

Alma Mater Studiorum - Università di Bologna
Facoltà di Medicina Veterinaria

Dipartimento di Morfofisiologia Veterinaria e
Produzioni Animali

Sezione di Anatomia

Dottorato di Ricerca in
Applicazioni Biotecnologiche in Neuromorfofisiologia

XIX ciclo

**“NEURAL STEM CELLS”:
studio in vivo e in vitro nel cervello adulto**

Tesi di dottorato della Dott.ssa Michela Paradisi

Settore disciplinare “VET01”

Tutor:
Chiar.ma Dott.ssa
Luciana Giardino

Coordinatore:
Chiar.ma Prof.ssa
Maria Luisa Lucchi

Anno Accademico 2005-2006

*A Camilla e Tomis,
alla mia famiglia,
a Luciana*

LISTA DELLE PUBBLICAZIONI INCLUSE NELLA TESI

Questa tesi si basa sulle seguenti pubblicazioni alle quali nel testo si fa riferimento con il numero corrispondente:

I. Emgard M., **Paradisi M.**, Pironi S., Fernandez M., Giardino L., Calzà L. Prenatal glucocorticoid exposure affects learning and vulnerability of cholinergic neurons. *Neurobiology of Aging* 28:112-121, **2006**

II. Giuliani A., D'Intino G., **Paradisi M.**, Giardino L., Calzà L. p75-Immunoreactivity in the subventricular zone of adult male rats: expression by cycling cells. *Journal of Molecular Histology* 35:749-58, **2004**

III. Fernandez M., **Paradisi M.**, Giardino L., Calzà L. To Know Neural Stem Properties From Diseased Brain: A critical step for Brain Repair. In: Grier E.V. (Ed.), *Neural Stem Cells Research*, Nova Science Publishers, Inc., New York, pp. 77-97, **2006**

IV. Fernandez M., **Paradisi M.**, Giardino L., Calzà L. Effect of thyroid hormone on proliferation and differentiation of neuroprecursor cells: an in vitro study of neurospheres derived from the subventricular zone of adult rats. *Manuscript in preparation*

V. **Paradisi M.**, Fernandez M., Sivilia S., Marucci G., Giulioni M., Giardino L., Calzà L. In vitro assay for neurogenesis and gliogenesis in adult human dentate gyrus. *Submitted*, **2007**

Questi lavori sono stati finanziati da:

Università di Bologna

ASC-Lab (Azioni PRRIITT Regione Emilia-Romagna)

MIUR (COFIN e FIRB)

Associazione Italiana per la lotta alle Sindromi Atassiche, Regione Emilia-Romagna

LIONS CLUB BOLOGNA e BOLOGNA SAN LAZZARO

ABBREVIAZIONI

AP	Area postrema
Ara-C	Citosina- β -arabinofuranoside
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BMP	Bone morphogenetic protein
BrdU	Bromodesossiuridina
DG	Giro dentato dell'ippocampo
EAE	Encefalomielite allergica sperimentale
EGF	Epidermal growth factor
ES	Cellule staminali embrionali
GABA	Acido γ aminobutirrico
GFAP	Proteina fibrillare acida della glia
IFN- γ	Interferone γ
IGF	Insulin growth factor
MCM2	Minichromosome maintenance protein
MHC	Sistema di istocompatibilità
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-dihenil tetrazolium bromide
NG-2	Proteoglicano condroitin solfato
NeuN	Anti neuronal nuclei
NIH	National Institute of Health
NPCs	Precursori cellulari neurali
NSCs	Cellule staminali neurali
OB	Bulbo olfattorio
PDGF	Plateled derived growth factor
PSA-NCAM	Forma polisialilata acida della proteina NCAM
RIP	Clone oligodendrociti maturi
RMS	Stria migratoria rostrale
SGL	Strato subgranulare
SGZ	Zona subgranulare
SVZ	Zona subventricolare

TGF	Tumor growth factor
TGF- β	Transforming growth factor β
TNF- α	Tumor necrosis factor α
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VZ	Zona ventricolare

LISTA DELLE PUBBLICAZIONI INCLUSE NELLA TESI
ABBREVIAZIONI

INDICE

1. INTRODUZIONE

1.1 Cellule staminali e cellule staminali neurali

1.2 Neurogenesi nel cervello adulto

1.2.1. La zona subventricolare

1.2.2. Il giro dentato dell'ippocampo

1.2.3. Altre aree

1.3 Neurogenesi e neuropatologie

1.4 Isolamento di cellule staminali neurali: il sistema delle neurosfere

2. SCOPO DELLA RICERCA

3. MATERIALI E METODI

3.1 Materiali e Metodi per studi *in vivo*

3.1.1. Animali

3.1.2. Trattamenti e Chirurgia

Trattamento prenatale con glucocorticoidi

Lesione con 192IgG-Saporina

3.1.3. Morris Water Maze

3.1.4. Istologia e immunoistochimica

Fissazione in vivo

Colorazione con Blu di Toluidina

Immunofluorescenza Indiretta

Studi di proliferazione mediante BrDU

Metodo Avidina-Biotina (ABC)

Colorazione nucleare con Hoechst-33258

3.1.5. Dosaggio attività colina acetil-transferasi

3.2 Materiali e Metodi per studi *in vitro*

3.2.1. Pazienti, animali, trattamenti

Reperimento pazienti

Animali

Induzione di Encefalomielite Allergica sperimentale (EAE) in ratte Lewis

3.2.2. Allestimento di colture primarie di cellule staminali neurali di ratto (NSC)

3.2.3. Allestimento di colture primarie di cellule staminali neurali da umano

3.2.4. Caratterizzazione morfologica *in vitro*

Immunofluorescenza Indiretta

Analisi delle neurosfere

Saggio MTT

3.2.5. RT-PCR

Estrazione mRNA e Trascrizione Inversa

RT-PCR quantitativa

4. RISULTATI e DISCUSSIONE

4.1 Allestimento di un modello di lesione colinergica atto a valutare la vulnerabilità neuronale ad eventi prenatali

4.2 La zona subventricolare ed il p75

4.3 Neurogenesi e comportamento di cellule staminali in corso di malattie neurodegenerative

4.4 Neurogenesi e gliogenesi nel giro dentato da tessuto umano adulto

5. BIBLIOGRAFIA

6. RINGRAZIAMENTI

COPIA DEI LAVORI OGGETTO DELLA TESI

1. INTRODUZIONE

1.1 Cellule staminali e cellule staminali neurali

In base alla definizione riportata dal National Institute of Health (NIH, 2001), le cellule staminali presentano tre caratteristiche principali che le distinguono dagli altri tipi cellulari:

1. sono cellule capaci di automantenimento per lunghi periodi di tempo attraverso il processo di divisione cellulare.
2. non sono cellule specializzate
3. in particolari condizioni fisiologiche o sperimentali possono essere indotte a differenziare verso determinati *lineage* con funzioni speciali.

Una popolazione di cellule staminali in grado di automantenersi può: attraverso la divisione simmetrica dare origine a due cellule figlie identiche che mantengono le caratteristiche di cellule staminali oppure attraverso il processo di divisione asimmetrica produrre una cellula identica a quella di origine e un progenitore multipotente capace di limitato automantenimento prima di differenziare in cellule *committed* per i *lineage* neuronali e gliali.

Il differenziamento delle cellule può essere diretto da segnali interni, controllati cioè da geni che portano informazioni per tutte le strutture e funzioni di una cellula, e da segnali esterni epigenetici quali ormoni e molecole secreti da altre cellule, contatto con cellule vicine e molecole presenti nel microambiente.

Le cellule staminali possono essere classificate in base al loro potenziale di sviluppo: vengono considerate totipotenti, le cellule che sono in grado di dare origine ad un intero organismo producendo sia l'embrione che tutti i tessuti extraembrionali; pluripotenti, quelle che possono originare cellule derivate dai tre strati germinali embrionali ad eccezione del trofoblasto della placenta; multipotenti se danno origine a più di un tipo cellulare prendendo nome dal tessuto di origine o dal quale sono state osservate in vivo; unipotenti se sono in grado di differenziare solo verso un determinato *lineage*. Possono essere divise in cellule staminali embrionali (ES) e cellule staminali adulte. Le embrionali derivano da cellule indifferenziate presenti nell'inner cell mass della blastocisti che è lo stadio di sviluppo che precede l'impianto nella parete uterina. Durante il normale corso dello sviluppo danno origine ai tre foglietti embrionali

ectoderma, endoderma e mesoderma attraverso il processo di gastrulazione. Possono proliferare teoricamente all'infinito ed espandersi dando origine a colonie di cellule staminali non differenziate con cariotipo diploide stabile. Sono pluripotenti e generano tutti i derivati embrionali incluse le cellule germinali ad esclusione del trofoblasto (Mujtaba and Rao, 2002). Se la cellula totipotente va incontro ad una mutazione a carico dell'homeobox che contiene il gene Oct3/4, perde la capacità di diventare pluripotente differenziando solo in cellule del trofoblasto. (Fan and Chaillet, 2002). Le cellule embrionali inoltre sono in grado di esprimere il fattore di trascrizione Oct-4 che le mantiene in stato proliferativo, possono essere indotte a proliferare o differenziare e a livello di ciclo cellulare spendono la maggior parte del tempo in fase S durante la quale sintetizzano DNA senza la necessità di stimoli esterni per iniziare la replicazione (Smith, 2001). Sono capaci di espandersi in maniera illimitata in vitro e quando sono soggette ad appropriate condizioni di coltura differenziano spontaneamente come colonie aderenti alle piastre o come corpi embrioidi, gruppi sferoidali di cellule differenziate o parzialmente differenziate che derivano dai tre strati germinali primari dell'embrione (Trounson, 2006).

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 a 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). Le cellule staminali in tessuti adulti possono generare tipi cellulari specializzati oltre che del tessuto in cui risiedono (cellule staminali somatiche), anche di altri tessuti diversi, siano questi prodotti dallo stesso strato germinale siano derivati invece da strati germinali diversi. Il processo attraverso il quale tali cellule sono in grado di fare questo è chiamato transdifferenziamento. 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). L'identificazione di cellule staminali si esegue con diverse metodiche sia in vivo che in vitro. Nel sistema in vivo vengono utilizzati metodi di marcatura che prevedono l'utilizzo di retrovirus, di intercalanti nucleotidici come bromodeossiuridina (BrdU), di timidina triziata spesso associate a tecniche di immunocitochimica per visualizzare antigeni specifici (di *lineage*, di maturazione ecc.). Per quel che riguarda il sistema in vitro invece il metodo da utilizzare consiste nell'isolamento del tessuto, sia esso fetale o adulto, della regione contenente le cellule staminali. Il tessuto prelevato deve essere sottoposto a disaggregazione e le cellule dissociate vengono messe in coltura in presenza di mitogeni molte volte tessuto-specifici che supportano la proliferazione. Eliminando i mitogeni, le cellule differenziano verso i *lineage* specifici del tessuto mostrandone i fenotipi, osservabili attraverso l'utilizzo di tecniche di immunocitochimica o utilizzando saggi biomolecolari.

1.2 Neurogenesi nel cervello adulto

Fino agli inizi del 1900 si pensava che il sistema nervoso centrale adulto avesse capacità rigenerative molto scarse e che non potesse avvenire alcun tipo di sostituzione dei neuroni in via di degenerazione. La prima prova che la neurogenesi può avvenire in alcune regioni del cervello adulto di mammifero deriva da studi fatti da Altman e Das fin dal 1965. I loro risultati e un gran numero di studi successivi hanno dimostrato che essa è attiva principalmente in due aree: il bulbo olfattorio (OB) e il giro dentato dell'ippocampo (DG). Nonostante avvenga costitutivamente in queste zone per tutta la fase adulta, è stato dimostrato che nei roditori diminuisce con l'età (Seki and Arai, 1995; Kuhn et al., 1996), ma questo effetto può essere contrastato riducendo i livelli di

corticosteroidi tramite adrenalectomia (Cameron and McKay, 1999). La riduzione del *rate* di neurogenesi può anche essere dovuto ad un progressivo rallentamento del ciclo cellulare dei precursori (NPCs) in vivo. Dal lavoro di Gage e Taupin (2002) emerge inoltre che studi fatti in precedenza avevano messo in evidenza che la neurogenesi avviene nel OB di roditori adulti e di primati e che i nuovi neuroni nel OB vengono generati da NPCs nella parte anteriore della zona subventricolare (SVZ). Tali precursori migrano dalla SVZ fino al OB attraverso la stria migratoria rostrale (RMS) e una volta giunti a destinazione differenziano in interneuroni, cellule dei granuli e cellule periglomerulari. La neurogenesi avviene anche nel DG di umano, primati e i NPCs del DG vengono generate nella zona subgranulare e differenziano in cellule neuronali nello strato dei granuli del DG stesso (Fig.1).

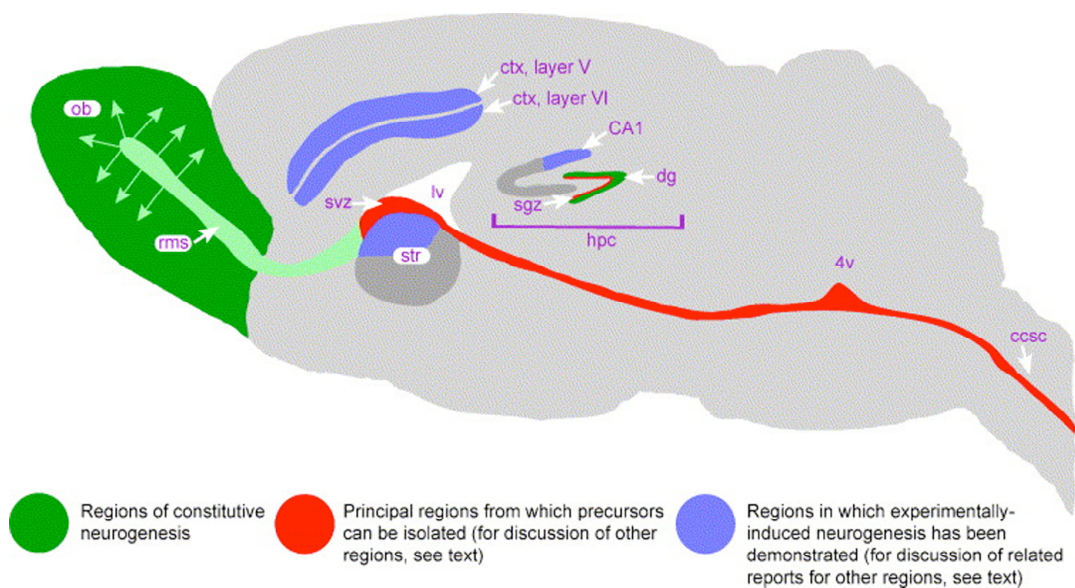


Fig.1: rappresentazione schematica delle due regioni di neurogenesi costitutiva nel sistema nervoso centrale di mammifero adulto (Emsley et al., 2005)

I precursori sono stati isolati non solo dall'ippocampo ma anche da altre aree del sistema nervoso centrale adulto, fra cui: cervello di topo, SVZ di topo ratto e umano, setto e striato di ratto, nella corteccia umana, nel OB di ratto e uomo, nella estensione rostrale della SVZ, nella amigdala, nella substantia nigra e a diversi livelli del midollo

spinale (SC) di topo e ratto. Nel midollo spinale i NPCs possono essere isolati dal canale periventricolare o dal parenchima.

Studi quantitativi di Cameron e McKay (2001) hanno cercato di stimare il numero di cellule nervose quotidianamente generate nel cervello adulto di roditore, utilizzando l'iniezione con alte dosi di BrdU, marcatore specifico e non tossico per le cellule in divisione. Nel DG del ratto adulto, si marcano circa 9400 cellule proliferanti con un ciclo cellulare di 25 h, e queste generano circa 9000 nuove cellule ogni giorno e più di 250000 al mese. Non tutte queste cellule permangono nel tessuto: un processo altamente controllato di integrazione e/o apoptosi garantisce la costanza del numero di neuroni che costituisce l'ippocampo. Tale neurogenesi contribuirebbe a rinnovare circa il 3,3% della popolazione totale delle cellule dei granuli per mese.

