



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SASSARI

Scuola di Dottorato in Scienze Biomediche (XXV ciclo)

Direttore: Prof. Eusebio Tolu

Indirizzo in Neuroscienze

Referente: Prof.ssa M.S. Desole

Studio del potenziale neuroprotettivo delle cellule staminali neurali adulte prelevate dalla zona subventricolare di topi C57BL/6, con particolare riferimento al ciclo dell'acido ascorbico

Tutor:

Dott.ssa Rossana Migheli

Direttore Scuola di Dottorato:

Prof. Eusebio Tolu

Tesi di dottorato della Dott.ssa Donatella Farina

Anno Accademico 2011-2012

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Definizione e classificazione delle cellule staminali	1
1.1.1 Caratteristiche fondamentali delle cellule staminali	4
1.1.2 Cellule staminali adulte.....	6
1.1.3 Cellule staminali neurali adulte (aNSC) e neurogenesi del cervello adulto.....	7
1.1.4 La zona subventricolare (SVZ) murina.....	11
1.1.5 Le neurosfere	19
1.2 La malattia di Parkinson	22
1.2.1 Eziopatogenesi della malattia di Parkinson.....	24
1.2.2 Parkinson genetico	25
1.2.3 Parkinson sporadico	27
1.3 Specie reattive dell'ossigeno e stress ossidativo	31
1.4 Potenzialità terapeutiche delle aNSC nel Morbo di Parkinson	34
1.5 Acido ascorbico	39
1.5.1 <i>Trasportatori dell'acido ascorbico</i>	41
2. SCOPO DELLA RICERCA	45
3. MATERIALI E METODI	46
3.1 Animali sacrificati per l'espianto della zona subventricolare (SVZ) ...	46
3.2 Espianto della zona subventricolare	46
3.2.1 <i>Composizione del buffer di digestione</i>	47
3.3 Colture cellulari staminali	47
3.3.1 <i>Composizione del medium di coltura complete plus</i>	47
3.3.2 <i>Composizione dell'ormone mix</i>	48
3.4 Sostanze chimiche utilizzate per gli esperimenti	49
3.5 Vitalità cellulare (Saggio MTT)	49

Dottoranda Donatella Farina-Studio del potenziale neuroprotettivo delle cellule staminali neurali adulte prelevate dalla zona subventricolare di topi C57BL/6, con particolare riferimento al ciclo dell'acido ascorbico-Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche, XXV ciclo-Università degli Studi di Sassari

3.6 Analisi neurochimica	50
3.7 Immunocitochimica	51
3.8 Microscopia ottica	52
3.9 Microscopia elettronica a scansione (SEM) e a trasmissione (TEM) ...	52
3.9.1 SEM.....	53
3.9.2 TEM	53
3.10 Western Blot	54
3.11 Preparazione dei campioni per la citofluorimetria	55
4. RISULTATI	56
4.1 Effetto dell'acido ascorbico e del deidroascorbato sulla viability delle cellule staminali	56
4.2 Quantificazione dell'acido ascorbico intracellulare	57
4.3 Quantificazione dell'acido ascorbico nel medium e all'interno delle cellule dopo trattamento con DHAA	58
4.4 Identificazione delle strutture biologiche associate al ciclo dell'acido ascorbico	60
4.5 Potenziamento dell'attività mitocondriale indotto da L-Dopa e acido ascorbico	62
4.6 Protezione dell'acido ascorbico dalla tossicità indotta dal manganese e dalla L-DOPA	63
4.7 Aumento dell'attività mitocondriale indotto da L-DOPA e dopamina e identificazione del recettore dopaminergico D2L	65
4.8 Auto-ossidazione di AA, L-DOPA e DA in presenza o meno di aNSC	67
5. DISCUSSIONE	71
6. RIASSUNTO	77
7. BIBLIOGRAFIA	79

Dottoressa Donatella Farina-Studio del potenziale neuroprotettivo delle cellule staminali neurali adulte prelevate dalla zona subventricolare di topi C57BL/6, con particolare riferimento al ciclo dell'acido ascorbico-Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche, XXV ciclo-Università degli Studi di Sassari

ABBREVIAZIONI

AA: Acido ascorbico o vitamina C

aNSC: Cellule neurali staminali adulte

b-FGF: Fattore di crescita fibroblastico

BLBP: Proteina legante i lipidi cerebrali

BMPs: *Bone Morphogenetic Proteins*

COMT: Catecol-O-metiltransferasi

DA: Dopamina

DG: Giro dentato dell'ippocampo

DHAA: Acido deidroascorbico o deidroascorbato

DLX2: *Distal less homeobox 2*

EGF: Fattore di crescita epidermico

ES: Cellule staminali embrionali totipotenti

GFAP: *Glial fibrillary acid protein*, proteina gliale fibrillare acida

GLAST: Trasportatore astrocitario specifico per il glutammato

ICM: *Inner cell mass*, massa interna della blastocisti

L-DOPA: L-3,4,- diidrossifenilalanina o levodopa

MAO: Monoamino-ossidasi

MP: Malattia (o morbo) di Parkinson

MSC: Cellule staminali mesenchimali

NIH: *National Institute of Health*, Istituto Nazionale della Salute

NSC: *Neural stem cells*, cellule staminali neurali

OB: Bulbo olfattivo

RMS: *Rostral migratory stream*, via migratoria rostrale

Dottoressa Donatella Farina-Studio del potenziale neuroprotettivo delle cellule staminali neurali adulte prelevate dalla zona subventricolare di topi C57BL/6, con particolare riferimento al ciclo dell'acido ascorbico-Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche, XXV ciclo-Università degli Studi di Sassari



SC: Cellule staminali somatiche

SGZ: Zona subgranulare

SNC: Sistema nervoso centrale

SNpc: *Substantia nigra pars compacta*

SVZ: Zona subventricolare

UPS: Sistema di degradazione proteasoma-ubiquitina

VZ: Zona ventricolare

1. INTRODUZIONE

Le cellule staminali, da qualche decennio al centro della ricerca scientifica, potrebbero rappresentare una prospettiva terapeutica per numerose patologie che oggi non hanno ancora cure risolutive, come ad esempio le lesioni spinali e le malattie neurodegenerative. Una nuova branca della medicina, definita rigenerativa, ha come obiettivo quello di sfruttare le enormi potenzialità delle cellule staminali per produrre nuovi tessuti in sostituzione di quelli danneggiati o deficitari nell'organismo adulto (Schwarz S.C. and Schwarz J., 2010). Tuttavia, la ricerca sulle cellule staminali ha provocato un grande dibattito nella società poiché il loro studio comporta numerosi problemi tecnici (ad esempio formazioni tumorali) ed etici infatti in alcuni casi si ha la distruzione di embrioni umani.

1.1 Definizione e classificazione delle cellule staminali

Nel XIX secolo Edmund Beecher Wilson coniò il termine di cellula staminale utilizzandolo quale sinonimo di cellula germinale primordiale mitoticamente quiescente (Wilson E.B., 1896).

Oggi, in base alla definizione riportata dal National Institute of Health (NIH, 2001), con il termine “cellula staminale” si intende una cellula non specializzata e indifferenziata, capace di auto-rinnovarsi, di

compiere un numero illimitato di cicli replicativi e di dare origine, in particolari condizioni fisiologiche o sperimentali, a cellule differenziate adulte (nervose, muscolari, ematiche, etc.) (Loeffler M. and Potten C.S., 1997).

Nelle prime fasi dello sviluppo embrionale (stadio di morula), sono “**totipotent**” cioè possono dare origine a tutti i tipi cellulari dei tessuti dell’organismo, compresa la placenta (Alison M.R. et al., 2002).

Dopo circa quattro giorni, allo stadio embrionale di otto cellule, si ha la formazione della blastocisti all’interno della quale, durante il normale corso dello sviluppo, danno origine ai tre foglietti embrionali ectoderma, endoderma e mesoderma attraverso il processo di gastrulazione. Le cellule contenute nella massa interna della blastocisti (*inner cell mass*, ICM) sono **pluripotent** e generano tutti i derivati embrionali incluse le cellule germinali ad esclusione dell’organo placentare (Shannon T.A. 2001; Mujtaba T. and Rao M.S., 2002; Conley B.G. et al., 2004).

Durante lo sviluppo, queste cellule maturano gradualmente sino a divenire **staminali tessuto-specifiche multipotent** (dette anche **somatiche, SC**) capaci di generare, differenziandosi, cellule dello stesso compartimento in cui risiedono; ad esempio, le staminali emopoietiche possono dare origine a qualsiasi elemento cellulare presente nel sangue. Da tali cellule derivano altre staminali (dal potenziale ridotto), definite **unipotent**, che possono differenziarsi in un solo elemento cellulare (ad esempio gli osteoblasti possono differenziarsi solo in osteociti, i neuroblasti in neuroni) (**Figura 1**). La

cellula matura che ne deriva è definita **nullipotente** (Cedar S.H. et al., 2007).

