili ed estreme, abbiamo analizzato l'SVZ prelevata da topi a varie ore dalla morte come descritto nella prima parte della sezione dei risultati. Le cellule staminali derivate in questa condizione possono differenziare in una maggiore percentuale di neuroni se la coltura cellulare è preparata con una densità di circa 30000 cellule per pozzetto.

Queste particolari cellule staminali sono in grado di migrare e di differenziare in neuroni come mostrato dalla marcatura con PCNA e DCX. Se il differenziamento viene eseguito in vitro, queste cellule formano neuroni e tale processo è dipendente dal rilascio di eritropoietina, poiché il fenomeno è prevenuto dalla presenza di anticorpi anti EPO o anti-EPOR (Marfia et al.,2011).

Conoscendo questa abilità nel formare neuroni, abbiamo dimostrato in questo progetto di tesi che si verifica anche in vivo all'interno del SNC.

Non solo queste cellule sono in grado di differenziarsi in potenziali neuroni dopo trapianto, ma successivamente, come osservato nel loro sviluppo fisiologico nell' SVZ, sono in grado di migrare.

Queste cellule staminali neurali postmortem dopo somministrazione, differenziano e sono in grado di sintetizzare neurotrasmettitori come dopamina, acetilcolina e GABA, grazie alla neoespressione degli enzimi necessari alla loro sintesi come rispettivamente sono la tirosina idrossilasi e l'acetilcolintrasferasi. Il 20% delle cellule TH+ contengono anche la ChAT, quindi probabilmente sono in una situazione di destino transitorio oppure la stessa cellula sintetizza entrambi i neurotrasmettitori. La migrazione è estremamente importante e significativa. Nei nostri dati

abbiamo mostrato come le nostre cellule migrino per centinaia di micrometri dal sito di iniezione situato nella porzione mediana del corpo striato fino a raggiungere gradualmente la Substantia Nigra e l'Area Tegmentale Ventrale.

Il fenomeno morfologico e migratorio si attua in circa due settimane dalla somministrazione, mentre l'effetto sui sintomi tipo malattia di Parkinson, causati dalla neurotossina MPTP, vengono osservati ben più rapidamente.

L'azione valutata nei tempi di permanenza vicino alla parete dell'orizzontal grid test, indicano un'azione molto significativa che si manifesta entro i primissimi giorni. Mentre l'azione di discesa nella vertical grid test si osserva negli 8-10 giorni successivi al trapianto. Abbiamo così un effetto farmacologico sui sintomi comportamentali causati dalla neurotossina MPTP estremamente rapidi, a cui seguono la migrazione cellulare che si attua con una maggiore gradualità. E' quindi nostra ipotesi pensare che queste cellule T6 possano sviluppare un'azione positiva attraverso due diversi meccanismi:

1-Rapido, di tipo neurotrofico sul comportamento animale, che si manifesta rapidamente con il ristabilimento delle funzionalità del sistema extrapiramidale.

2-Lento, legato al rimodellamento dei circuiti nervosi.

In conclusione pensiamo che l'azione rapida di tipo neurotrofico e protettivo promuova il recupero delle funzionalità dopaminergiche residue dall'MPTP, che in seguito alla iniezione della neurotossina, non erano in grado di funzionare.

Il trapianto delle T6GFP ha permesso a queste cellule di recuperare le loro funzionalità e grazie a questo, ridare all'animale un'attività sul controllo motorio vicino alla normalità.

Le ricerche tenderanno a capire quale siano i meccanismi alla base di questo rapido recupero funzionale e quale sia il destino delle cellule T6 maturate in neuroni e migranti lungo l'asse nigrostriatale.

6 BIBLIOGRAFIA

Adan Aguirre, Maria E. Rubio, and Vittorio Gallo

“Notch and EGFR pathway interaction regulates neural stem cell number and self-renewal”

Nature, 2010 September 16; 467 (7313): 323-327, doi:10.1038/nature09347

Alberi, L., Sgado, P. & Simon, H. H (2004).

Engrailed genes are cell-autonomously required to prevent apoptosis in mesencephalic dopaminergic neurons.

Development **131**, 3229-3236.

Albin RL, Young AB, Penney JB.

The functional anatomy of basal ganglia disorders.

Trends Neurosci 1989, 12: 366-375.

Altman J, Das GD.

Post-natal origin of microneurons in the rat brain.

Nature. 1965 Aug 28;207(5000):953-6

Altman J.

Proliferation and migration of undifferentiated precursor cells in the rat during postnatal gliogenesis.

Exp Neurol. 1966 Nov;16(3):263-78

Altman J.

Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb.

J Comp Neurol. 1969 Dec;137(4):433-57

Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O.

Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke.