Con riferimento al precursore locale di questa neurogenesi nel cervello adulto sono state formulate due diverse ipotesi basate sull'utilizzo di timidina triziata, analisi immunocitochimica e marcatura con BrdU. Secondo la prima ipotesi nella SVZ le nuove cellule neuronali originano da cellule con caratteristiche simili ad astrociti che esprimono il marcatore gliale GFAP (Doetsch et al., 1999a); la seconda ipotesi suggerisce la derivazione da una popolazione di cellule endodimali che esprimono la proteina dei filamenti intermedi nestina (Johansson et al., 1999). A sostegno della prima ipotesi citata sono stati fatti studi sul cervello dei mammiferi che suggeriscono che la glia radiale sia direttamente implicata nel suo sviluppo. Essa appare all'inizio della neurogenesi ed è costituita dalle prime cellule che possono essere distinte dalle cellule staminali neuroepiteliali (Doetsch, 2003); ha il corpo cellulare localizzato nella zona ventricolare (VZ) e possiede un lungo processo che si estende verso la superficie piaie (Gadisseux et al., 1989). Questi processi servono da guida per la migrazione di giovani neuroni dal loro sito di nascita nella zona ventricolare (Rakic, 1972). Le cellule della VZ possiedono il corpo cellulare allungato ortogonalmente verso la superficie del ventricolo. Il loro citoplasma contiene abbondante reticolo endoplasmatico liscio, abbondanti filamenti intermedi che si trovano alla base delle cellule da cui parte un lungo processo radiale che si estende fino al parenchima sottostante. I nuclei di queste cellule sono allungati perpendicolarmente verso la superficie del lume ventricolare e contengono cromatina lassa e uno o due nucleoli. Tutte le cellule sono in contatto con il lume ove vi estendono un singolo ciglio. Queste caratteristiche ultrastrutturali

identificano queste cellule come glia radiale (Hinds and Ruffett, 1971). Cessata la produzione neuronale, la glia radiale retrae i suoi processi dalle superfici ventricolare e piaie differenziando in astrociti (Ramòn y Cajal, 1911; Schmechel and Rakic, 1979; Voigt, 1989), che provvedono al supporto strutturale, trofico e metabolico dei neuroni; interagiscono con le cellule endoteliali per formare la barriera ematoencefalica; assorbono i neurotrasmettitori; mantengono l'omeostasi ionica extracellulare; secernono fattori di crescita, citochine e componenti della matrice extracellulare e sono coinvolti nella formazione e stabilizzazione delle sinapsi (Haydon, 2001; Fields and Stevens-Graham, 2002). Come lo sviluppo postnatale progredisce, la superficie ventricolare diventa più popolata da cellule ependimali che potrebbero far allontanare i corpi cellulari degli astrociti dal lume ventricolare. Molti astrociti tuttavia estendono un sottile processo fra le cellule ependimali suggerendo che il contatto con il ventricolo potrebbe essere importante per la funzione di cellule staminali (Doetsch et al., 1999a). La glia radiale ha inoltre importante funzione strutturale e metabolica poiché non solo provvede al supporto delle cellule che contatta ma può anche fungere da condotto per il trasporto di sostanze fra diversi compartimenti del cervello in via di sviluppo e dell'adulto (Alvarez-Buylla et al., 2002). Le cellule del sistema nervoso centrale vengono identificate come cellule staminali sulla base del loro potenziale di generare diversi tipi cellulari e per la loro capacità di automantenimento in vitro, condizione che non conservano nella vita adulta in quanto possono perdere capacità riparativa. Studi effettuati da Merkle e colleghi (2006), hanno dimostrato che le cellule neuroepiteliali probabilmente si trasformano in glia radiale che a sua volta dà origine alle cellule staminali adulte con morfologia astrocitaria. Le cellule neuroepiteliali sono allungate radialmente contattando sia la superficie ventricolare che quella piaie; si dividono a livello della superficie ventricolare dando origine alla VZ. Inizialmente si dividono simmetricamente per aumentare il *pool* di cellule staminali ed in seguito si dividono asimmetricamente generando una cellula staminale che resta nella VZ e una cellula figlia che migra radialmente verso l'esterno. Come le cellule neuroepiteliali, le cellule della glia radiale si dividono nella VZ e mantengono contatti con la superficie piaie attraverso i processi basali proiettati radialmente. Poiché condividono molte caratteristiche, si potrebbe pensare che le cellule neuroepiteliali si trasformano direttamente in cellule della glia radiale. Ad influenzare le NSCs adulte e i progenitori

intermedi intervengono anche fattori ambientali e fra i fattori responsabili della regolazione dei progenitori neurali sono stati evidenziati i neurotrasmettitori. Ad esempio si è visto che la dopamina rilasciata sinapticamente potrebbe stimolare la proliferazione delle cellule di tipo C attraverso il recettore D2 (Hoglinger et al., 2004), mentre le cellule di tipo B vengono inibite dall'acido γ -aminobutirrico (GABA) rilasciato non sinapticamente da nuovi neuroni della SVZ (Liu et al., 2005).

Negli ultimi anni è risultato sempre più evidente che la neurogenesi è regolata dall'interazione fra le cellule e il microambiente circostante che costituiscono la così detta "nicchia". Sembra che le funzioni di automantenimento, attivazione e differenziamento delle cellule staminali siano regolate dalla nicchia nella quale risiedono (Spradling et al., 2001). A far parte di questa struttura rientrano anche i vasi sanguigni, la membrana basale per l'ancoraggio delle cellule, la matrice extracellulare che modula la capacità di aderire e l'attività delle molecole di segnale (Doetsch, 2003). La vascolarizzazione gioca un ruolo fondamentale nella neurogenesi adulta: le cellule endoteliali e i periciti che circondano il lume dei vasi, sono separati dal cervello dalla lamina basale che facilita l'attivazione di fattori specifici che permettono di regolare sia la neurogenesi, che avviene in luoghi strettamente associati ai vasi sanguigni, sia l'angiogenesi. Tali fattori includono *basic fibroblast growth factor* (bFGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *tumor growth factor* (TGF) e *insulin growth factor* (IGF), mentre le cellule endoteliali secernono mitogeni, fattori di sopravvivenza e differenziamento per i neuroni quali bFGF, VEGF, *platelet derived growth factor* (PDGF) e *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) (Palmer et al., 2000; Jin et al., 2002). La lamina basale, legando questi fattori e fungendo da ancoraggio per le cellule, ne consente l'entrata nella nicchia; è inoltre strettamente interdigitata con gli astrociti che funzionano sia come cellule staminali che come cellule della nicchia (Alvarez-Buylla et al., 2004). Nell'adulto, le cellule staminali e la nicchia in cui risiedono sono localizzate in aree ristrette del sistema nervoso. Come già ricordato la neurogenesi è stata dimostrata senza dubbio in due zone: la SVZ della parete laterale del ventricolo e la zona subgranulare del DG dell'ippocampo.

1.2.1. La zona subventricolare (SVZ)

La SVZ è un importante strato germinale che si forma durante lo sviluppo adiacente alla parte ventricolare telencefalica. Nell'embrione i progenitori della SVZ derivano da precursori primari o cellule staminali della VZ (Morshead et al., 1994; Reynolds and Weiss, 1996; Doetsch et al, 1999a). Queste due zone, a parte la morfologia cellulare, possono essere distinte dalla espressione di due peptidi: *noggin* e *distal less homeobox 2* (DLX2) (Corbin et al., 2000). *Noggin* lega le *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs) prevenendone l'attivazione dei recettori (McMahon et al., 1998), mentre DLX2 è un fattore di trascrizione espresso in progenitori neurali (Panganiban and Rubenstein, 2002). Al tempo zero (P0) *noggin* è espresso principalmente da cellule nella VZ mentre DLX2 è espresso nella SVZ. Nel cervello adulto la proteina *noggin* è espressa nelle cellule ependimali (Lim et al, 2000) e DLX2 continua ad essere espresso nella SVZ per tutta la vita. In questa zona lo *staining* relativo a questo peptide è limitato ad uno dei tipi cellulari che la costituiscono (cellule di tipo C) e ai giovani neuroblasti, ma non è espresso dai progenitori primari suggerendo dunque la sua espressione nei precursori secondari (Tramontin et al., 2003). La SVZ persiste anche in età adulta (Allen, 1912; Smart, 1961; Altman, 1969; Sturrock and Smart, 1980) e mantiene la capacità di generare neuroni e glia (Lois and Alvarez-Buylla, 1993; Kirschenbaun and Goldman, 1995).

La SVZ è stata descritta come una zona in cui sono presenti cellule con morfologia indifferenziata, cellule gliali e cellule con morfologia transizionale. In particolare sono stati evidenziati tre tipi cellulari: neuroblasti o cellule di tipo A, astrociti o cellule di tipo B1 e B2 e cellule indifferenziate o cellule di tipo C che potrebbero corrispondere ai precursori (Fig. 2).

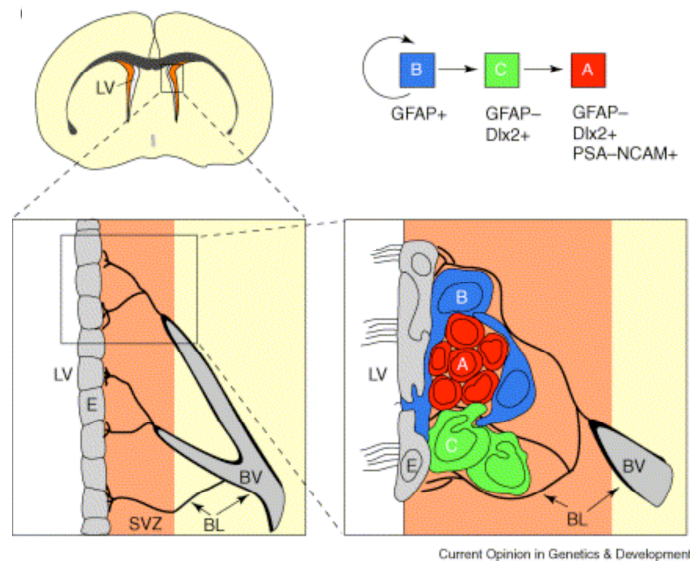


Fig. 2 : localizzazione della SVZ e cellule che la costituiscono (Doetsch, 2003)

Le cellule di tipo A formano catene orientate tangenzialmente avvolte da cellule di tipo B, mentre i *clusters* di cellule in proliferazione di tipo C sono associati alle catene di neuroblasti. La dimostrazione che gli astrociti della SVZ sono i precursori primari neuronali in vivo e cellule che agiscono come cellule staminali in vitro è data dalla infusione dell'antimitotico citosina-b-arabinofuranoside (Ara-C). In seguito a questo trattamento le cellule A e le C vengono eliminate e gli astrociti della SVZ iniziano a dividersi dando origine a cellule di tipo C che generano a loro volta neuroblasti (Doetsch et al., 1999b). Le cellule di tipo A presentano corpo allungato con uno o due processi, abbondante cromatina lassa con due-quattro nuclei, citoplasma scuro contenente molti ribosomi liberi, un piccolo apparato di Golgi e microtubuli orientati lungo l'asse allungato delle cellule. Sono unite ad altre cellule di tipo A tramite piccoli complessi giunzionali circolari distribuiti sulla superficie cellulare. A livello di questi complessi sono presenti vescicole endocitotiche che potrebbero corrispondere allo scambio di segnali fra cellule o potrebbero essere correlate alla rimozione dei complessi stessi.

Le cellule di tipo B presentano contorni irregolari che riempiono gli spazi fra cellule

vicine: hanno nuclei irregolari e molti filamenti intermedi e corpi densi nel citoplasma. Vi sono due sottotipi: B1 e B2. Gli astrociti di tipo B1 sono più chiari, hanno più citoplasma e sono più larghi rispetto a quelli di tipo B2. Inoltre nelle cellule B1 la cromatina è relativamente dispersa mentre nelle B2 è più compattata. Le cellule B1 si trovano principalmente adiacenti alle cellule ependimali a livello delle quali formano molti processi dando origine ad una lamina che copre lo strato ependimale stesso. Le cellule B2 invece sono localizzate più frequentemente all'interfaccia con il parenchima striatale. Le cellule di tipo C sono più larghe e più sferiche. I loro nuclei presentano profonde invaginazioni e molta cromatina lassa. Hanno un nucleolo largo e reticolato e il citoplasma contiene un esteso apparato di Golgi, pochi ribosomi rispetto alle cellule di tipo A e non sono presenti fasci di filamenti intermedi tipici delle cellule di tipo B. Il contorno è liscio e frequentemente contattano le cellule di tipo A con le quali occasionalmente si osserva la formazione di piccoli complessi giunzionali. Le cellule epiteliali di tipo E formano un monostrato epiteliale che separa la SVZ dalla cavità ventricolare. I processi laterali di cellule ependimali adiacenti sono fortemente interdigitati e contengono complessi giunzionali apicali. La superficie esposta alla cavità ventricolare contiene microvilli, il citoplasma presenta molti mitocondri; i nuclei sono sferici e la cromatina non è aggregata (Doetsch et al., 1997). Le cellule ependimali giocano un ruolo estremamente rilevante nella neurogenesi adulta essendo questa inibita nella SVZ dalle BMPs prodotte dagli astrociti della SVZ stessa (Lim et al., 2000). La loro importanza sta nel fatto che esse secernono *noggin* che neutralizza l'effetto inibitorio delle BMPs. Le BMPs sono regolatori critici dello sviluppo del sistema nervoso centrale, di quello periferico e craniofacciale. Sono membri delle *transforming growth factor beta family* (TGFβ) e inizialmente sono state identificate per il loro effetto sulla formazione dell'osso. Sono espresse ad alti livelli ai margini laterali della placca neurale e di seguito nella mediolinea dorsale del tubo neurale. E' stato dimostrato che l'applicazione delle BMPs paradossalmente stimola sia la proliferazione che l'arresto mitotico. Infatti i precursori cellulari neurali rispondono in maniera diversa a tali proteine a seconda dell'età gestazionale in cui si trovano al momento della stimolazione. Ad esempio, nelle prime fasi della gestazione, se sottoposti all'effetto delle BMPs, rispondono con apoptosi, mentre se ne subiscono lo stimolo nel periodo che intercorre fra la metà della gestazione e la vita adulta, rispondono con il

differenziamento. Il fatto che l'azione delle BMPs sia inibita da *noggin*, vede tali proteine implicate nell'averne un effetto nei segnali di nicchia e la loro repressione come significato di mobilitazione delle cellule staminali (Chen and Panchision, 2006). In topi neonati e adulti, cellule nate dalla SVZ migrano rostralmente lungo la stria migratoria (RMS) (Altman, 1969) verso il OB a livello del quale differenziano in neuroni dei granuli e periglomerulari (Lois and Alvarez-Buylla, 1994). Queste cellule migrano sottoforma di aggregati detti catene (Russelot et al., 1995; Lois et al., 1996). Non solo la RMS ma anche la SVZ presenta catene che formano una estesa rete che si estende dalla parete laterale caudale a quella rostrale del ventricolo laterale. L'estensiva migrazione tangenziale dei precursori neurali attraverso la SVZ suggerisce che i progenitori per la neurogenesi adulta sono distribuiti a livello di tutta la parete. La SVZ postnatale è anche un sito di attiva gliogenesi (Paterson et al., 1973; Levison and Goldman, 1993) ed è stato dimostrato che cellule staminali neurali multipotenti risiedono in questo strato germinale (Alvarez-Buylla and Lois, 1995; Calof, 1995; Gage et al., 1995; Weiss et al., 1996); potrebbe essere inoltre fonte di oligodendrociti sia durante la rimielinizzazione che in normali condizioni nell'adulto (Nait-Oumesmar, 1999). Come nel caso dei roditori e primati, anche il cervello umano contiene progenitori che possono dare origine a neuroni e glia. Ad un esame al microscopio elettronico è stato visto che gli astrociti della SVZ umana sono separati dall'ependima da una parte contenente processi che esprimono la *glial fibrillary acid protein* (GFAP). Tali processi sembra si estendano nello strato ependimale orientandosi verso il lume del ventricolo ma non è stata osservata la presenza di alcuna catena migratoria neuronale nella SVZ. Così, al contrario delle altre specie prese in considerazione, si è aperta la possibilità che la migrazione dalla SVZ al OB non abbia luogo nell'uomo o che se questo accade, i precursori migrano come cellule individuali (Sanai et al., 2004).

1.2.2. Il giro dentato dell'ippocampo

La neurogenesi ippocampale adulta è stata descritta in rettili, uccelli, roditori e primati, incluso l'uomo. Le cellule destinate a diventare neuroni vengono generate nella parte più interna dello strato delle cellule dei granuli, la zona subgranulare (SGZ) del giro dentato dell'ippocampo che è il confine fra lo strato delle cellule dei granuli e l'ilo o regione

CA4. Da questa zona, le cellule migrano per una breve distanza inviando i dendriti nello strato molecolare dell'ippocampo e gli assoni nella regione CA3. La SGZ è un'area altamente vascolarizzata ed è stato osservato uno stretto rapporto spaziale fra i vasi sanguigni e i precursori in divisione. In base a criteri morfologici ed a proprietà antigeniche sono stati individuati in questa zona tre tipi di cellule proliferative (Emsley et al., 2005):

a-precursori della glia radiale detti “cellule B” o cellule di tipo 1

b-cellule di tipo 2 che esprimono nestina e mancano di caratteristiche gliali

c-cellule di tipo 3, doblecortina positive e nestina negative (Fig. 3).