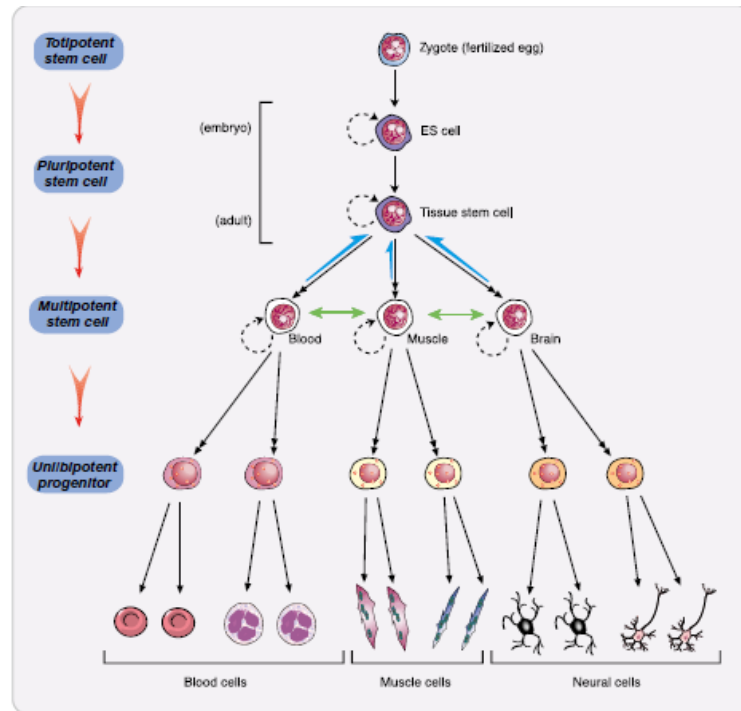


Figura 1. Gerarchia delle cellule staminali
(Blackmore D.G. and Rietze R. L., 2010)

Le cellule staminali pertanto si classificano secondo la provenienza, come **embrionali** o **adulte**:

- le **cellule staminali embrionali (ES)** derivano da cellule indifferenziate presenti all'interno dell' *inner cell mass* della blastocisti.
- le **cellule staminali adulte** sono cellule non specializzate che si ritrovano in molti distretti dell'organismo adulto e sono multipotenti.

La funzione predominante di tali cellule è contribuire al mantenimento dell'omeostasi tissutale, generando una progenie di cellule differenziate che possa sostituire le cellule mature degenerate in seguito a una lesione oppure al rinnovamento fisiologico; L'epidermide e il sistema ematopoietico ad esempio sono sottoposti ad un continuo *turnover* tissutale.

Per contro, il tessuto nervoso maturo è stato considerato fino a qualche decennio fa privo di tale capacità in quanto si pensava fosse sprovvisto di cellule staminali. Numerose ricerche hanno tuttavia dimostrato la presenza di staminali neurali adulte (aNSC) in alcune aree del cervello di mammifero adulto.

Le cellule staminali adulte di una specifica area anatomica inoltre, possono generare fenotipi cellulari differenti rispetto al tessuto nel quale risiedono. Questo processo prende il nome di **transdifferenziamento** (Vescovi A.L. et al., 2001).

1.1.1 Caratteristiche fondamentali delle cellule staminali

Le staminali sono cellule indifferenziate che possiedono le seguenti caratteristiche fondamentali che le distinguono dagli altri tipi cellulari:

- Mostrano un **potenziale proliferativo** connesso alla loro notevole capacità di **autorinnovamento (*self-renewal*)** (Potten C.S. and Loeffler M., 1990; Loeffler M. and Potten C.S., 1997; Cedar S.H. et al., 2007). Con il termine autorinnovamento si intende la capacità di una popolazione cellulare di mantenere un numero di staminali costante in uno specifico compartimento.

Le staminali sono normalmente cellule quiescenti (blocco in fase G₀ del ciclo cellulare) o caratterizzate da un ciclo cellulare lento; particolari circostanze (ad esempio lesioni o condizioni patologiche) possono far incrementare o diminuire il numero di staminali in risposta ai cambiamenti dell'ambiente extracellulare. In particolare, una popolazione di cellule staminali in grado di autorinnovarsi può, attraverso la **divisione simmetrica**, dare origine a due cellule figlie identiche che mantengono le caratteristiche di “staminalità” oppure, attraverso il processo di **divisione asimmetrica**, produrre una cellula identica a quella di origine e un progenitore multipotente con limitata capacità di autorinnovamento che differenzierà in uno o più tipi di cellule specializzate (**Figura 2**).

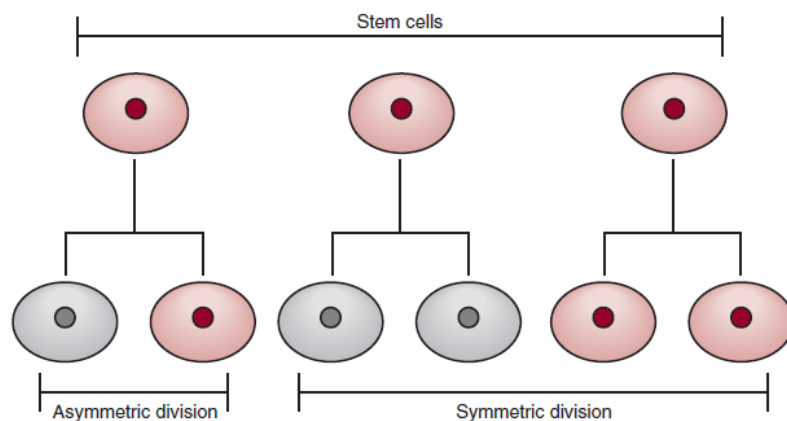


Figura 2. *Divisione delle cellule staminali*
(Young K.C. and Sugihara C., 2012)

- Sono **multipotenti** cioè hanno la capacità di dare origine a una o più specie cellulari differenziate nel tessuto nel quale

risiedono e possiedono la **capacità di rigenerare** lo stesso in seguito ad un grave danno biologico (Potten C.S., and Loeffler M., 1990; Loeffler M. and Potten C.S., 1997). Le cellule staminali si trovano in microambienti denominati **nicchie** caratterizzate da una complessa rete di segnali biochimici, che, in presenza di citochine e/o fattori di trascrizione, interazioni cellula-cellula e cellula-matrice ne modulano la proliferazione cellulare.

Grazie ai microambienti viene inoltre stimolata la riparazione tissutale quando necessaria (Moore K.A. and Lemischka I.R., 2006; Laird D.J. et al., 2008).

1.1.2 Cellule staminali adulte

Numerosi studi condotti in modelli animali di patologie neurodegenerative hanno dimostrato che il trapianto di cellule staminali **embrionali (ES)** permette la rigenerazione dei tessuti danneggiati. Ad esempio, in scimmie o ratti affetti da morbo di Parkinson, il trapianto di cellule staminali embrionali nello striato ha determinato la rigenerazione dei neuroni dopaminergici danneggiati, contrastando la progressione della malattia (Kim J. H. et al., 2002; Takagi Y. et al., 2005).

Tuttavia, formazioni tumorali e/o il rigetto da parte del tessuto ospite, pongono dei limiti nell'uso delle ES (Vescovi A.L. et al., 2006); ulteriori limiti sicuramente, sono rappresentati da questioni etiche:

infatti, l'uso di ES implica necessariamente l'utilizzo di uno o più embrioni umani e tutto ciò genera importanti dibattiti circa il loro utilizzo. Ciò ha portato i ricercatori ad approfondire le conoscenze sulle staminali adulte, che, a differenza delle ES, sono meno suscettibili alla cancerogenesi (poiché sono già parzialmente differenziate) e meno dibattute da un punto di vista etico (Tuan R.S. et al., 2003).

Attualmente, in diversi stati europei ed extraeuropei sono in corso sperimentazioni cliniche che utilizzano cellule staminali adulte per il trattamento di alcune patologie quali il danno miocardico, il morbo di Parkinson e la sclerosi laterale amiotrofica (SLA) (Sng J. and Lufkin T. 2012).

Tra le principali cellule staminali adulte oggi studiate, sia nella ricerca di base che clinica, troviamo le cellule staminali **neuronal** (neural stem cells o NSC), le staminali **mesenchimali** (MSC) prelevate dal midollo osseo, le staminali di **derivazione adiposa** e le cellule staminali prelevate dal **liquido amniotico**.

1.1.3 Cellule staminali neurali adulte (aNSC) e neurogenesi del cervello adulto

Fino agli inizi del 1900 gli scienziati erano forti sostenitori del dogma in base al quale il sistema nervoso centrale (SNC) adulto avesse capacità rigenerative molto scarse e che i neuroni in via di degenerazione non potessero essere sostituiti (Gonzalez-Perez O.,

2012). Nel corso della prima metà del '900 destò molto clamore la scoperta di cellule con proprietà staminali residenti non solo nel cervello embrionale, ma anche in quello adulto (Gage F.H. 2000; Zhao C., et al., 2008). Queste cellule, chiamate aNSC (*adult neural stem cells*), mostrano capacità proliferativa e multipotenza, potendo differenziarsi fondamentalmente in tutti i tipi di cellula del sistema nervoso centrale (SNC), ovvero **neuroni, astrociti e oligodendrociti**. Oggi è noto che le due aree di maggior neurogenesi dell'adulto sono **la zona subventricolare (SVZ) dei ventricoli laterali e la zona sottogranulare (SGZ) del giro dentato (DG) dell'ippocampo** (Taupin T. and Gage F.H., 2002). A tale conclusione si arrivò dopo tanti anni di ricerche e di teorie controverse riguardo la neurogenesi nel cervello. Santiago Ramon y Cajalè a tal proposito, fu uno dei più forti sostenitori della teoria secondo la quale il cervello è un' organo quiescente incapace di generare neuroni (Ramon Y., Cajal S., 1913). Già in quegli stessi anni tuttavia, alcuni ricercatori parlarono di neurogenesi a livello del SNC adulto senza ottenere grande consenso da parte della comunità scientifica per via dell'impossibilità di determinare con certezza la natura neuronale delle cellule mitoticamente attive (Allen E. 1912; Levi G. 1898). La prima prova che la neurogenesi può avvenire in alcune regioni del cervello adulto di mammifero deriva da studi fatti da Altman e Das negli anni '60. Tali ricercatori infatti utilizzando la tecnica dell'autoradiografia con ³H-timidina, scoprirono la presenza di neuroni di nuova formazione nel giro dentato dell'ippocampo (DG), nella neocorteccia e nel bulbo olfattivo (OB) di ratti adulti (Altman J., 1962, 1963, 1966, 1969). I

loro risultati e un gran numero di studi successivi, confermati dalla microscopia elettronica, dimostrarono che la neurogenesi era attiva principalmente in due aree: il bulbo olfattivo (OB) e il giro dentato dell'ippocampo (DG) (Kaplan M.S. and Hinds J.W., 1977).