Nat Med. 2002 Sep; 8(9):963-70. Epub 2002 Aug 5.

Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, MacKenzie ET, Petit E.

“A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice.”

J Cereb Blood Flow Metab. 1999 Jun; 19(6):643-51

Blandini F, Nappi G, Tassorelli C and Martignoni E (2000)

Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease.

Prog Neurobiol 62: 63-88.

Blaschko, H.

Amine oxidase. In: Boyer, P.D., Lardy, H. and Myrbäck, K. (Eds), *The Enzymes*, 2nd edn, vol. 8, Academic Press, New York, 1963, pp. 337–351.

Alvarez-Buylla A, García-Verdugo JM, Tramontin AD.

A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells.

Nat Rev Neurosci. 2001 Apr;2(4):287-93. Review.

Callahan, C. A. and Thomas, J. B. (1994).

Tau-beta-galactosidase, an axon targeted fusion protein.

Proc Natl Acad Sci U S A, 91(13):5972-5976

Capela A, Temple S.

LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal.

Neuron. 2002 Aug 29;35(5):865-75.

Chiasson BJ, Tropepe V, Morshead CM, van der Kooy D.

Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cells characteristics.

J Neurosci. 1999 Jun 1;19(11):4462-71.

Chieh-Sen Chuang, Hong-Lin Su, Fu-Chou Cheng, Shan-Hui Hsu, Chi-Fen Chuang, Chin-San Liu.

Quantitative evaluation of motor function before and after engraftment of dopaminergic neurons in a rat model of parkinson's disease.

Journal of Biomedical Science 2010, 17:9

Coyle JT and Puttfarcken P (1993)

Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders.

Science 262:689-695.

Dahlstrom, A, Fuxe, K, (1964).

Evidence for the existence of monoaminecontaining neurons in the central nervous system: I.

Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurones.

Acta Physiol Scand 62:1–55.

Day M, Wang Z, Ding J, An X, Ingham C, Shering AF, Wokosin D, Ilijic E, Sun Z, Sampson AR, Mugnaini E, Deutch AY, Sesack SR, Arbuthnott GW, Surmeier DJ (2006)

Selective elimination of glutamatergic synapses on striatopallidal neurons in Parkinson disease models. Nature Neurosci 9:251-259.

Deutch AY (2006)

Striatal plasticity in parkinsonism: dystrophic changes in medium spiny neurons and progression in Parkinson's disease.

J Neural Transm 70:67-70 (Suppl).

Doetsch F, Alvarez-Buylla A.

Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain

Proc Natl Acad Sci USA. 1996 Dec 10;93(25):14895-900

Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A.

Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain.

J Neurosci. 1997 Jul 1;17(13):5046-61

Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A.

Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Sep 28;96(20):11619-24.

Doetsch F, Caillé I, Lim DA, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A.

Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain.

Cell. 1999 Jun 11;97(6):703-16.

Doetsch F, Petreanu L, Caille I, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A.

EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells.

Neuron. 2002 Dec 19;36(6):1021-34.

Dev KK, Hofele K, Barbieri S, Buchman VL, Putten H Van Der (2003)

Part II: alpha-synuclein and its molecular pathophysiological role in neurodegenerative disease.

Neuropharmacology 45:14-44.

Di Monte DA (2003)

The environment and Parkinson's disease: is the nigrostriatal system preferentially targeted by neurotoxins? Lancet Neurol 2:531-538.

Veronica Francardo, Alessandra Recchia, Nataljia Popovic, Daniel Andersson, Hans Nissbrandt, M. Angela Cenci.

Impact of the lesion procedure on the profiles of motor impairment and molecular responsiveness to L-DOPA in the 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease.

Neurobiology of Disease 42 (2011) 327-340

Frank MJ, Samanta J, Moustafa AA, Sherman SJ (2007)

Hold your horses: impulsivity, deep brain stimulation, and medication in Parkinsonism.

Science 318:1309-1312.

Gritti A, Parati EA, Cova L, Frolichsthal P, Galli R, Wanke E, Faravelli L, Morassutti DJ, Roisen F, Nickel DD, Vescovi AL.

Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor

J Neurosci. 1996 Feb 1;16(3):1091-100. rowth factor.

Kanako Nakaguchi, Hiroshi Masuda, Naoko Kaneko, and Kazunobu Sawamoto

“Strategies for Regenerating Striatal Neurons in the Adult Brain by Using Endogenous Neural Stem Cells”

Neurology Research International Volume 2011, Article ID898012, 10pages

doi:10.1155/2011/898012

Hermosura MC, Cui AM, Go RCV, Davenport B, Shetler CM, Heizer JW, Schmitz C, Mocz G, Garruto RM, Perraud A-L (2008)

Altered functional properties of a TRPM2 variant in guamanian ALS and PD.