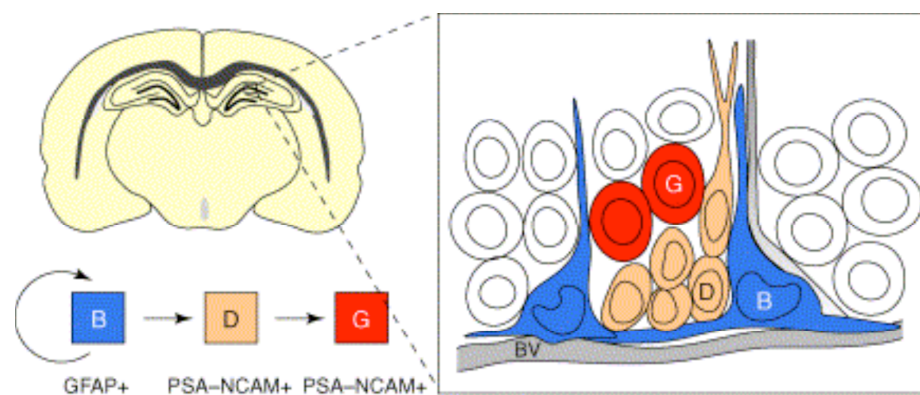


Fig. 3 : zona subgranulare dell'ippocampo e tipi cellulari che la compongono (Doetsch, 2003)

Le cellule con caratteristiche di glia radiale sono state identificate come precursori predominanti in questa regione; in particolare è stato suggerito che progenitori neurali specifici con ristretta capacità di automantenimento generano nuovi neuroni nel DG dell'adulto (Emsley et al., 2005). Le cellule identificate come precursori primari in tale area, contengono processi multipli con filamenti intermedi ricchi in GFAP. Nella SGZ del DG sono stati caratterizzati due tipi di astrociti GFAP positivi: gli astrociti orizzontali e gli astrociti radiali. Quelli orizzontali estendono processi altamente ramificati lungo il bordo della SGZ e non esprimono nestina (marcatore delle cellule immature), rappresentando l'astroglia tradizionale. Quelli radiali invece possiedono prominenti proiezioni radiali nello strato delle cellule dei granuli e sottili processi laterali intercalati vicino ai neuroni dei granuli. Molte di queste cellule sono state osservate in prossimità dei vasi sanguigni. Un *subset* di astrociti radiali esprimono

nestina e probabilmente funzionano come cellule staminali che danno origine ai neuroblasti ed eventualmente ai nuovi neuroni dei granuli (Dengke et al., 2005). Tale complessa morfologia degli astrociti dello strato subgranulare (SGL), va contro la nozione che i progenitori neurali siano cellule indifferenziate senza alcun ruolo se non la generazione di nuovi neuroni. Sembra che gli astrociti della SGZ combinino le funzioni di progenitori e cellule gliali. I processi radiali di tali cellule che si intercalano fra i neuroni dei granuli maturi, potrebbero potenzialmente portare l'informazione dal compartimento nel quale i neuroni maturi risiedono allo strato germinale nel quale nuovi neuroni vengono prodotti (Seri et al., 2001). I corpi cellulari di questi astrociti sono situati nello SGL ed oltre ai processi radiali che passano attraverso le cellule dei granuli, possiedono anche corti processi tangenziali che si estendono lungo la SGZ. Ad una analisi al microscopio elettronico, queste cellule presentano caratteristiche ultrastrutturali di astrociti simili a quelli della SVZ con chiaro citoplasma contenente filamenti intermedi e processi multipli che si intercalano fra le cellule vicine. In seguito a trattamenti effettuati con antimitotici (Ara-C) allo scopo di eliminare le cellule in divisione è stata notata la scomparsa delle cellule di tipo D e di molti astrociti; tuttavia la sopravvivenza di alcuni di questi ultimi ha messo in luce che, dopo la fine del trattamento antimitotico, essi riprendono a dividersi e riappaiono le cellule di tipo D. Questi esperimenti hanno dimostrato che gli astrociti dello SGL sono i precursori primari che danno origine ai nuovi neuroni dei granuli nel DG adulto attraverso l'intermediazione delle cellule D (Alvarez-Buylla et al., 2002). Rispetto alla SVZ le cellule di tipo D si dividono meno frequentemente e sono più differenziate rispetto alle cellule di tipo C, hanno un citoplasma ricco di organelli contenente molti mitocondri, lisosomi, abbondante reticolo endoplasmatico ruvido e un distinto apparato di Golgi (Doetsch et al., 1997). Tali cellule sono di piccola taglia, sono immunonegative per la GFAP e sembra che in divisione funzionino come precursori transienti nella formazione di nuovi neuroni (Taupin, 2006). A supportare la neurogenesi adulta contribuiscono diversi elementi che mantengono l'architettura della nicchia: innanzitutto l'estensiva interazione cellula-cellula; la stretta associazione con i vasi sanguigni; la matrice extracellulare e la lamina basale. In aggiunta lo stato epigenetico delle cellule determina la loro abilità nel rispondere ai segnali (Doetsch, 2003).

1.2.3. Altre aree

Come è già stato detto, la continua generazione di nuovi neuroni nel sistema nervoso dei mammiferi adulti è stata ben caratterizzata in due zone del sistema nervoso: la SVZ della parete del ventricolo laterale e lo strato delle cellule dei granuli del DG dell'ippocampo. E' stato osservato però che popolazioni cellulari con caratteristiche di cellule staminali sono presenti anche in altre aree non classicamente neurogeniche del cervello adulto. Complesso vagale, nella substantia nigra e nel midollo spinale sono aree per le quali si è ipotizzata la persistenza di neurogenesi/gliogenesi nell'adulto.

Il complesso vagale dorsale (DVC) è localizzato nel pavimento del quarto ventricolo e comprende: il nucleo del tratto solitario (NTS) e il nucleo motorio dorsale del nervo vago (DMX). Il NTS è il nucleo che riceve maggiormente gli assoni dei neuroni afferenti viscerosensoriali del nervo vago; il DMX contiene i corpi cellulari delle fibre efferenti del nervo vago. L'area postrema (AP) è invece un organo circumventricolare che si trova dorsalmente a livello della terza metà dell'estensione rostrocaudale del DVC. Questi nuclei costituiscono il principale centro integrativo dei riflessi cardiovascolari, respiratori e gastrointestinali e giocano un ruolo modulatore nelle funzioni del sistema autonomo (Bauer et al., 2005; Charrier et al., 2006). Nel ratto adulto, il DVC presenta una elevata espressione della proteina Gap-43 associata alla crescita, che viene espressa in maniera esclusiva dai coni di crescita assonale e della molecola di adesione cellulare neurale polisialilata, cioè l'isotipo espresso nello sviluppo (PSANCAM). Queste due molecole vengono espresse in maniera ubiquitaria per tutto il periodo di sviluppo embrionale e sembra che scompaiano in fase adulta tranne che in strutture che mostrano plasticità sinaptica e riorganizzazione strutturale in risposta ad attività afferente. Poiché fra i substrati neurali dell'adulto, PSANCAM è strettamente associata alla neurogenesi, Moyse e collaboratori (2006) hanno osservato che essa è presente anche a livello del DVC utilizzando un protocollo di doppia colorazione con i marcatori neurali in seguito a trattamento con BrdU. E' stato riscontrato che il potenziale neurogenetico è inferiore rispetto ad aree quali SVZ o DG dell'ippocampo e che della totalità dei nuclei BrdU positivi, il 75% è stato osservato a livello del nucleo del tratto solitario e il 16% nell'area postrema. Inoltre è stato visto che del totale di cellule BrdU il 9,2% era positivo per il marcatore dei neuroni maturi anti neuronal

nuclei (NeuN) e che il 7,2% era positivo per la GFAP. Grazie a queste osservazioni si può dire che le cellule in proliferazione nel DVC producono neuroni ed astrociti in proporzione simile e che se le NSCs sono coinvolte in tale sistema, i segnali che guidano il differenziamento verso il *lineage* neuronale o astrocitario sono equilibrati.

La substantia nigra (SN) si trova nel tegmento ventrale del mesencefalo. Viene suddivisa in: pars compacta della SN (SNpc) e pars reticolata della SN (SNpr). La SNpc è costituita da neuroni dopaminergici localizzati sopra alla SNpr che a sua volta è composta da neuroni GABAergici tipicamente multipolari di forma arrotondata o triangolare. I corpi cellulari sono di media grandezza con nucleo ovale ed un unico nucleolo e i prolungamenti dendritici rimangono localizzati all'interno di questa area. I neuroni dopaminergici della SNpc, sono di media grandezza, hanno il nucleo in posizione centrale e uno o due lunghi dendriti apicali che si dispongono ventro-lateralmente nella parte reticolata. Un secondo tipo di neuroni dopaminergici della SNpc è localizzato in posizione dorsale. Essi sono tipicamente fusiformi di taglia media con dendriti che proiettano medio-lateralmente (Fallon and Loughlin, 1994).

Poiché la SN è sede dei neuroni dopaminergici che sono importanti regolatori della trasmissione cortico-striatale e poiché la perdita di tali neuroni, come nel caso della malattia di Parkinson, comporta la manifestazione di disfunzioni motorie altamente invalidanti, sono stati effettuati studi per osservare una potenziale neurogenesi a livello di quest'area. Lo scopo era di ristabilire la trasmissione dopaminergica tramite il trapianto di neuroni fetali dopaminergici a livello dello striato che è l'area bersaglio principale della SN. Poiché il trapianto comporta complicazioni quali ad esempio la disponibilità di cellule, una diversa e critica risposta immunologica, una difficile se non improbabile integrazione delle cellule nel circuito ospite e poiché nuove cellule vengono generate per tutta la vita adulta, è stato suggerito che il sistema nervoso centrale possa essere in grado di effettuare una sorta di sostituzione cellulare endogena. Tali cellule deriverebbero da progenitori cellulari in attiva divisione che mostrano un *pattern* di differenziamento ampio o ristretto a seconda dell'area in cui si trovano. La somministrazione di BrdU e la doppia marcatura con antigeni specifici per i fenotipi neurali ha dimostrato che progenitori derivati dalla SN sono in grado di generare i tre *lineage* neurali anche se la neurogenesi a livello di questa zona è più limitata rispetto ad

aree quali SVZ o DG dell'ippocampo (Lie et al., 2002). Per dimostrare la presenza di neurogenesi nella SN, anche Zhao e collaboratori (2003) hanno effettuato trattamenti con BrdU in topi adulti, sia mediante iniezione intraperitoneale, sia tramite infusione intracerebroventricolare (i.c.v.) nel ventricolo laterale, sia attraverso somministrazione nell'acqua da bere. La maggior parte di cellule BrdU positive sono state osservate nella parte medio-rostrale della SNpc dove la densità neuronale è più alta, mentre non sono state osservate cellule a livello della porzione più caudale. Il fenotipo neuronale è stato confermato utilizzando tecniche immunocitochimiche ed in particolare osservando l'espressione di marcatori quali NeuN. Secondo gli stessi autori (Zhao et al., 2003), nuovi neuroni dopaminergici vengono generati continuamente nella SN in cui le nuove cellule si dividono a livello dello strato subependimale del ventricolo laterale e migrano lungo la mediolinea ventrale fino alla SN dove differenziano in cellule dopaminergiche. Tale processo viene *upregolato* in seguito a lesione.

La neurogenesi nella SN costituisce un argomento piuttosto controverso poiché tutti i risultati sopra descritti sono stati confutati da Frielingsdorf e collaboratori (2004) che eseguendo ex novo gli stessi esperimenti non hanno ottenuto alcun risultato.

La neurogenesi è stata studiata anche nel midollo spinale del ratto adulto. A questo proposito sono state esaminate in vitro proliferazione, distribuzione e destino fenotipico delle cellule in divisione di tale area. La localizzazione anatomica e la morfologia di queste cellule non è stata però determinata in vivo. Per fare ciò le cellule sono state sottoposte a trattamento con BrdU ed i risultati hanno mostrato che anche nell'adulto è presente una divisione cellulare consistente. Secondo tali studi le cellule che incorporano BrdU in primo luogo persistono come progenitori gliali immaturi. Diversamente dai progenitori gliali descritti per il cervello, queste cellule esprimono marcatori di astrociti e oligodendrociti maturi dopo quattro settimane (Horner et al., 2000). Trascorso questo tempo, il 5% delle cellule in divisione esprimono marcatori maturi o immaturi associati con gli oligodendrociti e il 3-5% delle cellule totali marcate con BrdU esprimono marcatori di astrociti maturi. Questi autori sostengono inoltre che la maggior parte delle cellule che incorporano BrdU, esprimendo anche *chondroitin sulfate proteoglycan* (NG2), sono progenitori. Nonostante la forma cellulare bipolare sia attribuita ai progenitori perinatali proliferativi e in questo lavoro la maggioranza di

cellule marcate con BrdU esibisca questa morfologia, sono state osservate anche cellule BrdU/NG2 positive che sono simili alle cellule unipolari descritte come progenitori adulti. Hanno inoltre dimostrato che non c'è differenza nel *rate* di divisione delle cellule fra le regioni dorsale, laterale o ventrale, ma che le zone più esterne della materia bianca sono quelle in cui la divisione cellulare è più alta. Dunque, sono stati proposti due modelli: il primo prevede la presenza di una cellula staminale a livello dello strato ependimale che si divide asimmetricamente. La cellula figlia migra verso la circonferenza più esterna del midollo spinale dove si presenta come progenitore gliale che inizia a dividersi rapidamente. Il secondo modello prevede che una popolazione di cellule staminali sia presente nella parte più esterna del midollo spinale in cui la divisione cellulare è più comune.

1.3 Neurogenesi e neuropatologie

La presenza di cellule staminali neurali adulte (NSCs) nel sistema nervoso centrale con la capacità di proliferare e differenziare nei principali *lineage* neurali e di integrarsi funzionalmente nei circuiti neuronali ha alimentato grandi speranze per un potenziale impiego terapeutico. Punto fondamentale per valutare un possibile ruolo delle cellule staminali neurali endogene in corso di neuropatologie o di eventi traumatici a carico del sistema nervoso centrale è il microambiente che si viene a creare nelle diverse condizioni patologiche.

In particolare lo sforzo che la comunità scientifica sta compiendo è quello di capire se e come le NSCs rispondono a diverse condizioni patologiche e quali sono i fattori che determinano tale risposta.

Patologie a carico del sistema nervoso centrale sono spesso accompagnate da una componente infiammatoria e una risposta immunitaria, è possibile quindi che molecole infiammatorie possano avere un ruolo fondamentale sulla neurogenesi endogena e sul successivo differenziamento dei progenitori neurali (Simard and Rivest, 2004). In particolare la risposta infiammatoria ha una componente cellulare ed una umorale. L'azione della componente cellulare dipende dall'espressione delle molecole del sistema di istocompatibilità (MHC) ed è stato visto come NSCs esposte a citochine pro-infiammatorie esprimono elevati livelli di MHC I e MHC II (*see* Magnus and Rao,

2005). I fattori implicati nella risposta infiammatoria umorale sono diversi ed è stato dimostrato come il microambiente infiammatorio influenzi il comportamento di NSCs. In particolare tra le principali citochine rilasciate in processi infiammatori vi sono l'interferone gamma (IFN-g) e il TNF-alpha (*see* Magnus and Rao, 2005).

Nel modello animale in vivo di sclerosi multipla, l'encefalite allergica sperimentale (EAE), è stato visto come vi sia un aumento della proliferazione delle NSCs nella zona subventricolare (Calzà et al., 1998) e di come la somministrazione di ormone tiroideo in una precisa finestra temporale determini una riduzione della proliferazione e una induzione del *lineage* oligodendrogliale (Calzà et al., 2002). L'isolamento di NSCs dalla SVZ di animali con EAE ha confermato anche in vitro un incremento della proliferazione delle NSCs in termini di numero di neurosfere secondarie ottenute rispetto agli animali di controllo (Fernandez et al., 2006).

In un altro modello di infiammazione a carico del sistema nervoso centrale ottenuto con la somministrazione di lipopolisaccaridi si è vista una riduzione della neurogenesi ippocampale (Monje et al., 2003) che può essere ripristinata somministrando un inibitore non selettivo delle ciclo-ossigenasi. Questo a conferma del fatto che diverse componenti della risposta infiammatoria, come citochine e fattori di crescita, possono favorire o inibire la neurogenesi endogena.

La capacità del sistema nervoso centrale di "auto-riparazione" è stata studiata anche con diversi modelli animali di lesione selettiva. Un modello di lesione selettiva del sistema colinergico, come la somministrazione i.c.v. di saporina coniugata con anticorpo IgG192 ha mostrato una riduzione della proliferazione nel *forebrain* basale. La successiva somministrazione di mitogeni in una determinata finestra temporale è in grado di aumentare la proliferazione a livello di SVZ e la somministrazione di molecole coinvolte nel differenziamento colinergico riducono il deficit comportamentale e colinergico dell'animale.