Negli anni '80 venne dimostrata la rigenerazione neuronale anche nel telencefalo di uccelli adulti (Goldman S.A. and Nottebohm F., 1983) e, negli anni '90 nel cervello di rettili, uccelli e mammiferi adulti, compresi pazienti umani (Ericksson P.S. et al., 1998; Garcia-Verdugo J.M. et al., 2002).

In particolare, nel 1992, Reynolds e Weiss indicarono la zona subventricolare (SVZ) come fonte di cellule staminali (Reynolds B.A. and Weiss S., 1992) e, nel 1993 Luskin e Alvarez-Buylla dimostrarono, in maniera definitiva, che la SVZ ha capacità di generare nuove cellule che si possono differenziare in neuroni e glia (Lois C. and Alvarez-Buylla A., 1993; Luskin M.B., 1993).

Dal lavoro di Gage e Taupin (2002), emerge che aNSC nella parte anteriore della SVZ migrano fino al bulbo olfattivo attraverso la via migratoria rostrale (*rostral migratory stream*, RMS) (**figura 3**) e una volta giunti a destinazione differenziano in interneuroni, cellule dei granuli e cellule periglomerulari. Cellule neurali staminali sono state isolate anche da altre aree del sistema nervoso centrale adulto fra cui: corteccia umana, amigdala, *substantia nigra* e a diversi livelli del midollo spinale di topo e ratto. (Weiss et al., 1996; Shihabuddin L. S., 1997; Palmer T.D. et al., 1999; Lledo P.M. et al., 2000). Ad influenzare le aNSC adulte e i progenitori intermedi intervengono 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 cellulare attraverso il recettore D2 (Höglinger G.U. et al., 2004). La neurogenesi è regolata dall'interazione fra le cellule e il microambiente circostante (Spradling A. et al., 2001). Fanno parte di queste strutture 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 F. 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 T.D. et al., 1999). La lamina basale, legando questi fattori funge da ancoraggio per le cellule, permettendone l'ingresso nella nicchia; è inoltre strettamente interdigitata con gli astrociti (Alvarez-Buylla A. and Lim D.A., 2004).

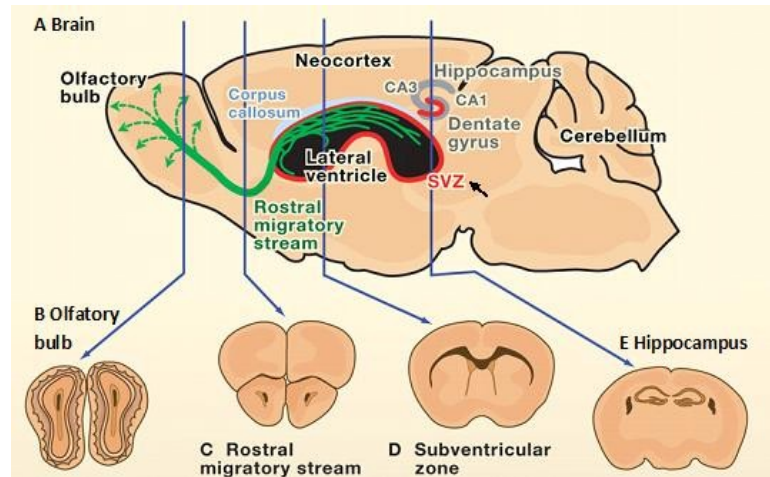


Figura 3. *Flusso migratorio rostrale*

1.1.4 La zona subventricolare (SVZ) murina

La zona ventricolare (VZ) e la SVZ sono le principali regioni germinali deputate alla genesi dei neuroni e delle cellule gliali del cervello di mammifero adulto. I precursori neurali inizialmente risiedono nella VZ e nel corso dell'embriogenesi migrano gradualmente nella SVZ la quale è costituita prevalentemente da quattro tipi cellulari: le cellule astrocitarie o cellule di tipo B, i neuroblasti o cellule di tipo A, le cellule ependimali (tipo E) e le cellule con morfologia transizionale (tipo C) (Doetsch F. et al.,1997).

Le cellule della VZ derivano dalla piastra neurale, circondano il compartimento ventricolare formando un epitelio pseudostratificato differenziandosi, nel periodo prenatale, in glia radiale, neuroni ed astrociti. Con il procedere dello sviluppo, la glia radiale favorisce la migrazione verso la pia madre di nuovi neuroni derivati dal differenziamento di cellule della regione ventricolare con conseguente

diminuzione di tale popolazione (Mission J.P. et al., 1991). Dalla VZ ha così origine la zona subventricolare infatti, si osserva un aumento esponenziale delle cellule di tale regione che raggiunge il suo massimo sviluppo durante la prima settimana dopo la nascita nei roditori e la trentacinquesima settimana di gestazione nell'uomo (Morshead C.M. et al., 1994; Weiss S. et al., 1996; Doetsch F. et al., 1999a).

La zona ventricolare e la zona subventricolare possono essere distinte tra loro dall'espressione di due differenti peptidi: *noggin* e *distal less homeobox 2* (DLX2) (Corbin J.G. et al., 2000), aventi un ruolo chiave nella neurogenesi. DLX2 è un fattore di trascrizione espresso in progenitori neurali (Panganiban and Rubenstein, 2002) mentre *noggin* promuove la neurogenesi nella SVZ mediante il legame a particolari proteine, le *bone morphogenetic proteins* (BMP), regolatrici critiche dello sviluppo del sistema nervoso centrale, periferico e cranio-facciale. In assenza del peptide *noggin*, le BMP si legano al proprio recettore (BMPR) inibendo la formazione di nuovi neuroni (McMahon J.A. et al., 1998) e favorendo il differenziamento delle cellule staminali in cellule gliali. *Noggin* pertanto, previene l'attivazione dei recettori BMPR stimolando la formazione di nuovi neuroni all'interno della zona subventricolare (Lim D.A. et al., 2000).

Nelle prime fasi dello sviluppo neurale *noggin* è espresso principalmente da cellule della VZ mentre DLX2 è espresso nella SVZ. Nel cervello adulto invece la proteina *noggin* è espressa nelle cellule endoteliali e DLX2 continua ad essere espresso nella SVZ per tutta la vita in particolare dalle cellule di tipo C e dai giovani

neuroblasti, mentre non è espresso dalle cellule di tipo B (progenitori primari) suggerendo dunque la sua espressione nei precursori secondari (Tramontin A.D. et al., 2003). La SVZ persiste anche in età adulta e mantiene la capacità di generare neuroni e glia (Lois C. and Alvarez-Buylla A. 1993; Kirschenbaun B. and Goldman S.A., 1995); è adiacente allo strato ependimale dei ventricoli cerebrali e si estende lungo la parete laterale del ventricolo laterale, verso lo striato, mentre non comprende la parete mediale e il tetto del ventricolo laterale. La composizione e l'organizzazione tridimensionale della SVZ murina, è stata studiata, ultrastrutturalmente ed immunohistochimicamente, da Doetsch e collaboratori (1997) che hanno identificato la presenza di quattro tipi cellulari: **cellule di tipo A o neuroblasti**, **cellule di tipo B** o di tipo astrocitario (considerati i progenitori neurali della SVZ), le **cellule di tipo C o cellule con morfologia transizionale**, le **cellule di tipo E** o cellule ependimali (**Figura 4**).

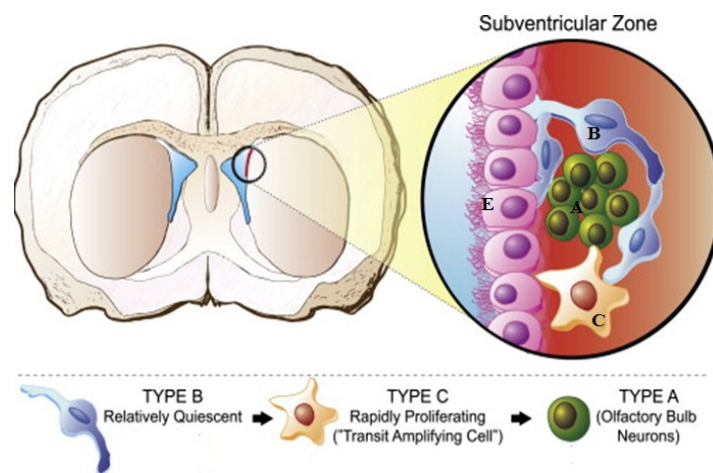


Figura 4. Sezione coronale del cervello e modello tridimensionale della zona subventricolare (SVZ) murina.

Dottoressa Donatella Farina-Studio del potenziale neuroprotettivo delle cellule staminali neurali adulte prelevate dalla zona subventricolare di topi C57BL/6, con particolare riferimento al ciclo dell'acido ascorbico-Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche, XXV ciclo-Università degli Studi di Sassari

Le cellule di tipo A formano catene orientate tangenzialmente avvolte da cellule di tipo B, mentre le cellule di tipo C sono associate alle catene di neuroblasti (Doetsch F. et al., 1997).

Ciascun tipo cellulare è composto da popolazioni subcellulari che sono state differenziate per morfologia, espressione genica e molecolare. (Reynolds B.A. and Weiss S. 1992; Vescovi A.L. et al., 1993; Gritti A. et al., 1999; Jackson E.L. et al., 2006).

Le cellule endodimali (tipo E) formano un monostrato cellulare (*ependymal layer*) che separa la SVZ dalla cavità ventricolare. Svolgono un'importante ruolo nel trasporto del liquido cerebrospinale e nell'omeostasi del cervello modulando, in particolare, la proliferazione della SVZ (Spassky N., et al., 2005; Sawamoto K., et al., 2006; Mirzadeh Z. et al., 2008). Hanno forma cuboidale 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 F. et al., 1997) (**Figura 5, riquadro D**).