PNAS 105(46):18029-18034.

Holtzer H, Okayama M, Biehl J, Holtzer S.

Chondrogenesis in chick limb buds and somites.

Experientia. 1978 Mar 15;34(3):281-4.

Iribe Y, Moore K, pang KC and Tepper JM (1999)

Subthalamic stimulation-induced synaptic responses in substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons in vitro.

J Neurophysiol 82:925-933.

Kukekov VG, Laywell ED, Suslov O, Davies K, Scheffler B, Thomas LB, O'Brien TF, Kusakabe M, Steindler DA.

Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain.

Exp Neurol. 1999 Apr;156(2):333-44.

Laywell ED, Rakic P, Kukekov VG, Holland EC, Steindler DA.

Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Dec 5;97(25):13883-8.

LEBLOND CP.

CLASSIFICATION OF CELL POPULATIONS ON THE BASIS OF THEIR PROLIFERATIVE BEHAVIOR.

Natl Cancer Inst Monogr. 1964 May;14:119-50.

Li Zhang, Michael Chopp, Rui Lan Zhang, Lei Wang, Jing Zhang, Ying Wang, Yier Toh, Manoranjan Santra, Mei Lu, Zheng Gang Zhang

“Erythropoietin Amplifies Stroke-Induced Oligodendrogenesis in the Rat”

PloS ONE June 2010, vol.5, Issue 6, e11016

Lois C, Alvarez-Buylla A.

Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain

Science. 1994 May 20; 264 (5162):1145-8

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. (1951).

Protein measurement with the Folin phenol reagent.

J Biol Chem 193, 265-275.

Luskin MB.

Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone.

Neuron. 1993 Jul; 11(1):173-89

Lynch D, Wanglund C, Spathis R, Chan CW, Reiff DM, Lum JK, Garruto RM (2008)

The contribution of mitochondrial dysfunction to a gene-environmental model of Guamanian ALS and PD. Mitochondrion 8:109-116.

M. Lundblad, B. Picconi, H. Lindgren, and M.A. Cenci.

A model of L-DOPA-induced dyskinesia in 6-hydroxydopamine lesioned mice: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function.

Neurobiology of Disease 16 (2004) 110-123

Marfia G., Bottai D., Madaschi L., Marra F., Menarini M., Formenti A., Bellardita C., DiGiulio A.M., Carelli S. and Gorio A.

Erythropoietin- Dependent Differentiation of Death Resistant Neural Progenitors.

J. Of Neurosci 2009,

Maries E, Dass B, Collier TJ, Kordower JH, Steece-Collier K (2003)

The role of alpha-synuclein in Parkinson's disease: insights from animal models.

Nat Rev Neurosci 4:727-738.

McDonald JW, Becker D, Holekamp TF, Howard M, Liu S, Lu A, Lu J, Platik MM, Qu Y, Stewart T, Vadivelu S. (2004).

Repair of the injured spinal cord and the potential of embryonic stem cell transplantation.

J Neurotrauma Vol. 21 p.383-393.

McNaught KS, Perl DP, Brownell AL, Olanow CW (2004)

Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease.

Ann Neurol 56(1):149-162.

Merkle FT, Tramontin AD, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A.

Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Dec 14;101(50):17528-32. Epub 2004 Dec 1.

Mink, J. W. and Thach, W. T. (1993).

Basal ganglia intrinsic circuit sand their role in behavior.

Curr. Opin. Neurobiol. 3, 950-957.

Morshead CM, van der Kooy D.

A new 'spin' on neural stem cells?

Curr Opin Neurobiol. 2001 Feb;11(1):59-65. Review.

Mudanna S. Rao and Ashok K. Shetty

“Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus.”

European Journal of Neuroscience, Vol.19, pp. 234-246, 2004

Neely MD, Schmidt DE, Deutch AY (2007).

Cortical regulation of dopamine depletion-induced dendritic spine loss in striatal medium spiny neurons. Neuroscience 149:457-464.

Nicklas WJ, Vyas I, Heikkila RE (1985)

Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine.

Life Sci 36(26):2503-2508.

Ohab JJ, Fleming S, Blesch A, Carmichael ST.

“A neurovascular niche for neurogenesis after stroke”.

J Neurosci.2006 Dec 13;26(50):13007-16

Oscar Gonzalez-Perez, Arturo Alvarez-Buylla

“Oligodendrogenesis in the subventricular zone and the role of epidermal growth factor”

Brain Research Reviews 67 (2011) 147-156

Parker WD, Boyson SJ, Parks JK (1989)

Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson’s disease.

Ann Neurol 26:719-723.

Poirier J, Dea D, Baccichet A, Thiffault C (1994)

Superoxide dismutase expression in Parkinson’s disease.