Eventi acuti a carico del sistema nervoso centrale come l'attacco epilettico (*stroke*) e i traumi cranici possono stimolare la proliferazione delle NSCs endogene e promuovere la migrazione delle "nuove" cellule al sito di danno (*see* Jagasia et al., 2006; Ohab et al., 2006). Uno dei possibili fattori chiave coinvolti in questo meccanismo è il TNF-alpha *converting enzyme* (Katakowski et al., 2006). L'attacco epilettico è una situazione caratterizzata da una componente infiammatoria cerebrale, non è da escludere quindi

che fattori reclutati nell'inflammazione in corso di epilessia possano agire stimolando la neurogenesi endogena (Vezzani and Granata, 2005).

Un recente studio (Jin et al., 2006) ha inoltre mostrato che in pazienti colpiti da attacco epilettico si ha la presenza di nuovi neuroni nella penombra ischemica circostante il sito della lesione e preferenzialmente localizzati in prossimità di vasi sanguigni, suggerendo quindi una possibile relazione neurogenesi-angiogenesi.

La neurogenesi endogena viene anche stimolata in corso di patologie neurodegenerative come la malattia di Huntington (Curtis et al., 2003). Una delle ipotesi è che in corso di questa malattia vi siano stimoli che promuovono il potenziale proliferativo latente delle NSCs nella SVZ come tentativo di riparazione del danno con il reclutamento di nuovi neuroni, ma sino a questo momento è stato individuato solo un transitorio aumento della proliferazione cellulare e non ci sono evidenze di una loro funzionale integrazione nei circuiti neuronali compromessi dalla patologia.

1.4 Isolamento di cellule staminali neurali: il sistema delle neurosfere

Negli ultimi anni la ricerca sulle cellule staminali neurali è stata notevolmente ampliata in vista della possibilità di nuove possibili terapie per malattie neurodegenerative. Le terapie cellulari basate sull'utilizzo di cellule staminali neurali hanno lo scopo di superare i problemi relativi alla scarsa capacità di riparazione di cervelli malati o sottoposti a insulto. Come già detto precedentemente, è stato dimostrato che popolazioni di cellule staminali sono presenti nel cervello adulto e in via di sviluppo e che possono generare progenitori cellulari in grado di differenziare in neuroni, astrociti e oligodendrociti. E' importante capire come le cellule interagiscano con i segnali ambientali per dirigere il loro destino fenotipico e comprendere i meccanismi che ne sottolineano la capacità di automantenimento (Ostenfeld et al., 2002). Per scoprire il potenziale proliferativo e di differenziamento delle NSCs è estremamente importante identificare i geni responsabili della regolazione della proliferazione e del differenziamento e sapere in quale modo agiscono; capire i meccanismi che regolano le funzioni biologiche e fisiologiche delle NSCs; studiare le molecole chiave in grado di aumentare il potenziale di proliferazione e differenziamento delle NSCs endogene verso specifici fenotipi cellulari per determinare la riparazione strutturale e funzionale del

cervello. Precursori cellulari neurali possono essere isolati da diverse regioni germinali del sistema nervoso centrale adulto ed essere coltivati in presenza di mitogeni quali epidermal growth factor (EGF) e bFGF dando origine ad aggregati sferici di cellule in sospensione chiamati neurosfere. Tali neurosfere sono costituite da cellule staminali multipotenti e da progenitori che comprendono una popolazione eterogenea di precursori neurali. Cellule che non possiedono capacità proliferative non sono in grado di formare *clusters* di cellule. Possono essere osservate durante i primi giorni in coltura come singole cellule oppure a gruppi di due o tre cellule, ma non sono potenziali neurosfere (Fernandez et al., 2006). Secondo Ostenfeld e collaboratori (2002) è possibile che le cellule staminali, costituendo neurosfere, generate da diverse regioni del cervello possano mantenere alcune caratteristiche della regione d'origine. E' possibile dunque che una comune cellula staminale sia presente lungo l'intera estensione del nevrassa e che in seguito ad isolamento, si comporta in maniera simile indipendentemente dalla sua origine. Oltre a queste complessità regionali è necessario considerare le differenze riguardanti la generale biologia delle cellule staminali che deve essere indirizzata soprattutto nel contesto di una potenziale applicazione clinica. Tessuti derivanti da una particolare regione del cervello ed espansi in coltura possono assumere il fenotipo di un altro tessuto in seguito a trapianto oppure transdifferenziare in cellule che hanno origine diversa (Bjornson et al., 1999). Ad esempio, cellule derivate da diverse regioni embrionali del cervello ed espanse in coltura adottano i fenotipi della regione ospite quando trapiantate ma alcune di quelle cellule mostrano una memoria molecolare della loro regione d'origine basata sulla espressione di geni o proteine espressi regionalmente. Alcune in seguito a trapianto continuano ad esprimere marcatori associati alla loro regione di origine. Nonostante i pochi dati presenti in letteratura, è possibile isolare precursori di cellule staminali anche dalla SVZ e dal DG di cervello adulto umano (Eriksson et al., 1998; Westerlund et al., 2003; Moe et al., 2005). Per molti anni, le cellule staminali neurali umane sono state considerate come una popolazione omogenea quiescente di cellule indifferenziate. Dati più recenti hanno messo in evidenza che le cellule che formano le neurosfere anche di derivazione umana, così come quelle di derivazione murina, sono eterogenee anche sul piano ultrastrutturale, ed esprimono marcatori specifici per diversi *lineage* dimostrando quindi l'esistenza di distinti fenotipi cellulari all'interno di queste strutture (Suslov et al., 2002;

Bez et al., 2003). Un'altra importante caratteristica del sistema delle neurosfere, è anche l'elevata dinamicità. Infatti studi effettuati da Wang e collaboratori (2006), hanno messo in evidenza che le cellule presenti all'interno delle neurosfere sono capaci di movimento poiché sono in grado di spostarsi dalla periferia fino al centro della sfera e che la migrazione cellulare è un processo che avviene continuamente all'interno di queste strutture.

Le neurosfere possono essere caratterizzate per quel che riguarda l'espressione antigenica tramite l'utilizzo di diverse tecniche fra cui *microarray*, citometria a flusso, immunocitochimica. Il vantaggio di quest'ultima tecnica sta nel fatto che consente di mantenere le sfere intatte cosicché sia possibile fare una descrizione dei diversi marcatori dalla periferia al cuore della neurosfera stessa. Per poter osservare una marcatura relativa ai diversi stadi di differenziamento delle cellule prese in esame e per capire a quale *lineage* sono *committed* vengono utilizzati marcatori specifici quali:

nestina che rivela lo stato indifferenziato di queste cellule di origine neuroectodermica. La nestina infatti è un filamento intermedio espresso dalle cellule in divisione durante i primi stadi di sviluppo nel sistema nervoso centrale ed in altri tessuti. Per osservare le cellule in stato proliferativo vengono utilizzate le *minichromosome maintenance proteins* (MCM2), proteine regolatrici che assicurano che la replicazione del DNA avvenga solo una volta durante il ciclo cellulare. L'espressione di tali proteine aumenta durante il ciclo cellulare raggiungendo un picco nella fase del ciclo che va da G1 a S. Il fenotipo astrocitario viene osservato tramite l'anticorpo GFAP, mentre il *lineage* neurale è dato dall'utilizzo di doblecortina che è un marcatore della neurogenesi adulta. Elementi doblecortina positivi possono essere identificati nel cuore della neurosfera ed anche in alcune cellule che hanno iniziato a migrare al di fuori del *cluster*. Il *lineage* oligodendrogliale viene identificato con il marcatore per gli oligodendrociti maturi (clone RIP) (Fernandez et al.,2006).

Per arrivare alla fase di differenziamento, è necessario che le neurosfere riescano a trovare un substrato appropriato al quale si possono attaccare per dare origine spontaneamente ai diversi fenotipi neurali.

Per studiare inoltre l'espressione di differenti proteine e geni e i marcatori dei vari tipi cellulari nei diversi stadi del loro *lineage* si possono utilizzare tecniche basate sull'uso di proteine e RNA messaggero.

Inoltre, la proliferazione cellulare delle sfere può essere misurata attraverso l'analisi del diametro che dà una indicazione sul numero di cellule contenute al loro interno, mentre la sopravvivenza cellulare può essere studiata con il saggio *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide* (MTT) che dà informazioni quantitative riguardo la vitalità delle cellule misurando l'attività dell'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi.

2. SCOPO DELLA RICERCA

I risultati presentati in questa tesi si riferiscono ad alcuni dei dati ottenuti in un ampio piano di lavoro che vede impegnato il nostro laboratorio nello studio delle cellule staminali neurali con particolare riferimento a:

1. regolazioni in situ delle cellule staminali endogene in corso di malattie sperimentali, differenziando in particolare condizioni patologiche caratterizzate da intensa infiammazione rispetto a condizioni senza o con minima infiammazione
2. isolamento di cellule staminali neurali da cervelli normali e da cervelli patologici, nell'intento di definire alterazioni delle loro proprietà (proliferazione e lineage), legate alla patologia spontanea o sperimentale dei cervelli dai quali sono derivate, anche nell'intento di studiarne meccanismi di regolazione genetica, epigenetica e farmacologica

Più in particolare un primo lavoro è dedicato allo studio della vulnerabilità del sistema colinergico implicato in apprendimento e memoria. L'esperimento si riferisce ad un trattamento prenatale con glucocorticoidi, ormoni che, come già ricordato, modificano in maniera importante la neurogenesi ippocampale. In questo esperimento si è voluto valutare se l'effetto del trattamento prenatale con glucocorticoidi modificava la vulnerabilità di neuroni colinergici ad una lesione selettiva indotta con l'immunotossina saporina coniugata all'anticorpo contro il recettore p75 (clone 192). Questo esperimento, inserito nel piano di lavoro previsto per questo dottorato, ha consentito il *training* su tecniche neurochirurgiche applicate all'animale da esperimento, tecniche di studio comportamentale e biochimico del sistema colinergico e tecniche di studio dell'espressione delle neurotrofine.

I lavori successivi inclusi in questa tesi fanno specifico riferimento alle cellule staminali neurali. In particolare il secondo lavoro è dedicato ad uno studio in vivo delle cellule staminali e la loro caratterizzazione fenotipica con riferimento all'espressione di recettori per le neurotrofine. In particolare si è descritta la presenza del recettore p75 nella SVZ dove è espresso in cellule in attiva proliferazione.

Gli ultimi tre lavori presentati in questa tesi sono realizzati utilizzando il sistema delle neurosfere.

Un lavoro raccoglie una versione avanzata dei protocolli di isolamento e di espansione di cellule staminali neurali come derivate da cervelli adulti in sospensione e in condizione *serum-free*. Propone un primo confronto fra le proprietà di cellule staminali derivate da cervelli normali e da cervelli patologici. In particolare derivate da ratti portatori di EAE, modello animale di Sclerosi Multipla.

Il quarto lavoro incluso in questa tesi, è un manoscritto ancora in preparazione che riporta dati relativi all'azione dell'ormone tiroideo sulla regolazione in vitro di cellule staminali neurali derivate da cervelli normali con riferimento sia al controllo del rate proliferativo che alla differenziazione in cellule nervose, astrociti e oligodendrociti.

L'ultimo lavoro incluso nella tesi (*submitted paper*), fa riferimento ai dati ottenuti dall'analisi di una serie di campioni di ippocampo umano ottenuti attraverso la collaborazione con la divisione di Neurochirurgia dell'Ospedale Bellaria di Bologna, dai quali siamo stati in grado di isolare con successo cellule staminali neurali. Questi campioni derivano da ippocampi di pazienti affetti da epilessia farmaco-resistente che vengono completamente rimossi ovviamente per ragioni terapeutiche. In questo lavoro abbiamo descritto l'isolamento e la produzione di neurosfere, la loro differenziazione nei tre lineage neurali e abbiamo anche applicato criteri di quantificazione dimostrando che è possibile ottenere informazioni quantitative relative a cellule staminali neurali endogene, attraverso l'*assay* in vitro delle neurosfere.

3. MATERIALI E METODI

Per una descrizione più dettagliata dei metodi si rimanda ai singoli lavori

3.1 Materiali e metodi per studi *in vivo*

3.1.1. Animali

Si sono utilizzati animali della Charles River Laboratories Italia (Calco, Lecco) ed in particolare: ratte femmine gravide Sprague Dowley apatogeni del peso di 125-150g all'inizio degli esperimenti, ratti maschi del ceppo CD del peso di 125-150 gr. Tutti gli animali sono stati stabulati in gabbie di plexiglas in numero e in condizioni conformi alle norme vigenti, in condizioni standard di luce e buio (luce dalle 7.00 a.m. alle 7.00 p.m.), temperatura 19-22 °C, umidità 45 %, cibo e acqua *ad libitum*.

Tutte le sperimentazioni sono state eseguite dopo approvazione dei comitati etici e comunque in accordo con le “*European Community Council Directives*” del 24 Novembre 1986 (86/609/EEC). Per ogni sperimentazione ciascun gruppo di animali varia da 4 a 10.

3.1.2. Trattamenti e Chirurgia

Trattamento prenatale con glucocorticoidi

Le ratte gravide sono state trattate eseguendo una iniezione intraperitoneale dell'ottavo giorno di gestazione fino al parto con desametazone (DEXA; Soldesam 0,1 mg/Kg), betametazone (Beta; Bentelan 0,1 mg/Kg) e con saline (0,9% NaCl in acqua sterile).

Lesione con ¹⁹²IgG-Saporina

Dopo averli anestetizzati, agli animali viene praticato con un trapano un foro nel cranio alle seguenti coordinate: Ant-Post: - 0.13 mm, Lat: - 0.10 mm, Prof: -0.45 mm dal Bregma.

Con una siringa Hamilton è stata iniettata nel ventricolo laterale la tossina ¹⁹²IgG-Saporina (Saporina coniugata all'anticorpo per il recettore a bassa affinità per le neurotossine, clone IgG-192; Advanced Targeting Systems, San Diego, CA, USA), a dosi diverse nelle differenti condizioni sperimentali (2-3mg/4.5ml/animale). Gli animali di controllo non sono stati lesionati.

3.1.3. Morris Water Maze

Il test viene eseguito in una stanza illuminata da lampade alogene regolabili posizionate ai quattro angoli, sulle cui pareti sono poste delle sagome di cartone che serviranno agli animali come punti di riferimento per orientarsi. Al centro della stanza è posizionata una vasca circolare di 185 cm di diametro e 45 cm di altezza riempita con acqua ad una temperatura che varia tra i 22° e i 23°C. In una posizione predeterminata della vasca si trova una piattaforma circolare, dello stesso colore dell'interno della suddetta vasca, di 15 cm di diametro. La piattaforma è posta 1-2 cm al di sotto del pelo dell'acqua e può essere o meno segnalata. A 2.5 mt di altezza, perpendicolarmente al centro della vasca, si trova una telecamera che permette di registrare gli spostamenti degli animali. Le tracce così ottenute vengono analizzate ed elaborate via computer dal *software* Smart DT (Panlab, Barcellona, Spagna). Il *software* suddivide la piscina in quadranti e la piattaforma viene posta all'interno di uno di essi. L'analisi della traccia, in combinazione con i quadranti, fornisce un'indicazione sulla strategia di approccio alla piattaforma. Il test, come applicato in questa sperimentazione, consta di tre blocchi da due *trials* ognuno, durante i quali l'animale viene posizionato all'interno della piscina da punti sempre diversi. L'animale ha 90 secondi per trovare la piattaforma sulla quale, una volta trovata, sosterrà per 15 secondi. Questo gli darà la possibilità di esplorare l'ambiente circostante e memorizzare i punti di riferimento che saranno necessari per il trial seguente. Nel caso in cui l'animale non riesca a raggiungere la piattaforma entro il tempo massimo stabilito vi viene accompagnato dall'operatore. I *trials* sono intervallati da periodi di pausa di 15 secondi durante i quali l'animale può riposare in una vaschetta di plexiglass da cui gli è impossibile vedere l'ambiente circostante.

Il protocollo utilizzato per la sperimentazione relativa alle EAE si svolge in quattro giornate secondo il seguente schema:

- Giorno 1 Acquisizione-1 (A-1): tre blocchi di due *trials* ognuno; il punto di partenza è *random*; la piattaforma è resa visibile attraverso il posizionamento di due bandierine (1cm di lato, 10 cm di altezza) agli estremi del suo diametro.
- Giorno 2 Acquisizione-2 (A-2): tre blocchi di due *trials* ognuno; la piattaforma non è visibile.
- Giorno 8 *Retention* (Ret): un blocco da due *trials*; la piattaforma non è visibile.
- Giorno 9 *Spatial Orientation* (S.O.): un *trial* senza piattaforma.

3.1.4. Istologia e immunoistochimica

Fissazione in vivo

Gli animali sono stati anestetizzati con Cloral Idrato (350 mg/Kg/ml, Sigma). Quando l'animale è profondamente addormentato viene perfuso attraverso l'aorta ascendente con soluzione salina calda (37°C), seguita da Lana's (paraformaldeide 4% (w/v), soluzione satura di acido picrico, tampone Sørensen 0.4 M a pH 6.9, H₂O bidistillata). Nei 20-25 minuti di perfusione si utilizzano 400ml di fissativo. Dopo la decapitazione il cervello e il midollo vengono rimossi e immersi per un tempo che varia dai 90 minuti alle 24 ore in paraformaldeide 4% a 4°C e successivamente immersi per almeno 48 ore in saccarosio al 5% in tampone fosfato Sorensen 0.1M.