Da un punto di vista morfologico sono suddivise in cellule multiciliate (tipo E-1) e cellule biciliate (tipo E-2) le quali avvolgono le cellule di tipo B (Gonzalez-Perez O., 2012). Le cellule di tipo E giocano un ruolo estremamente rilevante nella neurogenesi adulta: la loro importanza sta nel fatto che esse secernono la proteina *noggin* che neutralizza l'effetto inibitorio delle BMPs prodotte dagli astrociti nella SVZ stessa (Lim D.A. et al., 2000). Gli astrociti d'altro canto, rilasciando le BMP, promuovono la proliferazione delle staminali. Le

cellule endoteliali esprimono marcatori cellulari quali S100 β e CD24 (Gonzalez-Perez O., 2012).

Le cellule di tipo B, o cellule astrocitarie, sono considerate i progenitori neurali e, da un punto di vista morfologico possono essere suddivise in cellule di tipo **B1** e cellule di tipo **B2** (Doetsch F. et al., 1997); presentano contorni e nuclei irregolari, corpi densi nel citoplasma e molti filamenti intermedi tra cui la proteina gliale fibrillare acida (*glial fibrillary acid protein*, GFAP) (**Figura 5, riquadro B**).

Le cellule di tipo B1 sono in stretto contatto con il layer di cellule endoteliali attraverso giunzioni gap e *adherens*, mentre le cellule astrocitarie di tipo B2 sono localizzate in prossimità del corpo striato e circondano le cellule di tipo A. (Mirzadeh Z. et al., 2008).

Gli astrociti B-1 sono costituiti da processi ciliari privi di motilità, 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.

In generale, le cellule di tipo B hanno morfologia, ultrastruttura ed espressione dei *markers* associati alla componente astrogliale. Alcune delle proteine espresse dalle cellule di tipo B sono: la nestina, la proteina gliale fibrillare acida (**GFAP**), la vimentina, il trasportatore astrocitario specifico per il glutammato (**GLAST**), la connessina 30 e la proteina legante i lipidi cerebrali (**BLBP**) (Doetsch F. et al., 1999; Hartfuss E. et al., 2001; Kriegstein A. et Alvarez-Buylla A., 2009).

Gli astrociti di tipo B1 esprimono anche i seguenti *markers* indici di staminalità: il carboidrato Lewis X (**LeX**) e la prominina-1 (CD133) (Coskun V. et al., 2008; Beckervordersandforth R. et al., 2010).

Dalle cellule di tipo B hanno origine le cellule di tipo C, conosciute anche come progenitori con morfologia transizionale dai quali originano a loro volta le cellule di tipo A (Kriegstein A. et al., 2009). Le cellule di tipo C, presentano contorni regolari, sono più larghe e più sferiche rispetto agli altri fenotipi cellulari. 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 (**Figura 5, riquadro B**). Le cellule di tipo C si trovano generalmente in piccoli gruppi (*clusters*) e occasionalmente come cellule singole che formano piccoli complessi giunzionali con le cellule di tipo A.

Alcuni *markers* per identificare le cellule di tipo C comprendono: il fattore di trascrizione neuronale Asc11, il recettore per il fattore di crescita epidermico (EGFR) e il fattore di trascrizione Dlx-2 (Doetsch F. et al., 2002; Parras CM. et al., 2004; Pastrana E. et al., 2009).

Le cellule di tipo A sono neuroblasti che attraverso la via rostrale migrano, formando lunghe catene, fino al bulbo olfattivo ove si differenziano in interneuroni maturi (Doetsch F. et al., 1997; Lois C. et al., 1996). Da un punto di vista morfologico possiedono un corpo allungato con uno o due processi, abbondante cromatina con pochi nucleoli, citoplasma scuro contenente molti ribosomi liberi, un piccolo apparato di Golgi e microtubuli orientati lungo l'asse cellulare. 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 mediante le quali avviene lo scambio di segnali fra cellule o la rimozione dei complessi stessi (**Figura 5, riquadro A**). Le cellule di tipo A possono essere facilmente identificate grazie all'espressione di particolari *markers* quali ad esempio doublecortin (DCX), la β tubulina III (nota anche come TJ1), PSA-NCAM (poly-sialylated-neural cell adhesion molecule), *markers* di neuroni immaturi (Lois C. and Alvarez-Buylla A., 1994).

A stretto contatto con queste popolazioni cellulari si trovano le cellule endoteliali dei vasi sanguigni, i quali creano il microambiente adatto al sostentamento, rilasciando vari fattori di crescita. Questi ultimi sono di vitale importanza per quanto riguarda il mantenimento dello stato indifferenziato delle aNSC, come abbondantemente dimostrato in studi sia *in vivo* che *in vitro*. In particolare l'EGF (*epidermal growth factor*) blocca il differenziamento delle cellule di tipo C mentre l'FGF-2 (fibroblast growth factor) promuove genericamente la proliferazione nella SVZ (Doetsch F., 2002).

Tali mitogeni sono utilizzati anche *in vitro* per la propagazione delle aNSC infatti, la presenza contemporanea dell'EGF e dell'FGF, ne favorisce un'intensa attività proliferativa (Morrison S.J. et al., 1996).

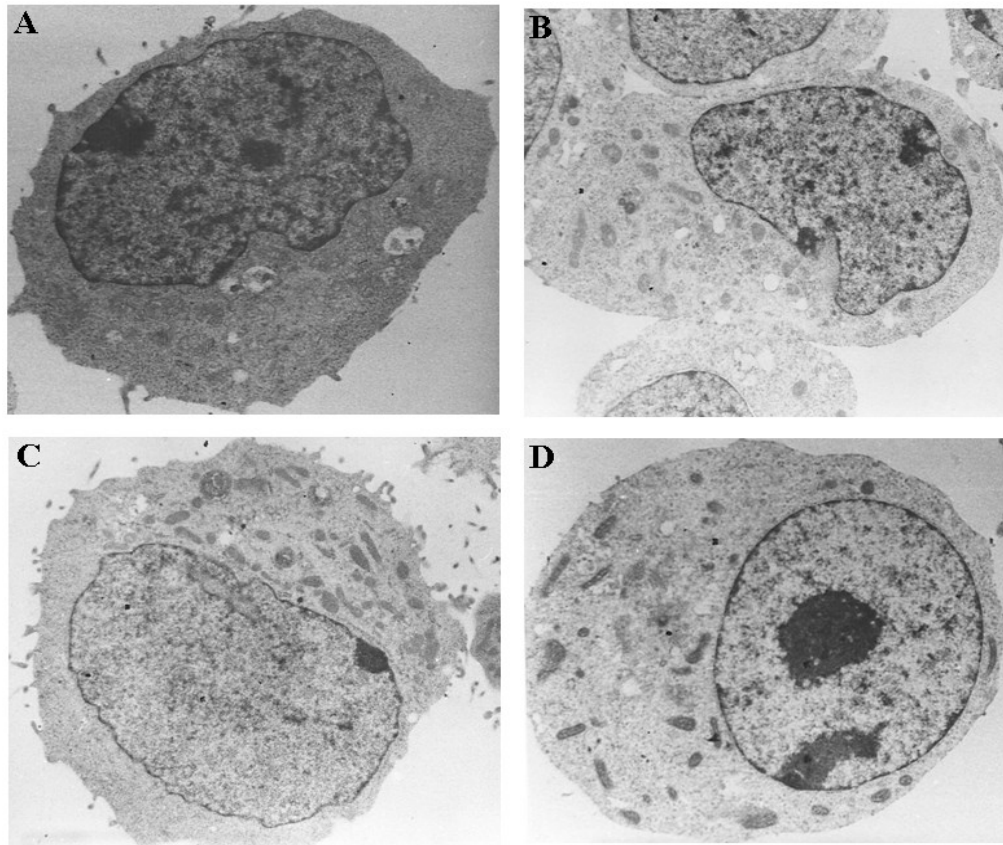


Figura 5. Immagini al microscopio elettronico a trasmissione (TEM); cellule di tipo A (riquadro A), cellule di tipo B (riquadro B), cellule di tipo C (riquadro C) e cellule ependimali (riquadro E).

1.1.5 Le neurosfere

Le cellule staminali neurali adulte (aNSC) *in vitro*, in presenza del fattore di crescita epidermico (EGF) danno origine ad aggregati sferici in sospensione, definiti neurosfere, costituite da staminali multipotenti e da una popolazione eterogenea di precursori neurali (**Figura 6**).

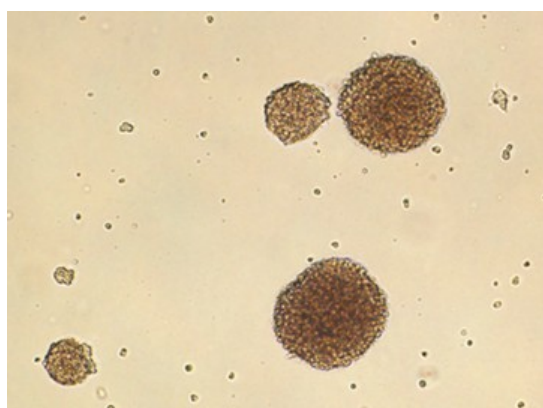


Figura 6. *Neurosfele in coltura*

Sono eterogenee anche sul piano ultrastrutturale, esprimono diversi marcatori specifici, dimostrando quindi l'esistenza di distinti fenotipi cellulari all'interno di queste strutture (Bez A. et al., 2003). Tali cellule infatti, in opportune condizioni, sono in grado di differenziarsi in neuroni, astrociti ed oligodendrociti.