Ann N Y Acad Sci 738:116-120.

Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL (1997)

Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson’s disease.

Science 276:2045-2047.

Rakic P.

Guidance of neurons migrating to the fetal monkey neocortex.

Brain Res. 1971 Oct 29; 33(2):471-6.

Reynolds BA, Weiss S.

Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system.

Science. 1992 Mar 27;255(5052):1707-10

Rodriguez MC, Obeso A, Olanow W (1998)

Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in Parkinson's disease: a target for neuroprotection. Ann Neurol 44 (suppl 1), S175-S188.

Sanai N, Tramontin AD, Quiñones-Hinojosa A, Barbaro NM, Gupta N, Kunwar S, Lawton MT, McDermott MW, Parsa AT, Manuel-García Verdugo J, Berger MS, Alvarez-Buylla A.

Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. Nature. 2004 Feb 19;427(6976):740-4.

Saueressig H, Burrill J, Goulding M(1991):

Engrailed-1 and netrin-1 regulate axon pathfinding by association interneurons that project to motor neurons. Development 1999, 126:4201-4212.

Schapira AHV, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD (1990)

Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. J Neurochem 54:823-827.

Sgadò, P. et al.

Slow progressive degeneration of nigral dopaminergic neurons in postnatal Engrailed mutant mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **103**, 15242- 15247 (2006).

Sian J, Fexter DT, Lees AJ, Daniel S, Jenner P, Marsden CD (1994)

Alteration in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia.

Ann Neurol 36:348-355.

Tetsuro Shingo, S. Todd Sorokan, Takuya Shimazaki, and Samuel Weiss

“Erythropoietin Regulates the In Vitro and In Vivo Production of Neuronal Progenitors by Mammalian Forebrain Neural Stem Cells”

the Journal of Neuroscience, December 15, 2001, 21(24): 9733-9743

Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS.

Liver from bone marrow in humans.

Hepatology. 2000 Jul;32(1):11-6.

Simon, H. H., Saueressig, H., Wurst, W., Goulding, M. D. & O'Leary, D. D. (2001).

Fate of midbrain dopaminergic neurons controlled by the engrailed genes.

J. Neurosci. **21**, 3126-3134.

Smith ID, Grace AA (1992)

Role of the subthalamic nucleus in the regulation of nigral dopamine neuron activity.

Synapse 12: 287-303.

Smith Y, Charara A, Parent A (1996)

Synaptic innervation of midbrain dopaminergic neurons by glutamate-enriched terminals in the squirrel monkey.

J Comp Neurol 364: 231-253.

Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M (1997)

Alpha-synuclein in Lewy bodies.

Nature 388:839-840.

Sternberger L. A., Hardy P.H. JR., Cuculis J.J. and Meyer H.G. (1970).

The unlabeled antibody enzyme method of immunoistochemistry-Preparation and properties of soluble antigen- antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification

of spirochetes

J. Histochem.cytochem.18:315-333

Troster AI. (gennaio 2009).

Neuropsychology of deep brain stimulation in neurology and psychiatry..

Front Biosci. 14: 1880-90.

Caroline Vandeputte, Jean-Marc Taymans, Cindy Casteels, Frea Coun, Yicheng Ni, Koen Van Laere.

Automated quantitative gait analysis in animal models of movement disorders.

BMC Neuroscience 2010, 11:92

Wichmann T., e De Long M.R.(1993).

Pathophysiology of parkinsonian motor abnormalities.

Adv. Neurol. 60,53-61

Wilson JMB and Shaw CA (2007)

Late appearance of glutamate transporter defects in a murine model of ALS-parkinsonism dementia complex.

Neurochem Int 50(7-8):1067-77.

Wojtowicz JM, Kee N.

“BrdU assay for neurogenesis in rodents.”

Nat. Protoc. 2006; 1(3):1399-40

Ying Li, Shan Ping Yu, Osama Mohamad, Thomas Genetta, and Ling Wei

“Sublethal Transient Global Ischemia Stimulates Migration of Neuroblasts and Neurogenesis in Mice”

Transl Stroke Res. 2010 September; 1(3):184-196. Doi:10.1007/s12975-010-0016-6

Zhang R, Zhang L, Zhang Z, Wang Y, Lu M, Lapointe M, Chopp M.

“A nitric oxide donor induces neurogenesis and reduces functional deficits after stroke in rats”.

Ann Neurol.2001 Nov;50(5):602-11

Zhi-Yong Chen, Pundit Asavaritikrai, Josef T.Prchal, and Constance Tom Noguchi

“Endogenous Erythropoietin Signaling Is Required for Normal Neural Progenitor Cell Proliferation”.

The Journal of Biological Chemistry vol.282, no.35,pp.25875-25883, August 31, 2007 Printed in the U.S.A.