Colorazione con Blu di Toluidina

Gli animali vengono perfusi (vedi sopra). Dopo il taglio macroscopico del cervello, il blocco contenente l'area di interesse viene congelato con neve carbonica per pochi secondi. Le sezioni vengono allestite al criostato (Kriostat 1750, Leitz, spessore della sezione 14mm) e conservate a -20°C. Quando le sezioni sono completamente adese al vetrino si procede direttamente alla colorazione immergendole nel colorante (blu di toluidina 0.0083 g/ml in acido acetico 0.2M + sodio acetato 0.2M) per circa 6 min.; successivamente le sezioni sono lavate per 5 secondi in acqua bidistillata, disidratate 20 secondi in alcool 70-90-100, passate 2 min. in xilolo e infine montate con Eukitt (Kindler, Freiburg, Germany).

Immunofluorescenza Indiretta

Dopo la perfusione (vedi sopra) e il congelamento della regione d'interesse con neve carbonica, le sezioni vengono allestite al criostato, 14 mm di spessore e tenute a -20°C fino al momento dell'uso. I vetrini vengono portati a temperatura ambiente per 30 minuti e viene eseguita un'idratazione con PBS per 15-30 minuti. Le sezioni sono incubate con anticorpo primario diluito in PBS-Triton_{x-100} 0.3% (a 4°C, per tutta la notte in camera umida). Le sezioni vengono successivamente lavate con PBS (2x15 minuti) ed incubate con l'anticorpo coniugato con una molecola fluorescente diluito in PBS-

Triton_{x-100} 0.3%. Gli anticorpi secondari coniugati con fluorocromo (Jackson Immuno Research Laboratories, INC, PA) sono usati ad una diluizione di 1:100 in PBS-Triton_{x-100} 0.3% ed incubati a 37°C per 30 min. Dopo aver effettuato 2 lavaggi di 15 min. ciascuno con PBS, i vetrini vengono montati con fenilendiammina (fenilendiammina 0.1% glicerina-PBS 50% tampone borato, pH 8.6). Gli anticorpi utilizzati sono indicati nella seguente tabella.

Anticorpi primari

Anticorpo	Specie	Diluizione	Ditta
Trk-A	Rabbit	1:100	Upstate Biotechnology, NY
TrkB	Rabbit	1:150	S.Cruz biotechnology,U.S.
P75	Goat	1:100	S.Cruz biotechnology,U.S.
Ki67	Rabbit	1:400	Novocastra, UK
GFAP	Rabbit	1:300	Euro-Diagnostica
Mab 192	Mouse	1:250	Da E.M Johnson, purificato da L.Aloe, CNR, Roma
EGFr	Sheep	1:75	Upstate Biotechnology, NY
EmbrionicNCAM	Mouse	1:300	PharMingen,Ca
Nestina	Mouse	1:300	PharMingen,Ca
NCL-PCNA	Mouse	1:100	Novocastra, UK
Caspase-3	Rabbit	1:200	Trevigen, MD, USA
BrdU	Mouse	1:150	Boeringher Mannheim, Germany

Anticorpi secondari

Anticorpo	Specie	Diluizione	Fluorocromo	Ditta
Rabbit IgG	Donkey	1:75	Cy2	Jackson Immuno Research Laboratories
Mouse IgG	Donkey	1:50	Cy2	Jackson Immuno Research Laboratories
Goat IgG	Donkey	1:100	Cy2	Jackson Immuno Research Laboratories
Rat IgG	Donkey	1:100	RRX	Jackson Immuno Research Laboratories
Rabbit IgI	Donkey	1:75	RRX	Jackson Immuno Research Laboratories
Mouse IgG	Donkey	1:100	RRX	Jackson Immuno Research Laboratories
Goat IgG	Donkey	1:100	RRX	Jackson Immuno Research Laboratories

Studi di proliferazione mediante bromodesossipurina (BrdU)

Gli studi di proliferazione cellulare sono stati eseguiti mediante incorporazione di bromodesossipurina (BrdU) (Sigma, St.Louis MO).

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, 24 ore prima del sacrificio. Il giorno del sacrificio i ratti sono anestetizzati con ketamina (10mg/Kg) (Ketavet 100, Parke Davis, Italia) e successivamente perfusi attraverso l'aorta ascendente con soluzione fisiologica (sodio cloruro 0.9%), seguita da paraformaldeide al 4% in tampone fosfato Sorensen 0.1M, pH 7.4. I cervelli sono rimossi e immersi per 24 ore in paraformaldeide 4% a 4°C e successivamente in saccarosio 5% per le successive 24 ore. La regione d'interesse viene macroscopicamente tagliata e immediatamente congelata con CO₂. I pezzi che non sono immediatamente processati sono conservati a -80°C. Le sezioni, 14mm di spessore, sono allestite al criostato (Kriostat 1750, Leitz) e vengono processate *free-floating* mediante la tecnica di immunofluorescenza indiretta (IF) secondo il seguente protocollo. Le sezioni vengono pre-trattate con formammide al 50% (Merck) in 2xSSC (SSC 20x = cloruro di sodio 3M + sodio citrato tribasico biidrato 0.3M, pH 7) per 2 ore a 65°C. Successivamente viene eseguito un lavaggio con 2xSSC a temperatura ambiente della durata di 15 min. seguito poi da un lavaggio di 30 min. in HCl 2N. Si prosegue con un lavaggio di 10 min. in tampone borato 0.1M pH 8.5 a temperatura ambiente a cui seguono una serie di sei lavaggi della durata di 15 min. ciascuno in TBS (0.1 M pH 7.5) (Tris buffer saline) a temperatura ambiente. Dopo i passaggi di preparazione delle sezioni si passa ad una incubazione *overnight* a 4°C con l'anticorpo monoclonale anti BrdU (Boehringer Mannheim, Germania), anticorpo monoclonale di topo che lega specificatamente la BrdU e crea dei legami incrociati con la iodouridina; l'anticorpo per la BrdU non dà origine a reazioni crociate con componenti cellulari endogene quali ad esempio la timidina e l'uridina. Viene usato alla diluizione 1:100 in TBS (0.1 M pH 7.5) addizionato con Triton 0.1%. Seguono due lavaggi di 15 min. in TBS 0.1M pH 7.5 e successivamente un lavaggio di 15 min. in TBS 0.1M pH 7.5 addizionato con Triton 0.1%. Si procede con l'incubazione con l'anticorpo secondario (Donkey-FITC anti-mouse, Jackson) usato 1:40 in TBS (0.1M pH 7.5) addizionato con 0.1% Triton per

un'ora a 37°C. Si eseguono quindi tre lavaggi di 15 min. ciascuno in TBS e si passa al montaggio delle sezioni su vetrini gelatinizzati, preparati sciogliendo a caldo (37°C) in soluzione acquosa gelatina 1% (*powered food grade*, Merck) + CrK 0,05% (cromo potassio solfato ico, Carlo Erba). Le sezioni vengono fatte asciugare (al buio) per permettere la completa adesione al vetrino; in seguito vengono montate con coprioggetto in fenilendiammina (50mg fenilendiammina in 5ml PBS + 45ml glicerina + 10 gocce di tampone carbonato).

Metodo Avidina-Biotina (ABC)

Dopo la perfusione (vedi sopra) il cervello viene rimosso ed immerso nel fissativo freddo per 2 ore e quindi immerso per 48 ore in saccarosio 5% in tampone fosfato 0.1M, a 4°C. Sezioni coronali di 50mm di spessore contenenti le aree di interesse sono state allestite utilizzando un vibratomo (Vibratome Series 1000, Lancer Sectioning System, St Louis, MO. USA) ed immediatamente processate per la tecnica *avidin-biotin peroxidase complex*. Le sezioni, *free-floating*, vengono immerse in PBS 0.1M a temperatura ambiente per 10-30 minuti, pretrattate con H₂O₂ per bloccare l'attività delle perossidasi endogene, e quindi incubate con *normal serum* 1.5-2%. Segue l'incubazione a 4°C con gli anticorpi primari diluiti in PBS-Triton_{x-100} 0.3%. La specificità della colorazione del peptide è stata accertata dopo una preincubazione *overnight* dell'antisiero (2 mg/ml) diluito alla normale concentrazione di lavoro in una soluzione contenente *normal serum* 1% della stessa specie in cui è stato prodotto il secondario, albumina di siero bovino (BSA) e PBS-Triton_{x-100} 0.3%. Le sezioni vengono lavate in PBS per 30 minuti e quindi incubate con l'immunoglobulina biotinilata (anti-topo o anti-pecora) (Dako, Denmark) diluita in PBS-*normal serum* 1% per 2 ore a temperatura ambiente. Le sezioni vengono quindi nuovamente lavate in PBS ed infine incubate utilizzando il complesso *horseradish peroxidase* (HRP; Amersham, UK) diluita in PBS per 30 minuti a temperatura ambiente. Per evidenziare l'immunocomplesso si è utilizzata la 3.3'-diaminobenzidina (Sigma St. Louis, MO, USA; 0.5mg/ml in Tris-HCl 0.1M, pH 7.5 + H₂O₂ 0.03%). Dopo un lavaggio in PBS, le sezioni vengono montate su vetrino gelatinizzato, fatte asciugare e montate con Eukitt.

Colorazione nucleare mediante Hoechst-33258

Per evidenziare lo stato di aggregazione della cromatina è stata utilizzata la colorazione con Hoechst-33258 come segue: si effettuano 3 lavaggi delle sezioni di 10 min. l'uno con PBS-Triton 0.2% , viene successivamente posto il colorante (Hoechst 33258, 1mg/ml PBS) sulle sezioni per 20 min. a temperatura ambiente; seguono 3 lavaggi da 10 min. con PBS-Triton 0.2% ed infine si montano i vetrini con una soluzione contenente glicerolo al 50%, 0.044M citrato, 0.111M tampone fosfato pH 5.5.

La coesistenza p75/Hoechst viene evidenziata con una doppia colorazione. Dopo visualizzazione del recettore p75 mediante immunofluorescenza indiretta e fluorocromo Red-X, viene eseguita la colorazione con colorante Hoechst, come descritta. Dopo 3 lavaggi da 10 min. con PBS-Triton 0.2% i vetrini vengono montati con glicerolo al 50%, 0.044M citrato, 0.111M tampone fosfato pH 5.5.

3.1.5. Dosaggio attività colina acetil transferasi (ChAT)

Gli animali sono stati sacrificati per decapitazione previa anestesia con Cloral idrato (350 mg/Kg/ml, Sigma). Le aree d'interesse sono state prelevate da entrambi gli emisferi cerebrali, e sono state immediatamente congelate in azoto liquido e conservato a -80°C fino al momento dell'utilizzo. I campioni vengono omogeneizzati meccanicamente con dispersore *politron* (S25NG8 per volume da 0.3-5 ml) a 19000 X g per dieci secondi in un tampone di estrazione contenente: NaCl 50mM, Tris 50mM, DTT 0.1 mM, EDTA 0.5 mM (Acido etilenediaminatetracetico) pH 7.4, NaN_3 0.05%, PBS-Triton_{x-100} 0.1%, un *cocktail* di inibizione delle proteasi (SIGMA, London, UK). Dopo 15 minuti di centrifugazione a 10.000 rpm, si preleva il surnatante e si usa per il dosaggio enzimatico della ChAT. L'attività della ChAT è stata determinata come di seguito descritto. I surnatanti sono stati diluiti in funzione dell'area studiata, con un tampone di diluizione costituito da NaCl 50mM, Tris 50mM, DTT 0.1mM, EDTA 0.5mM pH 7.4, NaN_3 0.05% e 1 mg/ml di albumina di siero bovino (BSA). Segue un'incubazione a 37°C per 15 min. con un mix di reazione che consiste in NaCl 0.4 M, EDTA 1mM, Eserina emisolfato 0.4mM (SIGMA), Colina Cloruro 150mM (SIGMA), Acetil Co-A 1.6 mM (SIGMA) e ^3H -Acetil CoA (Amersham Pharmacia Biotech) per un'attività specifica finale di 181 GBq/mmol. La reazione viene arrestata trasferendo i

campioni in un bagno gelato e con l'aggiunta di 1.5 ml di "stop solution" raffreddata in ghiaccio (Na_2HPO_4 3.12mM, NaH_2PO_4 2.5mM, EDTA 0.312mM; contenente sodio tetrafenilborato 6.4mM in acetonitrile). I campioni sono processati in duplicato. I "bianchi" contenenti le stesse componenti della reazione, eccetto gli omogenati, sono stati processati nello stesso modo dei campioni. L'acetilcolina radioattiva formata è stata estratta con un liquido di scintillazione per soluzioni organiche (Beckman) e quantificata con un Beta-counter (Beckman LS 1801 Liquid Scintillation Systems). L'attività della ChAT nei differenti tessuti è stata misurata in nanomoli di acetilcolina formata, per minuti e mg di proteina, a 37°C. La proteina contenuta nei campioni è stata determinata col metodo di Lowry.

3.2 Materiali e Metodi per studi *in vitro*

3.2.1. Pazienti, animali, trattamenti

Reperimento pazienti

La neurogenesi nel giro dentato è stata studiata in 4 pazienti la cui diagnosi clinica era di epilessia farmacoresistente del lobo temporale (ELT). La durata prechirurgica dell'epilessia era di 33, 30, 20 e 25 anni e l'età al momento dell'intervento era rispettivamente di 39, 41, 32, 27 anni. Due dei pazienti erano right sided e due left sided. Due erano maschi e due femmine. Tutti i pazienti reclutati nello studio presentavano sclerosi ippocampale (SI) e una rilevante storia di attacchi febbrili (FS) era presente nei casi 1, 3 e 4. I dati clinici dei pazienti inclusi nello studio sono riportati in tabella I. Il consenso informato era stato ottenuto da tutti i pazienti. Dopo l'intervento, il campione di tessuto incluso il giro dentato dell'ippocampo è stato suddiviso e destinato all'istopatologia e alla coltura cellulare per la generazione di neurosfere.

Animali

Si sono utilizzati animali della Charles River Laboratories Italia (Calco, Lecco) ed in particolare: ratte femmine del ceppo Lewis di 120/125 gr, ratte Dark Agouti (Harlan, Italy) per l'induzione dell'encefalomielite allergica sperimentale (EAE). Ratti maschi

Sprague Dowley apatogeni del peso di 250-400g. Tutti gli animali sono stati stabulati in gabbie di plexiglas in numero e in condizioni conformi alle norme vigenti, in condizioni standard di luce e buio (luce dalle 7.00 a.m. alle 7.00 p.m.), temperatura 19-22 °C, umidità 45 %, cibo e acqua *ad libitum*.

Induzione Encefalomielite allergica sperimentale (EAE)

Sono state utilizzate ratte femmine Lewis (Charles River, Italia) apatogene, del peso di 125-150g. L'EAE è stata indotta mediante iniezione intraplantare bilaterale di una soluzione immunizzante (100ml per ciascuna zampa posteriore), costituita da midollo spinale di cavia (15 g/ml; cavie Hartley, maschi, Charles River Laboratories, Italia), Ajuvante di Freund (50% v/v; SIGMA), Micobatterium Tuberculosis H37 RA (5 mg/ml; DIFCO Laboratories, Detroit, Mi, USA) e acqua bidistillata per portare a volume. L'evoluzione clinica della malattia è stata seguita dal giorno 0 (immunizzazione) al giorno 139 (fine dell'esperimento). Il progredire della EAE è stato seguito valutando il peso corporeo e, bisettimanalmente lo sviluppo dei deficit neurologici secondo il punteggio di seguito riportato

- valore 1: flaccidità della coda
- valore 2: debolezza degli arti posteriori
- valore 3: atassia grave degli arti posteriori
- valore 4: paresi degli arti posteriori
- valore 5: paresi ed incontinenza

3.2.2. Allestimento di colture primarie di cellule staminali neurali di ratto (NSC)

Le colture primarie di cellule staminali neurali sono state preparate a partire dalla porzione anteriore delle pareti laterali della zona subventricolare di ratto appartenente ai ceppi sopra indicati seguendo la procedura descritta da Clarke con opportune modifiche. Una volta effettuata la dissezione del tessuto (sotto microscopio stereotassico) da entrambi gli emisferi cerebrali, questo viene disgregato enzimaticamente con una soluzione costituita da tripsina (SIGMA) (1.3mg/ml), ialuronidasi (SIGMA) (0.7mg/ml), deossiribonucleasi (DNasi) (SIGMA) (1000U), glucosio (SIGMA)

(5.4mg/ml) sciolti in HBSS (Hank's Balance Salt Solution) (GIBCO), incubando a 37°C per 20 minuti. Dopo aver disgregato il tessuto meccanicamente con una pasteur allungata si filtra con filtro di nylon da 70mm. Successivamente viene aggiunta una soluzione contenente BSA (40mg/ml) (SIGMA), HEPES (20mM) (GIBCO) in EBSS (Eagle's Balance Salt Solution) (GIBCO), pH 7.5 il tutto è centrifugato e il pellet risospeso nel terreno di coltura costituito da DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) / F12 (1:1) GLUTAMAX I (GIBCO), HEPES (8mM) penicillina (SIGMA) (100U/ml), streptomina (SIGMA) (100mg/ml), B27 (GIBCO), N-2 (GIBCO). Una volta seminate le cellule ad una densità compresa fra 3 e 5×10^3 cellule/cm² vengono trattate con i mitogeni EGF (GIBCO) (20ng/ml) e bFGF (GIBCO) (10ng/ml) aggiunti poi ogni 48 ore. In queste condizioni le cellule proliferano dando origine ad aggregati cellulari organizzati in neurosfere che aumentano di dimensioni al passare dei giorni in coltura.