Un'altra importante caratteristica delle neurosfere, è l'elevata dinamicità. Infatti studi effettuati da Wang e collaboratori nel 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; la migrazione

cellulare avviene continuamente all'interno di queste strutture (Wang T.Y. et al., 2006), favorendo il processo di differenziamento cellulare. Tramite la microscopia elettronica a scansione (SEM) è possibile determinare la dimensione delle neurosfere: hanno un diametro che varia tra i 50 e i 100 μM , mentre le cellule costituenti tali aggregati sferici hanno un diametro di circa 5-7 μM , appaiono particolarmente sferiche e raramente prolungate (**Figura 7A**).

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. Quest'ultima è estremamente vantaggiosa in quanto 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 vengono utilizzati marcatori specifici quali la nestina che rivela lo stato indifferenziato di queste cellule di origine neuroectodermica e rappresenta pertanto un'indice di staminalità.

La nestina è una proteina citoscheletrica appartenente ai filamenti intermedi di tipo IV, espressa dalle cellule in divisione durante i primi stadi di sviluppo nel sistema nervoso centrale ed in altri tessuti (**Figura 7B**).

Il fenotipo astrocitario viene osservato tramite l'anticorpo GFAP, mentre la linea neurale è identificata ad esempio attraverso la β -tubulina III. Il *lineage* oligodendrocitico viene identificato con il marcatore per gli oligodendrociti maturi (Fernandez M. et al., 2006).

La rimozione dei fattori di crescita e l'aggiunta di un substrato di adesione induce il differenziamento delle aNSC, costituenti le neurosfere, nei tre fenotipi neurali (Gage F.H., 2000). Tale fenomeno può essere influenzato da molti fattori extracellulari come i mitogeni *platelet-derived growth factor* (PDGF), *ciliary neurotrophic factor* (CNTF), *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) e da fattori di adesione come fibronectina, laminina e poli-D-ornitina.

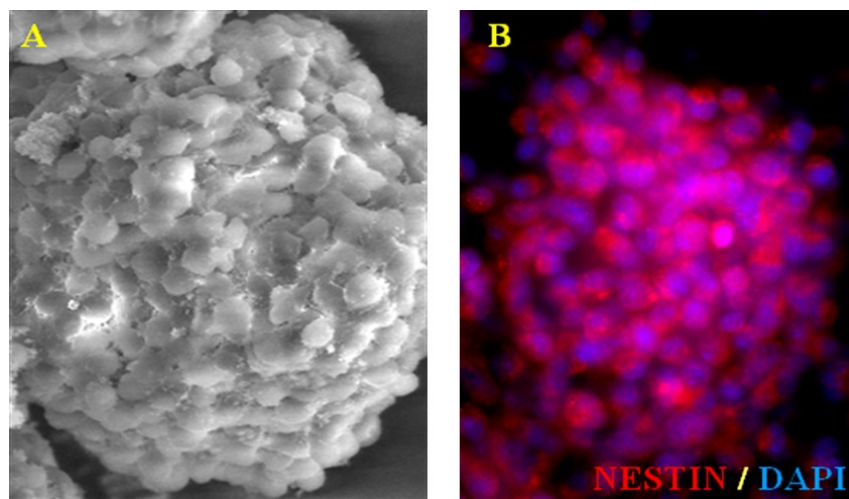


Figura 7. Microfotografie di neurosfere.

Fotografia scattata al microscopio elettronico a scansione (SEM), ingrandimento 800X (A). Immagine di una neurosfera positiva alla nestina (fluorescenza rossa), controcolorata con il DAPI (DNA nucleare, fluorescenza blu); microscopio in fluorescenza, ingrandimento 60X (B).

1.2 La malattia di Parkinson

La prima descrizione della Malattia di Parkinson (MP) si deve al medico inglese James Parkinson, il quale nel 1817, definì questa patologia "Paralisi Agitante".

Si tratta di una malattia neurodegenerativa ad andamento progressivo con sintomi prevalentemente motori, causata dalla perdita dei neuroni dopaminergici della sostanza nera di Sömmering o *substantia nigra pars compacta (SNpc)*, un nucleo dei gangli della base situato nel mesencefalo dorsale, le cui fibre nervose si diramano fino allo striato (via nigro-striatale) (**Figura 8**). Ciò porta ad un grave deficit nella produzione di dopamina (DA) (Migheli R. et al., 2008), un neurotrasmettitore catecolaminico essenziale nella coordinazione del movimento, implicato nel controllo delle vie eccitatorie ed inibitorie interne ai nuclei della base (Lang A.E. et Lozano A.M., 1998).

Questa patologia, è la seconda più comune tra le malattie neurodegenerative, dopo l'Alzheimer e, insorge generalmente tra i 60-70 anni, con una leggera prevalenza nel sesso maschile.

I sintomi clinici nella malattia di Parkinson si manifestano quando il 70% circa dei neuroni dopaminergici degenerano, determinando nel sistema nigrostriatale una carenza di dopamina pari a circa l'80%.

I segni clinici caratteristici che si riscontrano nei pazienti Parkinsoniani sono i movimenti involontari quali bradicinesia e acinesia, rigidità muscolare del tronco e degli arti, instabilità posturale e tremore a riposo. Tali sintomi inoltre possono esser accompagnati a lungo andare da depressione e demenza (Arenas E. 2010).

Poiché la dopamina non è in grado di attraversare la barriera ematoencefalica, la terapia farmacologica del PD si basa sulla somministrazione di L-3,4,-diidrossifenilalanina (levodopa, L-DOPA), il precursore metabolico della dopamina (Serra P.A. et al., 2008); somministrata oralmente, in associazione a un' inibitore periferico delle decarbossilasi (la carbidopa o la benserazide) è rapidamente assorbita dall'intestino tenue e convertita, dall'enzima L-DOPA-decarbossilasi, in DA nei neuroni dopaminergici della *substantia nigra pars compacta* (Martinez- Morales P.L. and Liste I., 2012).

Dopo il rilascio la dopamina viene captata dalla membrana postsinaptica dei neuroni striatali per poi essere degradata dalle *monoamino-ossidasi* (MAO) e dalle *catecol-O-metiltransferasi* (COMT).

La somministrazione dei precursori della dopamina, come la L-DOPA, non eliminano la causa della patologia. I migliori risultati nel trattamento del PD con la levodopa si ottengono nei primi anni di terapia in cui i processi neurodegenerativi vengono rallentati. Con il progredire della terapia si manifestano, con frequenza sempre maggiore, alcune fluttuazioni nella risposta clinica alla L-DOPA e l'insorgenza di innumerevoli effetti collaterali.

Tra le alternative terapeutiche alla L-DOPA vi sono gli agonisti diretti dei recettori dopaminergici striatali o gli inibitori degli enzimi responsabili del metabolismo della levodopa e della dopamina (MAO-B) quali la selegilina o i derivati della rasagilina.

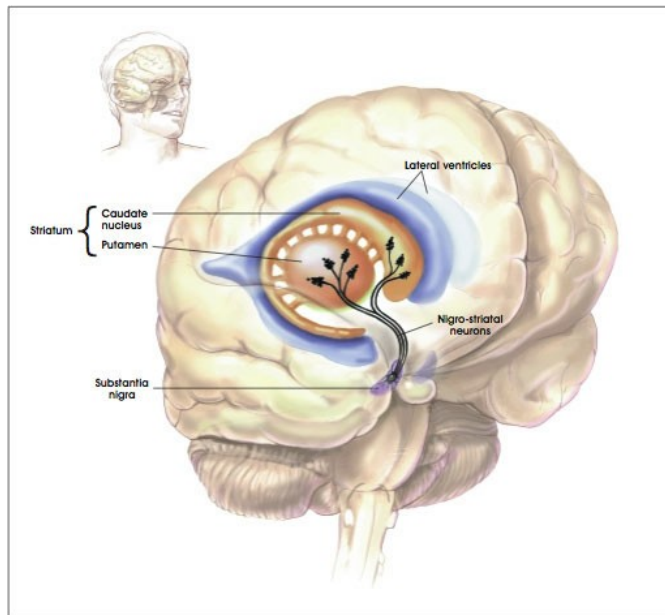


Figura 8. *Via dopaminergica nigro-striatale*

1.2.1 Eziopatogenesi della malattia di Parkinson

Sebbene l'eziologia del MP sia ancora sconosciuta, diversi fattori eziologici intervengono nell'insorgenza della patologia: ereditarietà, lesioni cerebrali, infezioni, neurotossine endogene, fattori ambientali e alterate espressioni geniche (Semchuk K.K. et al., 1993; Taylor C.A. et al., 1999).

In generale l'eziologia può esser determinata da:

- Fattori genetici, che forniscono un quadro patologico che rientra nel Parkinson genetico o familiare;
- Fattori ambientali, che forniscono un quadro patologico che rientra nel Parkinson sporadico.

Studi sui modelli di Parkinson riconducono la patogenesi della malattia a fenomeni molto frequenti quali: disfunzione mitocondriale e stress ossidativo, *misfolding*, ovvero mal ripiegamento delle proteine e aggregazione delle stesse.

Caratteristica di tale patologia è la presenza di inclusioni citoplasmatiche dette corpi di Lewy, il cui costituente principale è una piccola proteina sinaptica, chiamata α -sinucleina. Tali aggregazioni proteiche sono presenti anche in altre patologie del SNC tra cui la malattia di Alzheimer (Spillantini M.G. et al., 1997).

1.2.2 Parkinson genetico

L'approccio genetico molecolare ha permesso negli ultimi anni di comprendere meglio le cause e i meccanismi alla base del MP: i fattori genetici giocano un ruolo fondamentale nello sviluppo di tale malattia. Inizialmente, sono state scoperte alcune rare forme mendeliane di Morbo di Parkinson e il gene difettoso è stato identificato in una forma a trasmissione autosomica dominante (**α -sinucleina**) e in una forma recessiva (**parkina**). Negli ultimi anni sono state descritte numerose altre alterazioni genetiche coinvolgenti, ad esempio, i geni **DJ-1**, **LRRK2** e **PINK-1**. Alcune proteine derivate da questi geni appartengono al sistema di degradazione proteosoma-ubiquitina (UPS) che, in condizioni fisiologiche è deputato alla degradazione delle proteine danneggiate, mutate o mal ripiegate. Il malfunzionamento di tale sistema, dovuto ad esempio ad una mutazione genica, implica

l'impossibilità dello stesso di rimuovere le proteine anomale con conseguente accumulo delle stesse che, aggregandosi, formano delle inclusioni insolubili dette corpi di Lewy (McNaught K.S. and Olanow C.W., 2003) il cui costituente principale è appunto l' α -sinucleina.