Le neurosfere primarie possono essere usate per la caratterizzazione immunocitochimica una volta attaccate ad un substrato opportuno oppure per la generazione di neurosfere secondarie che a loro volta possono essere usate per l'immunocitochimica e per lo studio del differenziamento dopo lo splitting.

Le neurosfere primarie destinate ad essere caratterizzate con immunocitochimica vengono piastrate su *coverslips* trattati con 0.5ml di poli-L-Ornitina (10mg/ml) (SIGMA) per un'intera notte a temperatura ambiente in agitazione. I *coverslips* vengono poi lavati con H₂O₂ bidistillata e trattati nuovamente con Laminina (10mg/ml) (SIGMA) per 2 ore a 37°C. I pozzetti sono poi lavati con PBS e mantenuti sotto flusso laminare e UV per almeno 3 ore al fine di lasciarli asciugare e sterilizzare. Le neurosfere primarie vengono seminate su tali substrati con puntali larghi ad una densità di 50-100 neurosfere/pozzetto al 6-7 DIV dopo essere state contate, prelevate dalle piastre in cui si sono espanse e centrifugate a 1500rpm.

Quando, invece, le neurosfere primarie vengono splittate e indotte a generare neurosfere secondarie o lasciate differenziare, esse vengono prelevate dalle piastre di coltura e centrifugate a 1500 rpm. Successivamente sono disgregate enzimaticamente mediante incubazione con una soluzione di tripsina/EDTA (acido etilenediamino-tetra-acetato) (SIGMA) 1x A 37°C per 8 min e per poi essere nuovamente centrifugate. Il pellet viene disgregato ulteriormente con una pasteur con la punta allungata e risospeso in una

soluzione contenente 40 mg/mL BSA, 20 mM HEPES in EBSS a pH 7.59. Segue un'ultima centrifugazione dopo la quale il pellet è risospeso in medium privo di siero. Le cellule possono essere riposte in coltura ad una densità compresa fra 3 e 5×10^3 cells/cm² per dare origine a neurosfere secondarie in presenza di mitogeni, alle concentrazioni e nei tempi indicati sopra. In caso contrario, le cellule sottoposte a splitting vengono lasciate differenziare in assenza di mitogeni per 6-7 DIV dopo semina ad una densità fra 6 e 10×10^3 cellule/cm² su coverslips precedentemente trattati con 0.5ml di poli-L-lisina (50mg/mL -Sigma-) per 1 ora e 30 minuti, lavati con PBS e H₂O₂ bidistillata e lasciati asciugare per almeno 3 ore sotto flusso laminare e UV.

3.2.3. Allestimento di colture primarie di cellule staminali neurali da umano

I campioni di tessuto raccolti dal giro dentato dell'ippocampo sono stati trasferiti al laboratorio di colture cellulari in HBSS (Hanks Balanced Salt Solution -INVITROGEN) freddo, 100U-100 mg/mL di soluzione a base di Penicillina-Streptomicina e processati entro un'ora dall'intervento. Il tessuto è stato, poi, incubato con una soluzione di Tripsina (1,3 mg/ml) e Ialuronidasi (0,7 mg/mL) in HBSS/5,4 mg/mL D-glucosio / 15 mM HEPES (Invitrogen), a 37°C per 45 min e successivamente trattati con DNasi (1000 U) per digerire l'eccesso di DNA. La sospensione così ottenuta è stata filtrata attraverso filtro in nylon (70 mm di diametro- Falcon-) e lavata con una soluzione composta da 40 mg/mL BSA (Sigma), 20mM HEPES, 1x EBSS (Earle's Balanced Salt Solution -Invitrogen-) e centrifugata a 1500 rpm per 5 min. Il pellet è stato, poi, lavato con una soluzione di 0,5x HBSS/0,3mg/mL saccarosio (Merck) al fine di rimuovere i frammenti di mielina. Il pellet cellulare è stato risospeso in medium di coltura privo di siero, DMEM:F12 GlutaMAX I (Invitrogen) addizionato di 8mM HEPES, 2% B27 (Invitrogen), 0,5% N2 (Invitrogen) e 100U-100 mg/mL di penicillina/streptomicina. Le cellule ottenute sono state contate e piastrate ad una densità di $2,4 \times 10^4$ cell/cm². I mitogeni, EGF (20ng/mL) e bFGF (10ng/mL) sono stati aggiunti ogni 48 ore e la metà del medium è stata cambiata una volta per settimana, osservando la formazione di neurosfere entro la prima settimana.

Le neurosfere sono state splittate dopo 22-28 DIVs e le cellule ottenute sono state seminate su *coverslips* trattati con poli-L-Lisina (50mg/mL -SIGMA-) ad una densità

fra 6 e 10 X10³ cellule/cm² Per i dettagli della procedura di splitting si veda Paragrafo precedente. Le cellule sono state poste in coltura nello stesso medium senza aggiungere i mitogeni e mantenute in queste condizioni per 12 giorni di differenziamento spontaneo.

3.2.4. Caratterizzazione morfologica *in vitro*

Immunofluorescenza indiretta

Le neurosfere e le cellule da esse derivate seguono la medesima procedura di immunofluorescenza indiretta. Esse vengono lavate con PBS freddo e fissate con paraformaldeide 4% in tampone Sørensen per 20 minuti a temperatura ambiente e poi lavate ancora con PBS per altri 15 minuti a RT (3 lavaggi da 3 minuti ciascuno). L'incubazione con anticorpi primari diluiti in PBS-Triton X-100 0.3%, è stata effettuata *overnight* a 4 °C.

Sono stati utilizzati gli anticorpi primari indicati nelle tabelle riportate per ciascun lavoro. Dopo aver lavato le cellule o le sfere con PBS per 15 minuti a RT (3 lavaggi da 3 minuti ciascuno), sono state incubate con anticorpi secondari diluiti in PBS-Triton X-100 0.3% per 30 minuti a 37 ° C. Sono stati utilizzati gli anticorpi primari indicati nelle tabelle riportate per ciascun lavoro. Sono state eseguite sia reazioni di immunofluorescenza singole che doppie. Dopo questa seconda incubazione, le cellule sono state incubate con Hoechst33258 per colorarne i nuclei (1mg/ml in PBS 0.2% TRITON X-100) per 20 minuti a Temperatura ambiente. A questo punto i *coverslips* sono stati tolti dal fondo dei pozzetti e montati su vetrini con fenilendiammina e coprioggetto.

Nella Tabella seguente sono riportati gli anticorpi utilizzati nei vari lavori.

Anticorpi Primari

Anticorpo	Specie	Diluizione	Ditta
CNPasi 2',3'-ciclico nucleotide 3'- fosfodiesterasi umana, purificata	Topo	1:1000	CHEMICON, International, Inc. Temecula, CA
MAP2 Proteina associata ai microtubuli, bovino, cervello	Coniglio	1:350	CHEMICON, International, Inc. Temecula, CA
Vimentina Vimentina umana	Topo	1:20	NEN Products, Boston
bIII-tubulin Derivata dai microtubuli, cervello di ratto	Topo	1:1000	R&D system Minneapolis, MN
GFAP Frammento gliale purificato	Topo	1:200	CHEMICON, International, Inc. Temecula, CA
MCM2 human mini- chromosome maintenance protein type 2, amino terminal	Capra	1 : 150	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA
Doublecortina Umana, C-Terminal	Capra	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA

NeuN Nuclei cellulari purificati da cervello di topo	Topo	1:250	CHEMICON, International, Inc. Temecula, CA
Nestina Rat-401	Topo	1:500	BD Pharmingen San Diego, CA
Rip Bulbo Olfattorio di ratto	Topo	1:2500	CHEMICON, International, Inc. Temecula, CA
NG2 Linea cellulare che esprime forma troncata di NG2	Topo Coniglio	1:75 1:250	CHEMICON, International, Inc. Temecula, CA
Musashi Peptide sintetico di AA 5-21 of Musashi	Coniglio	1:100	CHEMICON, International, Inc. Temecula, CA
EGFr	Pecora	1.75	Upstate
NF	Coniglio	1:100	CHEMICON, International, Inc. Temecula, CA
MBP Proteina Basica della mielina	Coniglio	1:200	DAKO
A2B5	Topo	1:1000	CHEMICON, International, Inc. Temecula, CA

Anticorpi Secondari

Anticorpo	Specie	Diluizione	Fluorocromo	Ditta
Rabbit IgG	Donkey	1:75	Cy2	Jackson Immuno Research Laboratories
Mouse IgG	Donkey	1:50	Cy2	Jackson Immuno Research Laboratories
Goat IgG	Donkey	1:100	Cy2	Jackson Immuno Research Laboratories
Rat IgG	Donkey	1:100	RRX	Jackson Immuno Research Laboratories
Rabbit IgI	Donkey	1:75	RRX	Jackson Immuno Research Laboratories
Mouse IgG	Donkey	1:100	RRX	Jackson Immuno Research Laboratories
Goat IgG	Donkey	1:100	RRX	Jackson Immuno Research Laboratories

Analisi delle neurosfere

Il numero e le dimensioni delle sfere sono stati valutati durante i giorni di coltura mediante conta ed analisi morfometrica a 3, 6, 16 e 22 DIVs (*days in vitro*) tramite il software Image-Pro Plus. Entrambi i parametri, il numero e le dimensioni delle neurosfere formatesi, sono stati considerati per calcolare il *rate* di proliferazione tramite la formula:

$$\text{diametro medio} \times n^{\circ} \text{ neurosfere}$$

Le neurosfere sono state classificate in base al loro diametro medio. Neurosfere con diametro medio compreso fra 0-50 μm hanno un punteggio pari ad 1; Neurosfere con diametro medio compreso fra 50-100 μm hanno un punteggio pari a 2; neurosfere con diametro medio $\geq 100 \mu\text{m}$ hanno un punteggio pari a 3. Dunque, il numero di neurosfere con punteggio 1, 2 o 3 è stato ricavato e i numeri ottenuti sono stati espressi in percentuale.

Saggio MTT

MTT è un saggio colorimetrico per lo studio della sopravvivenza e della proliferazione

delle cellule dei mammiferi. Le succinato deidrogenasi mitocondriali presenti nelle cellule vitali usano MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (SIGMA) (colorante giallo) come substrato trasformandolo in cristalli di formazan (blu). L'intensità della colorazione blu ottenuta dopo la dissoluzione dei cristalli di formazan da un'informazione quantitativa circa le cellule vitali presenti.

1. Centrifugazione delle neurosfere (500 xg, 5 min)
2. Aggiungere 50 ml di soluzione di MTT al *pellet*, trasferire in pozzetti e lasciare in incubatore per 2 ore al riparo della luce.
3. Aggiungere lo stesso volume 50 ml di soluzione a base di 10% triton X-100 in 0,1N HCl (MERK)/isopropanolo (MERK) mescolando accuratamente e lasciare 1 ora a temperatura ambiente sull'agitatore.
4. Misurare l'assorbanza a 570nm.

3.2.5. RT-PCR

Estrazione mRNA e Trascrizione Inversa

La procedura di estrazione del mRNA dipende dal kit impiegato ed è pertanto indicata dalla ditta produttrice del kit stesso. 100 ng di mRNA vengono trattati con 1U/ml di DNasi (Fermentas, Life Sciences) in presenza di DTT (SIGMA) e con 4U/ ml di RNasi (Fermentas, Life Sciences) a 37° C per 30 minuti. La DNasi viene poi inattivata al calore a 95° C per 2 minuti e l'mRNA è incubato in presenza di 1X-First Strand Buffer (Fermentas, Life Sciences), 1 mM di ciascun desossinucleotide trifosfato d(NTP)s (SIGMA), 50 mM p(dN)₆ random primers (ROCHE Molecular Biochemicals) e 200U di enzima RT (trascrittasi inversa) (Fermentas, Life Sciences), a 42° C per 60 minuti. L'enzima RT è poi inattivato al calore a 70° C per 10 minuti.

RT-PCR quantitativa

I coloranti che legano il DNA usati come fattori per la PCR quantitativa (QPCR) ad esempio il SYBR green sono efficaci e facili da usare. Se il disegno dei primer e le reazioni di PCR sono ottimizzati, SYBR green I diventa un fattore più che valido per l'analisi dell'espressione genica. Abbiamo messo a punto le condizioni per lo studio dell'espressione del gene della nestina usando come colorante del DNA il SYBR green

I. I primers a monte e a valle per la Nestina sono stati disegnati con il software *Beacon Designer 4.0* per l'amplificazione di un frammento di 262 bp. Dal momento che SYBR green I e il colorante di riferimento sono fotosensibili, bisogna evitare di esporli alla luce. Dopo aver determinato le concentrazioni ottimali di primer per il test, l'andamento della PCR deve essere valutato in termini di efficacia, precisione e sensibilità mediante l'impiego di una serie di diluizioni progressive dello stampo di controllo positivo.

La Mix di reazione è stata preparata a partire da: 1X Brilliant SYBR GREEN QPCR master mix (STRATAGENE), 16nM di colorante di riferimento (ROX), il primer di senso e antisenso ad una concentrazione finale di 0.4mM (MWG-BIOTECH AG). La mix di reazione è stata poi aggiunta a ciascun campione di cDNA mescolando gentilmente ed infine tutti i campioni sono stati posti nella macchina (Mx3005 Real-Time PCR System-STRATAGENE-)che è stata avviata. Il programma selezionato consiste di 1 ciclo di 10 minuti a 95° C; 40 cicli di : 30 secondi a 95° C, 30 secondi a 60° C. Il programma di dissociazione consisteva di 1 ciclo di 1 minuto a 95° C; riscaldamento graduale da 55° C a 95° C.

4. RISULTATI e DISCUSSIONE

Alcuni dei risultati presentati in questa tesi sono già stati pubblicati (**Paper I, II, III**) o sono stati già sottoposti alla rivista scientifica per la pubblicazione (**Paper V**) o sono in preparazione (**IV**): per questi lavori riporteremo solamente un breve riassunto con la presentazione dei risultati, avendo inserito copia delle pubblicazioni e dei manoscritti nella presente tesi.

In questa sezione vengono presentati risultati relativi a:

- Allestimento di un modello di lesione colinergica atto a valutare la vulnerabilità di questi neuroni ad eventi prenatali (**Paper I, II**)
- Studio di zone germinative nel cervello adulto in vivo e mediante *assay* delle neurosfere (**Paper II, III, IV, V**)

4.1 Allestimento di un modello di lesione colinergica atto a valutare la vulnerabilità neuronale ad eventi prenatali

Il sistema nervoso centrale è un sistema altamente complesso la cui vulnerabilità può essere associata a fattori operanti in qualunque fase della vita non esclusa la vita prenatale. Questa serie di fattori, in larga misura non ancora noti, può avere influenze sulla qualità dell'invecchiamento cerebrale ed anche sulla vulnerabilità a malattie neurodegenerative in particolare età dipendenti. Per indagare questi aspetti con particolare riferimento al sistema colinergico abbiamo voluto studiare la risposta dei neuroni colinergici al trattamento prenatale con glucocorticoidi. Questo esperimento si inserisce in un contesto clinico preciso, cioè il trattamento con dosi massive di glucocorticoidi a cui vengono sottoposte madri per favorire la maturazione del feto in caso di parto pretermine.