L' α -sinucleina è una piccola proteina neuronale altamente espressa nel sistema nervoso centrale e concentrata nei terminali presinaptici. Rappresenta dallo 0.5- all'1% delle proteine totali citosoliche nel cervello. E' coinvolta, sia in forma nativa che mutata, in diverse patologie neurodegenerative, definite sinucleinopatie (Dev K.K et al., 2003; Kruger R. et al., 2000).

Sebbene non sia ancora nota la precisa funzione di questa proteina, si pensa che sia coinvolta nei meccanismi di trasporto delle vescicole contenenti dopamina, a livello delle terminazioni sinaptiche dei neuroni dopaminergici. Inoltre, è in grado di legarsi ai lipidi quali i lipidi di membrana, gli acidi grassi e le goccioline lipidiche intracellulari. L'importanza dipende dalla sua tendenza ad acquisire una struttura secondaria anomala e ad oligomerizzare creando protofibrille e fibrille che precipitano nel citoplasma delle cellule dopaminergiche sottoforma di aggregati proteici che, accumulandosi, danno luogo ai corpi di Lewy. Il coinvolgimento dell' α - sinucleina non è limitato alle forme familiari della malattia, infatti essa si trova nei corpi di Lewy in tutti i casi di Parkinson, anche se sporadici.

Parkin è un gene autosomico recessivo coinvolto nel MP; codifica per la parkina, una proteina che agisce da substrato nel sistema UPS in quanto favorisce il legame delle proteine destinate alla degradazione. Una mutazione nel gene che codifica per la parkina, il locus PARK2,

determina un' accumulazione delle proteine danneggiate a livello citoplasmatico con conseguente effetto tossico sulla cellula.

Tra gli altri geni autosomici recessivi, le cui mutazioni provocano l'insorgenza della malattia, va ricordato PINK1, gene che codifica per una proteina mitocondriale deputata alla protezione delle cellule dallo stress indotto da disfunzioni mitocondriali. In maniera simile agisce il prodotto del gene DJ-1, una proteina localizzata nella membrana mitocondriale la cui mutazione causa una forma autosomica recessiva di Parkinson (Lee F.J. and Liu F., 2008). Sebbene la funzione di tale proteina non sia chiara, alcuni lavori la considerano una proteina antiossidante o sensore dello stress ossidativo in grado di limitare l'aggregazione di α -sinucleina nei neuroni.

Un' altro gene di cui sono state identificate, nel 2004, alcune mutazioni associate al Morbo di Parkinson è l'LRRK2, che codifica per la proteina dardarina (LRRK2), una protein chinasi. La dardarina risulta essere prevalentemente citoplasmatica, anche se evidenze sperimentali dimostrano essere associata alla membrana esterna dei mitocondri. Sebbene la sua funzione non sia completamente nota si pensa ad una sua possibile interazione con strutture cellulari coinvolte nel traffico vescicolare e nel trasporto di membrana.

1.2.3 Parkinson sporadico

L'ipotesi di un'origine sporadica fu postulata agli inizi degli anni '80 quando, giovani tossicodipendenti svilupparono sintomi analoghi alla malattia di Parkinson in seguito ad assunzione di un derivato della

Meperidina, (detta anche “eroina sintetica” o *China White*) a base di 1-metil-4-fenil-propion-ossipiperidina (MPPP), con effetti analgesico-narcotici, metabolizzato a MPTP.

L’MPTP è una neurotossina utilizzata frequentemente nei laboratori di ricerca per lo studio della malattia di Parkinson sia *in vitro* che *in vivo* (Schober A., 2004); è altamente lipofila, ed è in grado di attraversare la barriera ematoencefalica. Viene captata dagli astrociti e trasformata, per mezzo delle *monoamino ossidasi B* (MAO-B), nel metabolita intermedio 1-metil-4-fenil-2,3-diidropiridina (MPDP), il quale a sua volta si ossida spontaneamente in 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP⁺) (Schober A., 2004). Questa molecola viene rilasciata nello spazio extracellulare e ricaptata dai neuroni dopaminergici per mezzo di un trasportatore attivo della dopamina (il DAT). Le cellule della SNpc, che in condizioni fisiologiche esprimono il DAT, mostrano una grande affinità per l’MPP⁺, infatti muoiono dopo averlo immagazzinato (Steece-Collier K. and al., 2002).

L’MPP⁺ si accumula all’interno del mitocondrio dove, inibendo il complesso I della catena respiratoria, provoca una drastica riduzione nella biosintesi di ATP e favorisce la produzione di radicali liberi (Jenner P., 2003). Il danno generato dalla neurotossina sembrerebbe portare le cellule della *substantia nigra pars compacta* all’apoptosi (Tatton W.G. et al., 2003; Serra P.A. et al., 2002), determinando nell’uomo e negli altri primati una sindrome irreversibile i cui segni clinici comprendono il tremore, la rigidità, la lentezza nei movimenti e l’instabilità posturale.

L'MPP⁺ è anche capace di legarsi ai trasportatori vescicolari delle monoamine (VMAT) accumulandosi nelle vescicole che contengono DA per poi interferire con il trasporto ed il rilascio del neurotrasmettitore (Schober A., 2004).

Un'altra molecola utilizzata nei laboratori di ricerca quale modello di Parkinson chimico è la 6-idrossi-dopamina (**6-OH-DA**) una neurotossina che, come l'MPTP può interferire con il complesso I della catena respiratoria mitocondriale, come dimostrato da esperimenti condotti in cavie da laboratorio.

In particolare, è un'analogo idrossilato della DA che ha un'elevata affinità per i trasportatori della dopamina e per quelli della noradrenalina; danneggia la via catecolaminergica del sistema nervoso centrale e periferico poiché penetra nei neuroni dopaminergici e noradrenergici ove viene prodotto H₂O₂ e parachinone. (Bovè J. et al., 2005).

Inoltre, diversi studi mostrano una correlazione fra il MP e l'esposizione sia acuta che cronica a pesticidi, insetticidi e fungicidi (ad esempio paraquat e rotenone) (Jiménez-Jiménez F.J. et al 1992; Gorell J.M. et al., 1998) e metalli (ad esempio manganese, alluminio, ferro, rame) in seguito ad assunzione di acqua e cibo contaminato, per contatto cutaneo o attraverso inalazione diretta.

Il **rotenone** è un composto di origine naturale estratto dalle radici di alcune piante tropicali, utilizzato in agricoltura come insetticida e pesticida. E' altamente lipofilo e può essere accumulato all'interno dei mitocondri nei quali interferisce con la fosforilazione ossidativa danneggiando il complesso I della catena respiratoria mitocondriale

(Greenamyre J.T. et al., 2003). Studi recenti, su cavie da laboratorio, dimostrano che il rotenone induce la morte selettiva dei neuroni dopaminergici e la formazione dei corpi di Lewy compromettendo le funzioni motorie degli animali trattati. (Höglinger G.U et al., 2003).

Il **paraquat** è una molecola altamente tossica utilizzata in agricoltura come diserbante. La sua tossicità è dovuta alla formazione dello ione superossido ($O_2^{\cdot-}$) e altre specie reattive dell'ossigeno (ROS) portando alla morte cellulare a causa dell'elevato stress ossidativo.

Non diffonde facilmente attraverso la barriera ematoencefalica, tuttavia, dosi elevate di questa molecola provocano imminenti danni cerebrali, come riscontrato in persone decedute in seguito ad intossicazione da paraquat (Day B.J. et al., 1999).

1.3 Specie reattive dell'ossigeno e stress ossidativo

Nel morbo di Parkinson, così come in altre malattie neurodegenerative, lo stress ossidativo ha un ruolo determinante nell'insorgenza e nella progressione della malattia; in particolare, un'elevata produzione di ROS (quali l'acqua ossigenata (H_2O_2), il nitrossido (NO), lo ione superossido ($O_2^{\cdot-}$), i radicali idrossilici (OH^{\cdot})) (Barnham K.J et al., 2004) ed un basso livello di antiossidanti genera uno squilibrio metabolico che porta ad un'alterazione delle strutture biologiche cellulari in seguito alla distruzione di una varietà di molecole tra cui proteine, lipidi e acidi nucleici.

Nel cervello, dove viene consumato circa il 20% dell'ossigeno prodotto dall'organismo, le cellule, utilizzano dei meccanismi di difesa contro lo stress ossidativo fra i quali diversi enzimi con attività antiossidante, (catalasi, superossido dismutasi, glutazione perossidasi e riduttasi), ed antiossidanti naturali (quali le vitamine e l'acido urico) garantendo una costante rimozione dei ROS (Pappolla M.A. et al., 1992).

Nella *substantia nigra pars compacta* si riscontrano elevati livelli di ROS già in condizioni fisiologiche; i neuroni dopaminergici infatti sono particolarmente vulnerabili allo stress ossidativo a causa del metabolismo stesso della DA (Sudha K. et al., 2003). Questo neurotrasmettitore subisce due processi di degradazione. Il primo (degradazione enzimatica) avviene a livello intracellulare ed è mediato da enzimi appartenenti alla classe delle MAO di cui sono state identificate due isoforme: le MAO A, presenti principalmente nei

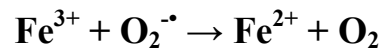
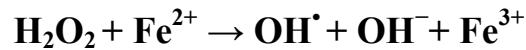
neuroni dopaminergici e le MAO B, presenti nelle cellule astrocitarie. La degradazione della DA operata dalle monoaminossidasi porta alla formazione di sottoprodotti quali perossido di idrogeno (H_2O_2) e altre specie reattive dell'ossigeno tra cui radicali idrossilici e anioni superossido (Jenner P., 2003).

Solitamente a basse concentrazioni l' H_2O_2 non è tossica per le cellule ed è convertita ad H_2O dall'enzima glutatione perossidasi, utilizzando il glutatione (GSH) come substrato riducente. Tuttavia nella SNpc sono presenti basse concentrazioni di GSH e questo spiega l'accumulo di specie radicaliche in tale area, che è sottoposta quindi ad un forte stress ossidativo (Kaur D. and Andersen J., 2004); negli astrociti invece sono presenti concentrazioni maggiori di GSH pertanto sono meno vulnerabili allo stress ossidativo rispetto ai neuroni dopaminergici.

D'altro canto la dopamina è sottoposta anche ad un processo di degradazione spontanea (auto-ossidazione), nel corso del quale si ha la formazione di 6-OH-DA e altri sottoprodotti tossici.

Questi processi catalitici (degradazione enzimatica e non-enzimatica) possono essere accelerati in presenza di altri metalli di transizione tra cui ferro (Fe), rame (Cu) e manganese (Mn).

Nella **figura 9** è possibile osservare, in particolare, come quantità notevoli di ferro bivalente (Fe^{2+}), normalmente riscontrabili nella sostanza nera di Sömmering, possano reagire con l' H_2O_2 generando radicali idrossilici (OH^\bullet) e anioni superossido ($O_2^{\bullet-}$), altamente citotossici, attraverso la reazione di Fenton di seguito riportata:



e la reazione di Haber- Weiss:

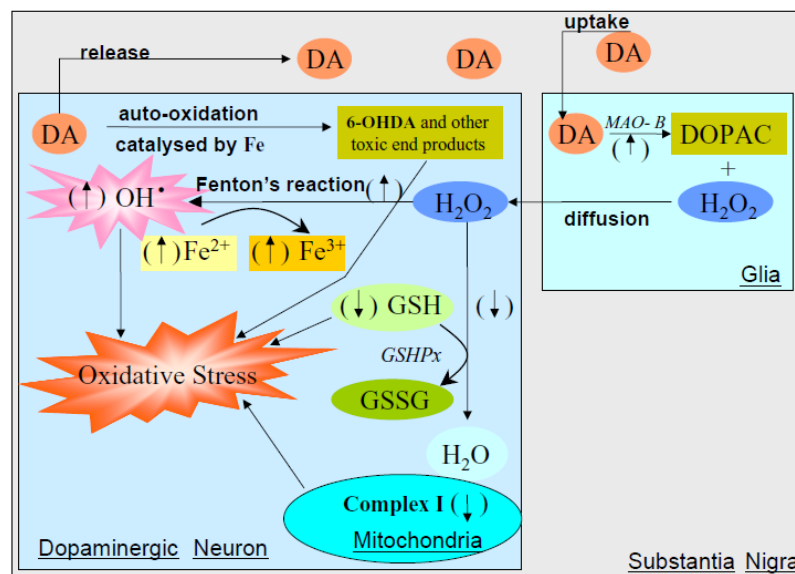
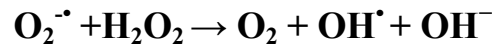


Figura 9.

In entrambe le reazioni il ferro deve essere presente in forma libera ovvero non legato alla ferritina. Il nitrossido (NO) contribuisce al distacco del ferro dalla ferritina, con conseguente accumulo di Fe^{2+} all'interno della cellula e attivazione delle due reazioni sopracitate (Kaur D., Andersen J., 2004).

Anche la neuromelanina (NM), sito di accumulo del ferro nella SNpc, può favorire questi processi; in presenza di elevate concentrazioni di

ferro sembrerebbe agire da pro-ossidante portando alla formazione del radicale idrossilico attivando la reazione di Fenton o di Haber- Weiss. Il manganese merita un'attenzione particolare poiché l'intossicazione cronica da tale metallo favorisce l'insorgenza del MP. Minatori cileni del manganese, esposti a tale metallo svilupparono la patologia in modo superiore rispetto alla popolazione di controllo (Elbaz A. and Moisan F., 2008). La tossicità del manganese è stata mostrata anche in studi successivi, condotti sia *in vitro* che *in vivo*. Sulla linea tumorale PC12, un modello sperimentale catecolaminergico, il manganese è in grado di innescare processi apoptotici (Desole M.S. et al., 1997) favorendo l'ossidazione dei catecoli tra cui L-DOPA e DA (Migheli R. et al., 1999); tali fenomeni sono stati osservati anche *in vivo* (Serra P.A. et al., 2000). I processi di ossidazione possono essere inibiti dalla somministrazione di alcuni antiossidanti tra cui lo N-acetil-cisteina (NAC) e l'acido ascorbico (AA).

1.4 Potenzialità terapeutiche delle aNSC nel Morbo di Parkinson

Lo stress ossidativo gioca un ruolo determinante nell'insorgenza e nell'evoluzione di alcune neuropatologie, tra cui la malattia di Parkinson. L'obiettivo dei ricercatori è quello di identificare antiossidanti in grado di bloccare o rallentare questo processo. Recenti lavori, hanno messo in evidenza le proprietà antiossidanti delle cellule staminali neurali adulte alimentando grandi speranze sulla possibilità

di sfruttare le stesse per scopi riparativi o sostitutivi in tessuti danneggiati (Madhanan L. et al., 2005).

Tuttavia per quel che concerne l'impiego terapeutico delle staminali, è necessario adottare un certo grado di cautela poiché lo stesso è ostacolato da almeno due grandi difficoltà: la prima è costituita dalla difficile reperibilità di cellule staminali nell'adulto e dal fatto che quindi possono essere isolate solo da embrioni, con conseguenti problemi di natura etica. Fattore cruciale per il successo di tutte queste terapie è infatti la quantità di cellule: sono necessari almeno 5-6 aborti per ottenere un numero di cellule staminali utili al recupero funzionale di un solo paziente parkinsoniano. La seconda è legata a eventuali incompatibilità immunologiche (fenomeni di rigetto che si verificano nei trapianti d'organo) e ad effetti collaterali come la proliferazione incontrollata delle cellule staminali e la formazione di masse tumorali nella sede del trapianto. Ma la valutazione di queste problematiche, anche se finora controversa, non ha scoraggiato molti ricercatori dal credere che la strada per arrivare alla cura del Parkinson passi attraverso la terapia cellulare.

Esperimenti condotti *in vitro* hanno evidenziato che le aNSC sono in grado di proteggere i neuroni danneggiati dallo stress ossidativo grazie alle loro proprietà intrinseche: hanno cioè meccanismi di difesa e vigilanza antiossidante superiori alle cellule neurali postmitotiche (PCN).

Tali meccanismi sono complessi e includono la sintesi di fattori neurotrofici ad esempio il fattore neurotrofico ciliare (CNTF) e il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF), le citochine,

l'espressione di varie molecole antiossidanti e antiapoptotiche, la presenza di proteine in grado di riparare il DNA e proteggere il genoma e la motilità grazie alla quale le aNSC sono in grado di rimpiazzare o riparare le cellule danneggiate.

Lavori scientifici infatti riportano la capacità delle cellule della SVZ di migrare nella zona lesa ove si possono differenziare e/o fornire supporto e neuroprotezione (Brundin L. et al., 2003). Alcuni fattori chemiotattici di produzione astrocitaria e soprattutto microgliale svolgono un ruolo cruciale nel richiamo delle cellule verso il sito di lesione (Rebenko-Moll N.M. et al., 2006). Recentemente è stato evidenziato, grazie a esperimenti condotti sia *in vitro* che *in vivo* (Madhanan L. et al., 2008), che le aNSC possiedono, rispetto alle PCN (una linea tumorale) una minore quantità di ROS e una marcata espressione di enzimi antiossidanti quali la catalasi, il glutatione perossidasi (GP), la *uncoupling protein 2* (UCP2) e la superossidodismutasi 2 (SOD2). Sebbene anche i neuroni possiedano alcune di queste caratteristiche sopra menzionate, la maggior parte delle regioni del cervello non sono in grado di sfruttarle a causa delle innumerevoli influenze dell'ambiente circostante e del processo dell'invecchiamento.

E' stato quindi interessante notare che, esiste un vera e propria comunicazione tra le aNSC e il microambiente neuronale circostante il quale viene preservato dalla nicchia staminale. L'importanza delle sostanze neurotrofiche precedentemente menzionate (CNTF e VEGF), espresse in elevate quantità dalle aNSC, è dovuta al fatto che sono in grado di controllare, in maniera diretta, la produzione di molecole

antiossidanti sia da parte delle stesse staminali sia da parte degli astrociti (Madhavan L. et al., 2008). Ciò potrebbe essere uno dei meccanismi di neuroprotezione mediati dalle aNSC.

In virtù di questi meccanismi di protezione e “vigilanza” antiossidante, il trapianto di aNSC potrebbe rappresentare una valida prospettiva terapeutica per numerose patologie neurodegenerative al momento incurabili, tra cui il Morbo di Parkinson.

La produzione di ROS è uno dei meccanismi imputabili alla degenerazione progressiva e irreversibile dei neuroni della *substantia nigra pars compacta* di pazienti parkinsoniani, con conseguente deplezione di dopamina a livello dello striato. Allo stato attuale non è presente alcuna cura risolutiva poiché i farmaci utilizzati (principalmente L-DOPA) non eliminano la causa della patologia ma apportano dei benefici momentanei rallentando i processi neurodegenerativi.