Paper I

Prenatal glucocorticoid exposure affects learning and vulnerability of cholinergic neurons. Emgard M., **Paradisi M.**, Pirondi S., Fernandez M., Giardino L., Calzà L. *Neurobiol of Aging*, 2006 28:112-121

Il trattamento prenatale con glucocorticoidi sintetici è stato utilizzato per più di vent'anni come terapia clinica per le donne con rischio di parto pretermine. Va ricordato che sono ancora pochi al momento i dati disponibili riguardo gli effetti a lungo termine: monitoraggi in tal senso sono in corso in particolare nei paesi scandinavi nei quali si sta valutando la performance psicocognitiva di adolescenti nati pretermine e trattati con glucocorticoidi. Sono stati utilizzati betametasone e desametasone che attraversano la placenta passando dalla madre al figlio. Elevati livelli di glucocorticoidi nel feto possono modificare lo sviluppo di diversi organi fra cui polmoni, intestino, cuore e reni, ma anche il sistema nervoso può subire l'effetto di tali sostanze in maniera negativa. E' stato osservato che bambini trattati nell'immediato postnatale con desametasone sviluppano una alterazione della capacità motoria e di coordinazione e che il QI è più basso del normale. Inoltre poiché il sistema limbico del feto esprime una notevole quantità di recettori per i glucocorticoidi durante lo sviluppo, rappresenta un sistema

altamente vulnerabile alla presenza di concentrazioni non fisiologiche di tali sostanze come già descritto a seguito di terapie croniche o in caso di prolungato stress prenatale. Grandi quantità di cortisolo o glucocorticoidi endogeni dovuti allo stress materno possono anche indurre cambiamenti permanenti nella risposta ormonale e comportamentale allo stress dei nuovi nati. E' possibile che ci sia anche una alterazione della regolazione a carico del sistema ipotalamo-ipofisario. Un altro aspetto importante riguarda lo studio del sistema colinergico per il suo notevole impatto sui processi cognitivi. La disfunzione di tale sistema può alterare apprendimento e memoria e modificare il declino età-dipendente, ed eventualmente correlare con disordini neurodegenerativi quali ad esempio la malattia di Alzheimer.

Considerando che l'aumento dei livelli di glucocorticoidi dovuto a stress o ai trattamenti farmacologici ha un impatto molto forte sulla struttura ippocampale sia in animali giovani che in adulti e che questi dati sono stati verificati anche nella specie umana, scopo del nostro lavoro è stato valutare l'effetto del trattamento prenatale con i glucocorticoidi su capacità di apprendimento e memoria utilizzando il water maze test, vulnerabilità dei neuroni colinergici in seguito a somministrazione intracerebroventricolare (icv) dell'immunotossina 192-IgG saporina, eseguita in animale adulto.

I risultati ottenuti hanno messo in evidenza che il trattamento prenatale con desametasone può alterare la funzione cognitiva di ratti adulti poiché nella fase di retention del water maze test abbiamo osservato un aumento della latenza nel gruppo di animali nati da madri trattate con questo glucocorticoide rispetto a quelli di controllo o trattate con betametasone. Abbiamo osservato inoltre che la vulnerabilità del sistema colinergico in seguito a lesione con 192IgG saporina aumenta nei ratti trattati durante il periodo prenatale con desametasone e betametasone. E' stata infatti osservata una diminuzione nel numero di entrate nella zona target nella fase di orientamento spaziale del water maze test nel gruppo sottoposto a trattamento prenatale con desametasone e iniezione con immunotossina rispetto al gruppo trattato solo con il glucocorticoide. Inoltre l'attività dell'enzima ChaT diminuisce notevolmente in tutte le aree testate di animali nati da madri trattate, ed una più vistosa riduzione dopo somministrazione di immunotossina i.c.v.

4.2 La zona subventricolare ed il p75

Paper II

p75(NTR)-Immunoreactivity in the subventricular zone of adult male rats: expression by cycling cells. Giuliani A., D'Intino G., **Paradisi M.**, Giardino L., Calzà L. J Mol Histol 2004, 35:749-758

Come già ricordato dell'introduzione una delle zone a più intensa attività neurogenica e gliogenica del cervello adulto è la zona subventricolare del telencefalo (SVZ), ampiamente studiata nei roditori. Nonostante si ritrovi 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. Scopo di questo lavoro è stato quello di indagare i fattori epigenetici di regolazione della popolazione di cellule staminali presenti nella SVZ con particolare riferimento alla espressione di recettori di membrana. L'esperimento è stato condotto mediante tecniche di immunistochemica associate ad una analisi dei preparati in microscopia confocale a scansione laser nella quale gli anticorpi diretti contro ipotetici nuovi marcatori venivano associati ad anticorpi noti per riconoscere marcatori ben definiti di questa popolazione cellulare quali la forma polisialilata acida della proteina NCAM, nestina, recettori per epidermal growth factor (EGF), e fattori di proliferazione quali BrdU somministrata in vivo e Ki67, antigene associato alla proliferazione cellulare.

Nel presente lavoro abbiamo dimostrato che:

1. nella SVZ è espresso il recettore a bassa affinità per le neurotrofine, p75
2. p75 codistribuisce con antigeni associati alla proliferazione quali Ki67 e BrdU
3. p75 codistribuisce modestamente con marcatori quali nestina e EGFr
4. p75 non codistribuisce con PSA-NCAM e neppure con GFAP

I dati da noi ottenuti suggeriscono che p75 potrebbe essere coinvolto nella regolazione del ciclo cellulare di precursori e/o cellule staminali neurali presenti nella SVZ del cervello di ratto adulto. Questa sua azione è già stata ipotizzata in altri sistemi cellulari. Dati provenienti dalla letteratura indicano, inoltre, che il recettore p75 è espresso in

cellule della cresta neurale in mitosi dove probabilmente contribuisce a stabilire l'identità dei neuroni differenziati. Si pensa inoltre che possa avere un ruolo cruciale nel mediare il segnale proapoptotico assieme alla sortilina che potrebbe agire come corecettore. Abbiamo inoltre studiato l'effetto della somministrazione intracerebroventricolare dell'immunotossina 192-IgG saporina sulle cellule che esprimono p75 a livello della SVZ. Nonostante si osservi una drastica diminuzione dell'immunoreattività della popolazione cellulare rispetto a p75, abbiamo visto che il numero totale delle cellule in fase di proliferazione non viene modificato in questa zona. Questo suggerisce che p75 può mediare l'uscita dal ciclo cellulare e giocare un ruolo rilevante nel processo di differenziamento.

4.3 Neurogenesi e comportamento di cellule staminali in corso di malattie neurodegenerative

Una delle domande chiave nella biologia delle cellule staminali neurali endogene è la loro eventuale partecipazione a processi patologici degenerativi che riguardano il sistema nervoso centrale, in altri termini: in un cervello "malato" sono malate anche le cellule staminali endogene? Ed inoltre: in un cervello malato le cellule staminali endogene partecipano o possono essere in qualche modo indotte a partecipare a fenomeni riparativi come avviene in altri tessuti? Queste sono le due domande chiave che guidano la serie di esperimenti che verranno adesso presentati relativi all'isolamento e allo studio in vitro delle cellule staminali neurali.

Paper III

To know neural stem properties from diseased brains: a critical step for brain repair.
Fernandez M., **Paradisi M.**, Giardino L., Calzà L. Neural Stem cells Research, 2006
77-97

Lo studio delle cellule staminali offre una opportunità unica per capire il funzionamento e le caratteristiche biologiche di tali cellule in vista di una possibile applicazione nelle terapie per le malattie neurodegenerative. In questo lavoro in particolare la nostra attenzione è stata focalizzata sullo studio in vitro delle proprietà delle neurosfere

generate da cervelli affetti da patologie neurodegenerative e trattati farmacologicamente. Abbiamo dunque standardizzato un protocollo di isolamento, espansione ed analisi del fenotipo assunto dalle cellule differenziate per lo studio appunto delle neurosfere e cellule derivate per valutare i possibili effetti di malattie sperimentali e trattamenti sulle proprietà biologiche delle cellule staminali. In particolare abbiamo preso in esame cellule derivate dalla SVZ. Cellule staminali prelevate dalla SVZ di ratto adulto e messe in coltura in presenza di mitogeni quali EGF e bFGF, proliferano formando aggregati eterogenei di cellule contenenti anche NSCs. Con il passare dei giorni in vitro, il numero di cellule presenti all'interno degli aggregati aumenta notevolmente e le neurosfere crescono di dimensione. Cellule senza capacità proliferativa non sono in grado di generare i clusters.

In questo lavoro metodologico abbiamo messo a punto un metodo di quantificazione della proliferazione di neurosfere attraverso il saggio MTT contando il numero di neurosfere e attraverso parametri morfometrici quali la misura del diametro delle neurosfere. Abbiamo quindi completato un pannello di studio del fenotipo delle sfere e delle cellule derivate utilizzando una serie di anticorpi che riconoscono gli elementi cellulari dei tre *lineage* a diverso stadio differenziativo. Per quel che riguarda la proliferazione i nostri risultati indicano che al settimo giorno in vitro, il numero di neurosfere generate da NSCs in coltura senza l'aggiunta di mitogeni è significativamente inferiore rispetto alla condizione in cui EGF e bFGF vengono aggiunti; il diametro delle sfere coltivate con i mitogeni è superiore a quelle nelle quali non vengono aggiunti. Dati precedenti del nostro laboratorio hanno dimostrato che le NSCs nella SVZ sono altamente suscettibili alle condizioni del microambiente soprattutto in condizioni infiammatorie come nel caso dell'EAE. L'Encefalomyelite allergica sperimentale è una patologia infiammatoria e neurodegenerativa nella quale esiste una intensa proliferazione in situ delle cellule della SVZ. La somministrazione in vivo di ormone tiroideo, che è il segnale chiave per la generazione di oligodendrociti durante lo sviluppo del SNC, regola la proliferazione delle cellule nella SVZ e favorisce la produzione e maturazione degli oligodendrociti. E' stato inoltre dimostrato che l'EAE induce una estensiva proliferazione di OPCs e che la somministrazione di TH è in grado di promuovere e completare la mielinizzazione (Calzà et al., 1998; 2002; 2005; Fernandez et al., 2004) Abbiamo poi studiato la proliferazione e differenziamento delle

cellule ottenute dalla SVZ di animali di controllo e sottoposti ad induzione di EAE. Per quel che riguarda le neurosfere ottenute da cervelli malati, abbiamo osservato che il numero delle primarie ottenute da EAE ed EAE+T4 è maggiore rispetto al controllo e lo stesso accade per le neurosfere secondarie. Inoltre abbiamo dimostrato che il trattamento con T4 determina una diminuzione del rate proliferativo.

Paper IV

Effect of thyroid hormone on proliferation and differentiation of neuroprecursor cells: an in vitro study of neurospheres derived from the subventricular zone of adult rats.

Fernandez M., **Paradisi M.**, Giardino L., Calzà L. (*manuscript in preparation*)

Gli ormoni tiroidei 3,5,3'-triiodotironina (T3) e 3,5,3,5'-tetraiodotironina (T4) giocano un ruolo chiave nella modulazione dei *pathways* metabolici e regolano l'espressione dei geni bersaglio. Sono di estrema importanza nelle fasi di crescita e sviluppo di molti organi, incluso il sistema nervoso centrale. Infatti la mancanza di ormone tiroideo durante il periodo perinatale risulta nella comparsa di complicazioni a livello fisico e mentale che nell'uomo portano alla comparsa di una sindrome nota come "cretinismo". Gli effetti cellulari degli ormoni tiroidei sono mediati dall'azione di recettori facenti parte della famiglia dei recettori nucleari che sono fattori di trascrizione in grado di reprimere o attivare la trascrizione di dei geni target. I geni che codificano per tali recettori sono due: TRa, TRb. Lo splicing alternativo dell'RNA fa sì che vengano generate due diverse isoforme per ogni gene che codifica per il recettore fra cui TRa1, TRa2, TRb1, TRb2. Il ligando attivo per i recettori è T3 che viene generato dalla conversione di T4 attraverso l'azione dell'enzima deiodenasi. Nel caso di malattie degenerative quali la sclerosi multipla l'ormone tiroideo può giocare un ruolo fondamentale. La sclerosi multipla (MS) è la più comune malattia demielinizzante del sistema nervoso centrale che si sviluppa inizialmente come una malattia infiammatoria immuno-mediata ed evolve manifestando una degenerazione degli oligodendrociti. Essa è caratterizzata da fasi di ricaduta e remissione e può presentarsi in forma acuta, o in forma progressiva secondaria. La principale caratteristica patologica nella MS è la distruzione degli strati di mielina che porta alla formazione di aree di demielinizzazione e patologia assonale che sono correlate con i deficit permanenti e l'atrofia cerebrale che

si sviluppa nel corso della malattia. In questo lavoro abbiamo studiato l'effetto del trattamento in vitro con T3 sui precursori cellulari neurali ottenuti dalla SVZ di ratto adulto, per valutare il *rate* proliferativo delle cellule che crescendo in sospensione originano degli aggregati cellulari eterogenei chiamati neurosfere, e la loro differenziazione. Le neurosfere formate in presenza di ormone tiroideo sono infatti più piccole rispetto a quelle del gruppo di controllo, mentre la percentuale di cellule differenziate con il fenotipo di oligodendrociti (NG2, RIP, CMPASE-immunoreattive) ottenute dal gruppo di trattamento con ormone tiroideo è più alta rispetto al controllo. I risultati che abbiamo ottenuto dimostrano che l'ormone tiroideo induce una diminuzione della proliferazione dei precursori spingendoli a differenziare verso il *lineage* oligodendrogliale. Abbiamo osservato inoltre che i recettori di tale ormone sono regolati in questo processo, come dimostrato dall'innalzamento dei livelli di mRNA per i recettori TRa1 e TRb1. Il trattamento in vitro delle neurosfere con ormone tiroideo provoca un aumento nei livelli di mRNA di Olig-1 che è il gene coinvolto nella induzione dei precursori neurali verso il *lineage* oligodendrogliale. I risultati ottenuti in vitro confermano che l'ormone tiroideo possa avere un ruolo nella regolazione delle cellule staminali neurali endogene favorendo la formazione e la maturazione di nuovi oligodendrociti.

4.4 Neurogenesi e gliogenesi nel giro dentato da tessuto umano adulto

Paper V

In vitro assay for neurogenesis and gliogenesis in adult human dentate gyrus. **Paradisi M.**, Fernandez M., Sivilia S., Marucci G., Giulioni M., Giardino L., Calzà L., *submitted paper*

La produzione di nuovi neuroni da parte di cellule progenitrici nel cervello umano è stata dimostrata sia nella SVZ che nel DG dell'ippocampo. Il significato funzionale della neurogenesi ippocampale nell'adulto è ancora in fase di definizione nonostante diverse evidenze suggeriscano il possibile coinvolgimento nei meccanismi di memoria e apprendimento. Vi sono inoltre diversi dati che indicano come una possibile alterazione della neurogenesi nell'adulto possa essere coinvolta nella fisiopatologia di alcune

patologie quali epilessia, ischemia, disordini neurodegenerativi. Diversi studi fatti su modelli animali indicano che le crisi epilettiche possono indurre neurogenesi e al contrario che uno stato epilettico di lunga durata può inibire la neurogenesi stessa. Comunque il ruolo della neurogenesi nel cervello affetto da epilessia non è ancora stato chiarito ed in particolare non è stato definito se cellule di nuova generazione possono inserirsi in circuiti neuronali funzionanti o aberranti. La proliferazione ed integrazione di nuovi neuroni nel tessuto adulto dipende da fattori quali ambiente, ormoni, età, trattamenti farmacologici e dalla presenza delle malattie degenerative stesse. In questo lavoro abbiamo ricercato la presenza di cellule staminali neurali nel DG mettendo in coltura tessuto derivato dall'ippocampo di pazienti affetti da epilessia farmaco-resistente sottoposti a resezione temporale antero-mesiale. I pazienti sono stati sottoposti a risonanza magnetica ed è stato evidenziato che tutti i casi mostravano sclerosi ippocampale che è caratterizzata da perdita neuronale nelle regioni CA1, CA2, CA3 dell'ippocampo e da gliosi fibrillare. Abbiamo dunque messo in coltura il tessuto in presenza di mitogeni per un tempo sufficiente ad osservare la presenza di cellule in proliferazione che hanno dato origine agli aggregati chiamati neurosfere. Abbiamo poi indotto il differenziamento spontaneo di tali cellule escludendo l'aggiunta dei mitogeni e dopo un certo periodo di tempo abbiamo osservato la formazione delle cellule con fenotipo neurale. I nostri risultati hanno messo in evidenza che è possibile coltivare aggregati di cellule staminali umane a partire da DG dell'ippocampo e che tali cellule in assenza di stimolo proliferativo si differenziano nelle tre linee fenotipiche: oligodendrociti, astrociti e neuroni.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Allen E, 1912. The cessation of mitosis in the central nervous system of the albino rat. *J Comp Neurol* 22:547-568
2. Altman J, Das GD, 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124:319-336
3. Altman J, 1969. 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* 137:433-458
4. Alvarez-Buylla A, Lois A, 1995. Neuronal stem cells in the brain of adult vertebrates. *Stem Cells* 13:263-272
5. Alvarez-Buylla A, Seri B, Doetsch F, 2002. Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. *Brain Res Bull* 57:751-758
6. Alvarez-Buylla A, Lim DA, 2004. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* 41:683-686
7. Bauer S, Hay M, Amilhon B, Jean A, Moyse E, 2005. In vivo neurogenesis in the dorsal vagal complex of the adult rat brainstem. *Neuroscience* 130:75-90
8. Bez A, Corsini E, Curti D, Biggiogera M, Colombo A, Nicosia RB, Pagano SF, Parati EA, 2003. Neurosphere and neurosphere-forming cells: morphological and ultrastructural characterization. *Brain Res* 993:18-29
9. Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL, 1999. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 283:534-537
10. Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM, 2000. From marrow to brain: expression of neural phenotypes in adult mice. *Science* 290:1775-1779
11. Calof A, 1995. Intrinsic and extrinsic factors regulating vertebrate neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 5:19-27
12. Calzà L, Giardino L, Pozza M, Bettelli C, Micera A, Aloe L, 1998. Proliferation and phenotype regulation in the subventricular zone during experimental allergic encephalomyelitis: in vivo evidence of a role for nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:3209-3214

13. Calzà L, Fernandez M, Giuliani A, Aloe L, Giardino L, 2002. Thyroid hormone activates oligodendrocyte precursors and increases a myelin-forming protein and NGF content in the spinal cord during experimental allergic encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:3258-3263
14. Calzà L, Fernandez M, Giuliani A, D'Intino G, Pirondi S, Sivilia S, Paradisi M, DeSordi N, Giardino L, 2005. Thyroid hormone and remyelination in adult central nervous system: a lesson from an inflammatory-demyelinating disease. *Brain Res Brain Res Rev* 48:339-346
15. Cameron HA, McKay RD, 1999. Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nature Neurosci* 2:894-897
16. Cameron HA, McKay RD, 2001. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 435:406-417
17. Charrier C, Coronas V, Fombonne J, Roger M, Jean A, Krantic S, Moysse E, 2006. Characterization of neural stem cells in the dorsal vagal complex of adult rat by in vivo proliferation labeling and in vitro neurosphere assay. *Neuroscience* 138:5-16
18. Chen HL, Panchision DM, 2006. BMP pleiotropism in neural stem cells and their derivatives-alternative pathways, convergent signals. *Stem Cells* 25:63-68
19. Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, Veress B, Nilsson E, Karlstrom H, Lendahl U, Frisen J, 2000. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* 288:1660-1663
20. Corbin JG, Gaiano N, Machold RP, Langston A, Fishell G, 2000. The Gsh2 homeodomain gene controls multiple aspects of telencephalic development. *Development* 127:5007-5020
21. Curtis MA, Penney EB, Pearson AG, van Roon-Mom WM, Butterworth NJ, Dragunow M, Connor B, Faull RL, 2003. Increased cell proliferation and neurogenesis in the adult human Huntington's disease brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:9023-9027
22. Dengke KM et al., 2005. Glial influences on neural stem cells development: cellular niches for adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 15:514-520
23. Doetsch F, 2003. A niche for adult neural stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 13:543-550

24. Doetsch F, Garcia-Verdugo M, Alvarez-Buylla A, 1997. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17:5046-5061
25. Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A, 1999a. Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:11619-11624
26. Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A, 1999b. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97:703-716
27. Emsley JG, Mitchell BD, Kempermann G, Macklis JD, 2005. Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursor, and stem cells. *Prog Neurobiol* 75:321-341
28. Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH, 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Med* 4:1313-1317
29. Fallon JH, Loughlin SE, 1994. Substantia Nigra. In: Paxinos G (Ed), *The rat nervous system*, Academic Press, Sidney Australia, second edition, pp. 215-232
30. Fan Y, Chaillet JR, 2002. Effect of altered gene expression on ES cell differentiation. In: Turksen K (Ed), *Embryonic stem cells methods and protocols*, vol 185, *Methods in molecular biology*, Humana Press, Totowa New Jersey, pp. 45-43
31. Fernandez M, Giuliani A, Pironi S, D'Intino G, Giardino L, Aloe L, Levi-Montalcini R, Calzà L, 2004. Thyroid hormone administration enhances remyelination in chronic demyelinating inflammatory disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:16363-16368
32. Fernandez M, Paradisi M, Giardino L, Calzà L, 2006. To Know Neural Stem Properties From Diseased Brain: A critical step for Brain Repair. In: Greer, Erik EV (Ed), *Neural Stem Cells Research*. Nova Science Publishers Inc, New York, pp. 77-97
33. Fields RD, Stevens-Graham B, 2002. New insight into neuron-glia communication. *Science* 298:556-562
34. Frielingsdorf H, Schwarz, Brundin P, Mohapel P, 2004. No evidence for new

- dopaminergic neurons in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:10177-10182
35. Gadisseux JF, Evrard P, Misson JP, Caviness VS, 1989. Dynamic structure of the radial glial fiber system of the developing murine cerebral wall. An immunocytochemical analysis. *Dev Brain Res* 50:55-67
 36. Gage FH, Ray J, Fisher LJ, 1995. Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. *Annu Rev Neurosci* 18:159-192
 37. Gage FH, Taupin P, 2002. Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *J Neurosci Res* 69:745-749
 38. Galli R, Borello U, Gritti A, Minasi MG, Bjornson C, Coletta M, Mora M, De Angelis MG, Fiocco R, Cossu G, Vescovi AL, 2000. Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nat Neurosci* 3:986-991
 39. Haydon PG, 2001. GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci* 2:185-193
 40. Hinds JW, Ruffett TL, 1971. Cell proliferation in the neural tube: an electron microscopic and golgi analysis in the mouse cerebral vesicle. *Z Zellforsch* 115:226-264
 41. Hoglinger GU, Rizk P, Muriel MP, Duyckaerts C, Oertel WH, Caille I, Hirsch EC, 2004. Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat Neurosci* 7:726-735
 42. Holtzer H, 1978. Cell lineages, stem cells and the “quantal” cell cycle concept. In: Lord BI, Potten CS, Cole RJ (Eds), *Stem cells and tissue homeostasis*. Cambridge University Press, pp. 1-28
 43. Honovar M, Meldrum BS, 1997. Epilepsy. In: Graham DI, Lantos PL (Eds), *Greenfield's Neuropathology, Sixth Ed.*, London, pp. 931-971
 44. Horner PJ, Power AE, Kempermann G, Kuhn HG, Palmer TD, Winkler J, Thal LJ, Gage FH, 2000. Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord. *J Neurosci* 20:2218-2228
 45. Jagasia R, Song H, Gage FH, Lie DC, 2006. New regulators in adult neurogenesis and their potential role for repair. *Trends Mol Med* 12:400-405
 46. Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA, 2002. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad*

Sci USA 99:11946-11950

47. Jin K, Wang X, Xie L, Mao XO, Zhu W, Wang Y, Shen J, Mao Y, Banwait S, Greenberg DA, 2006. Evidence for stroke-induced neurogenesis in the human brain. Proc Natl Acad Sci USA 103:13198-13202
48. Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J, 1999. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. Cell 96:25-34
49. Katakowski M, Chen J, Zhang ZG, Santra M, Wang Y, Chopp M, 2007. Stroke-induced subventricular zone proliferation is promoted by tumor necrosis factor- α -converting enzyme protease activity. J Cereb Blood Flow Metab 27:669-678
50. Kirschenbaum B, Goldman SA, 1995. Brain-derived neurotrophic factor promotes the survival of neurons arising from the adult rat forebrain subependymal zone. Proc Natl Acad Sci USA 92:210-214
51. Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH, 1996. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. J Neurosci 16:2027-2033
52. Leblond CP, 1964. Classification of cell populations on the basis of their proliferative behaviour. National Cancer Institute 14:119-150
53. Levison SW, Goldman JE, 1993. Both oligodendrocyte and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat forebrain. Neuron 10:201-212
54. Lie DC, Dzieczapolski G, Willhoite AR, Kaspar BK, Shults CW, Gage FH, 2002. The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential. J Neurosci 22:6639-6649
55. Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, Herrera DG, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A, 2000. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. Neuron 28:713-726
56. Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP, 2000. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. J Clin Invest 105:71-77
57. Liu X, Wang Q, Hayder TF, Bordey A, 2005. Nonsynaptic GABA signalling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. Nature Neurosci 8:1179-1187
58. Lois C, Alvarez-Buylla A, 1993. Proliferating subventricular zone cells in the adult

- mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:2074-2077
59. Lois C, Alvarez-Buylla A, 1994. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264:1145-1148
60. Lois C, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A, 1996. Chain migration of neuronal precursor. *Science* 271:978-981
61. Magnus T, Rao MS, 2005. Neural stem cells in inflammatory CNS diseases: mechanisms and therapy. *J Cell Mol Med* 9:303-319
62. McMahon JA, Takada S, Zimmerman LB, Fan CM, Harland RM, McMahon AP, 1998. Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. *Genes Dev* 12:1438-1452
63. Merkle FT, Alvarez-Buylla A, 2006. Neural stem cells in mammalian development. *Curr Opin Neurobiol* 18:704-709
64. Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR, 2000. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 290:1779-1782
65. Moe MC, Varghese M, Danilov AI, Westerlund U, Ramm-Petersen J, Brundin L, Svensson M, Berg-Johnsen J, Langmoen IA, 2005. Multipotent progenitor cells from the adult human brain: neurophysiological differentiation to mature neurons. *Brain* 128:2189-2199
66. Monje ML, Toda H, Palmer TD, 2003. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* 302:1760-1765
67. Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines WA, Morassutti D, Weiss S, van der Kooy D, 1994. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 13:1071-1082
68. Moyse E, Bauer S, Charrier C, Coronas V, Krantic S, Jean A, 2006. Neurogenesis and neural stem cells in the dorsal vagal complex of adult rat brain: new vistas about autonomic regulations. A Review. *Autonomic Neurosci: Basic and Clinical* 126-127:50-58
69. Mujtaba T, Rao MS, 2002. Isolation of lineage-restricted neural precursor from

- cultured ES cells. In: Turksen K (Ed), Embryonic stem cells methods and protocols, vol 185, Methods in molecular biology, Humana Press, Totowa New Jersey, pp.189-204
70. Nait-Oumesmar B, Decker L, Lachapelle F, Avellana-Adalid V, Bachelin C, Van Evercooren AB, 1999. Progenitor cells of the adult mouse subventricular zone proliferate, migrate and differentiate into oligodendrocytes after demyelination. *Eur J Neurosci* 11:4357-4366
 71. National Institutes of Health (NIH) report, 2001. Stem cells: scientific progress and future research directions
 72. Ohab JJ, Fleming S, Blesch A, Carmichael ST, 2006. A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *J Neurosci* 26:13007-13016
 73. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P, 2001. Bone marrow cells regenerated infarcted myocardium. *Nature* 410:701-705
 74. Ostenfeld T, Joly E, Tai Y-T, Peters A, Caldwell M, Jauniaux E, Svendsen CN, 2002. Regional specification of rodent and human neurospheres. *Dev Brain Res* 134:43-55
 75. Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH, 2000. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* 425:479-494
 76. Palmieri A, Najm I, Avanzino G, Babb T, Guerrini R, Foldvary-Schaefer N, Jackson G, Luders HO, Prayson R, Spreafico R, Vinters HV, 2004. Terminology and classification of the cortical dysplasias. *Neurology* 62(Suppl.3):S2-S8
 77. Panganiban G, Rubenstein JL, 2002. Developmental functions of the Distal-less/Dlx homeobox genes. *Development* 129:4371-4386
 78. Paterson JA, Privat A, Ling EA, Leblond CP, 1973. Investigation of glial cells in semithin sections. III. Transformation of subependymal cells into glial cells, as shown by radioautography after ³H-thymidine injection into the lateral ventricle of the brain of young rats. *J Comp Neurol* 149:83-102
 79. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP, 1999. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284:1168-1170
 80. Priller J, Persons DA, Klett FF, Kempermann G, Kreutzberg GW, Dirnagl U, 2001.

- Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo. *J Cell Biol* 155:733-738
81. Rakic P, 1972. Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neurocortex. *J Comp Neurol*. 145:61-84
 82. Ramon y Cajal S, 1911. *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés*. Paris: Maloine
 83. Reynolds BA, Weiss S, 1996. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol* 175:1-13
 84. Rousselot P, Lois C, Alvarez-Buylla A, 1995. Embryonic (PSA) N-CAM reveals chains of migrating neuroblasts between the lateral ventricle and the olfactory bulb of adult mice. *J Comp Neurol* 351:51-61
 85. Sanai N, Tramontin AD, Quinones-Hinojosa A, Barbaro NM, Gupta N, Kunwar S, Lawton MT, McDermott MW, Parsa AT, Garcia-Verdugo MJ, Alvarez-Buylla A, 2004. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 427:740-744
 86. Schmechel DE, Rakic P, 1979. A Golgi study of radial glia cell in developing monkey telencephalon: Morphogenesis and transformation into astrocytes. *Anat Embryol* 156:115-152
 87. Seki T, Arai Y, 1995. Age-related production of new granule cells in the adult dentate gyrus. *Neuroreport* 6:2479-2358
 88. Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A, 2001. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci* 21:7153-7160
 89. Simard AR, Rivest S, 2004. Role of inflammation in the neurobiology of stem cells. *Neuroreport* 15:2305-2310
 90. Smart I, 1961. The subependymal layer of the mouse brain and its cell production as shown by radioautography after thymidine-H3 injection. *J Comp Neurol* 116:325-348
 91. Smith AG, 2001. Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:435-462
 92. Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T, 2001. Stem cells find their niche. *Nature* 414:98-104

93. Sturrock RR, Smart IHM, 1980. A morphological study of the mouse subependymal layer from embryonic life to old age. *J Anat* 130:391-415
94. Suslov ON, Kukekov VG, Ignatova TN, Steindler DA, 2002. Neural stem cells heterogeneity demonstrated by molecular phenotyping of clonal neurospheres. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:14506-14511
95. Taupin P, Gage FH, 2002. Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *J Neurosci Res* 69:745-749
96. Taupin P, 2006. Neurogenesis in the adult central nervous system. *C R Biologies* 329:465-475
97. Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, Krause DS, 2000. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 31:235-240
98. Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, 2003. Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment. *Cereb Cortex* 13:580-587
99. Trounson A, 2006. The production and directed differentiation of human embryonic stem cells. *Endocr Rev* 27:208-219
100. Vezzani A, Granata T, 2005. Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. *Epilepsia* 46:1724-1743
101. Voigt T, 1989. Development of glial cells in the cerebral wall of ferrets: Direct tracing of their transformation from radial glia into astrocytes. *J Comp Neurol.* 289:74-88
102. Wang TY, Sen A, Behie LA, Kallos MS, 2006. Dynamic behavior of cells within neurospheres in expanding populations of neural precursor. *Brain Res* 1107:82-96
103. Weiss S, Reynolds BA, Vescovi AL, Morshead C, Craig CG, van der Kooy D, 1996. Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain? *Trends Neurosci* 19:387-393
104. Westerlund U, Moe MC, Varghese M, Berg-Johnsen J, Ohlsson M, Langmoen IA, Svensson M, 2003. Stem cells from the adult human brain develop into functional neurons in culture. *Exp cell Res* 289:378-383
105. Zhao M, Momma S, Delfani K, Carlen M, Cassidy RM, Johansson CB, Brismar

H, Shupliakov O, Frisen J, Janson AM, 2003. Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. Proc Natl Acad Sci USA 100:7925-7930

RINGRAZIAMENTI

Scrivere i ringraziamenti significa essere arrivati alla parte conclusiva di un lavoro quindi con una grande felicità per essere arrivata alla fine devo proprio dire:

Grazie alle Prof. Luciana e Laura per l'aiuto, la pazienza ma soprattutto per avermi permesso di arrivare fino a qui,

Grazie alla Camillona che finalmente cammina ma non dorme.....,

Grazie a Tomis per il supporto morale e la comprensione in tutto questo periodo,

Grazie a mio fratello a tutta la mia famiglia per il grandissimo sostegno (siete proprio dei bravi nonni!!!)!!!

Ed ora grazie ai miei grandi amici (Anna, Nico , Fede, Giambo, Garro, Cibo, Fede, Elena) perché ci sono sempre e perché sono le persone più meravigliose del mondo!!

Grazie ai miei cari amici di laboratorio: GIULIA, perché quando si dice Dio le fa poi le accoppia, non ha scelto due persone a caso,

grazie a Mercy da cui ho imparato tutto su queste benedette neurostreghe, ma credo che anche lei abbia imparato qualcosa da me: a fare figli forse?

Grazie a Sandra per aver condiviso con me questo periodo di confusione mentale e per aver costituito quella che noi abbiamo chiamato l'unità di crisi...

Grazie alla mia zignora Giovanna, a Libi e Luca per le risate e le scuse inventate solo per fumare una sigaretta!!

Grazie a Stefy per il grande aiuto, credo che ti dovrei fare un bel monumento!!

Grazie a Nadia per le chiacchierate mattutine davanti alla macchinetta del caffè, per gli esercizi di matematica e per aver sopportato le mie crisi da nevrotica quale sono!!

E infine grazie a BBAdrone per le battute, gli scherzi, ma soprattutto per l'alta considerazione visto che mi chiama contessa!!!! (non certo perché sono aristocratica....)

Beh insomma grazie a tutti, anche a quelli che non ho nominato, non perché li ho dimenticati, ma perché devo correre a stampare la tesi!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!