Negli ultimi anni, l’interesse della comunità scientifica si è focalizzato sulla terapia cellulare con la convinzione che la stessa possa dare un’importante contributo nella lotta contro le malattie neurodegenerative come dimostrano alcuni esperimenti condotti su roditori e primati da laboratorio. Il trapianto di NSC nel cervello di modelli murini di PD infatti è risultato efficace nell’attenuare i deficit funzionali e anatomici, grazie al rilascio di neurotrasmettitori specifici, alla produzione di fattori neurotrofici e al ripopolamento cellulare. Bjugstad K.B. nel 2005 e Redmond D.E nel 2007, hanno dimostrato *in vivo* che cellule staminali neurali umane (hNSC) trapiantate nel cervello di scimmie trattate con la neurotossina MPTP,

sono in grado di riportare ai livelli di controllo, il numero di cellule tirosina idrossilasi positive (TH⁺) secernenti DA, ripristinando il normale rapporto dimensioni-numero degli elementi neuronali danneggiati e riducendo gli aggregati di α -sinucleina (Bjugstad KB et al., 2005; Redmond D.E. et al., 2007). Si è ipotizzato perciò che oltre al ripristino del tono dopaminergico, possa esservi un ripristino funzionale dell'intera via nigro-striatale (Redmond D.E. et al., 2007). Riassumendo, le aNSC impiantate nel cervello potrebbero agire attraverso diversi meccanismi, ovvero: stimolare la risposta plastica o l'attività neurale nel tessuto danneggiato dell'ospite, secernendo fattori neurotrofici; ripristinare il rilascio di neurotrasmettitori sinaptici, che favoriscono la reinnervazione locale; infine potrebbero integrarsi nelle preesistenti reti neurali e sinaptiche, ristabilendo le connessioni afferenti ed efferenti. In conclusione dunque, si può assumere che le proprietà antiossidanti e neuroprotettive intrinseche delle aNSC, potrebbero rappresentare un buon punto di partenza nella cura di innumerevoli malattie, tra cui il Morbo di Parkinson.

1.5 Acido ascorbico

L'acido L-ascorbico (AA, vitamina C), è una molecola idrosolubile coinvolta in varie reazioni biochimiche e cellulari degli organismi viventi. Gran parte dei mammiferi sintetizza la vitamina C nel fegato, a partire dal D-glucosio. Tuttavia, alcuni primati, incluso l'uomo, devono necessariamente introdurre lo AA con la dieta (frutta e vegetali) in quanto hanno perso nel corso dell'evoluzione la capacità di sintetizzarlo poiché non possiedono l'enzima chiave della sua biosintesi, la L-gulono-gamma-lattone-ossidasi (Hediger M.A., 2002). Il principale ruolo della vitamina C è quello di molecola antiossidante, in grado di neutralizzare l'azione di pericolose sostanze ossidanti (specie radicaliche) e di inibire processi dannosi per le cellule quali ad esempio la perossidazione lipidica (Corti A. et al., 2010). Lo AA è considerato attualmente come uno degli antiossidanti più potenti (Kim E.J. et al., 2008), in grado di proteggere le cellule dallo stress ossidativo sia riducendo i gruppi ossidati dai centri prostetici degli enzimi, sia rimuovendo le specie radicaliche dal microambiente. Oltre a ciò, l'acido ascorbico svolge altre importanti funzioni nell'organismo: agisce come cofattore in molte reazioni enzimatiche, in particolare, gioca un ruolo significativo nella biosintesi del collagene e della carnitina, nella conversione del neurotrasmettitore dopamina in noradrenalina, nella sintesi del colesterolo, degli amminoacidi e di alcuni ormoni peptidici; è inoltre coinvolto nell'assorbimento del ferro a livello intestinale e nella rigenerazione, a livello delle membrane cellulari, della vitamina E (α -tocoferolo)

(Linster C.L. and Van Schaftingen E., 2007). Recenti lavori riportano il ruolo determinante del AA nel differenziamento dei neuroni dopaminergici (Yan J. et al., 2001).

La carenza di vitamina C nella dieta causa una sindrome nota come scorbuto.

In generale, è presente nell'ordine delle millimoli all'interno delle cellule e nell'ordine delle micromoli nei fluidi extracellulari (ad esempio 40-80 μM nel plasma e 200-400 μM nel fluido extracellulare cerebrale). I più elevati livelli di acido ascorbico sono stati riscontrati nella ghiandola surrenale, nei globuli bianchi, nel muscolo scheletrico e nel cervello nel quale la concentrazione del AA varia tra i 2 e i 10 mM; in particolare, concentrazioni elevate di acido ascorbico sono state riscontrate nell'amigdala, nell'ippocampo e nell'ipotalamo (Kim J.E. et al., 2008) (**Figura 10**).

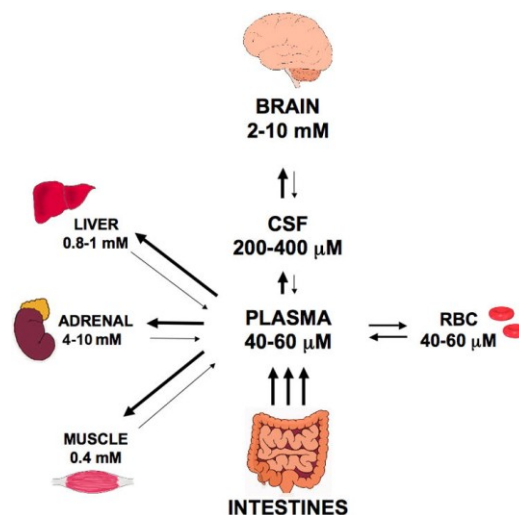


Figura 10. Contenuto di acido ascorbico nel plasma e nei diversi organi. (Harrison F and May M.J. 2009)

La vitamina C è presente nelle cellule e nei fluidi biologici essenzialmente in forma ridotta ossia come acido ascorbico il quale può essere ossidato (mediante trasferimento di un elettrone) a deidroascorbato (DHAA) (Corti D.A. et al., 2010) (**Figura 11**).

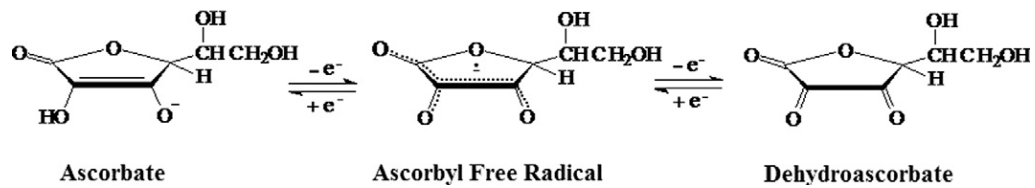


Figura 11. Forma ridotta e ossidata della vitamina C.

1.5.1 Trasportatori dell'acido ascorbico

L'assorbimento dell'acido ascorbico nell'organismo avviene per mezzo dei trasportatori della vitamina C sodio dipendenti (Sodium-dependent Vitamin C Transporter), clonati e caratterizzati per la prima volta nel 1999 (Harrison F and May M.J. 2009).

Sono state identificate due isoforme, SVCT1 ed SVCT2, che, sebbene mostrino elevata omologia (65%) nella sequenza amminoacidica e nella struttura proteica, hanno una differente distribuzione tissutale (Takanaga H. et al., 2004).

Il trasportatore SVCT1 è una proteina costituita da 604 amminoacidi, localizzato a livello della membrana apicale negli epitelii dell'intestino, del fegato, del rene e in alcuni tessuti endocrini. SVCT2

è costituito da 592 amminoacidi, è localizzato sulla superficie basolaterale delle cellule di gran parte dei tessuti dell'organismo, ma, in misura maggiore nel cervello (soprattutto a livello neuronale di corteccia, ippocampo e cervelletto), nella retina, nel sistema endocrino e nelle ossa (Hedigher M.A., 2002; Garcia Mde L. et al., 2005).

Entrambi i trasportatori sono specifici per l'acido L-ascorbico e non sono in grado di trasportare altri composti quali l'acido D-isoascorbico e il deidroascorbato.

Il trasporto attivo della vitamina C attraverso lo SVCT2, fa sì che tale molecola venga distribuita negli organi e nelle cellule dove svolge una specifica funzione.

Il cervello, rispetto agli altri organi, contiene quantità elevate di acido ascorbico le cui concentrazioni si aggirano intorno ai 200-400 μM , a livello dei fluidi extracellulari e sono circa 10 volte più elevate all'interno del compartimento cellulare (2-10 mM).

Lo SVCT2 media il trasporto di acido ascorbico nel plesso corioideo (epitelio che separa il sangue dal tessuto nervoso) rilasciandolo nel liquido cerebrospinale. L'acido ascorbico viene così immagazzinato nei neuroni attraverso gli SVCT2, al fine di proteggere il microambiente dalle specie reattive dell'ossigeno, a cui il cervello è particolarmente suscettibile. Il metabolismo ossidativo a livello neuronale è infatti particolarmente elevato, perciò è indispensabile garantire, un costante rifornimento di acido ascorbico. A tal proposito intervengono gli astrociti che, sono in grado di rigenerare l'acido ascorbico a partire dal DHAA prodotto a livello neuronale.

Quest'ultimo, viene assorbito dalle cellule con un meccanismo di diffusione facilitata attraverso i trasportatori del glucosio appartenenti alla famiglia del GLUT. Si tratta di proteine transmembrana presenti nella maggior parte delle cellule dei mammiferi. Nell'uomo esistono diverse isoforme di GLUT, le quali, nonostante siano strutturalmente simili, differiscono per proprietà e per localizzazione.

Da numerosi studi emerge che le isoforme deputate al trasporto del DHAA sono: GLUT1 e GLUT3. Alcuni lavori includono anche l'isoforma GLUT4 (Rumsey S.C. et al., 2000).

Nel cervello, il DHAA esce dai neuroni attraverso il GLUT3 e, viene trasportato negli astrociti attraverso il GLUT1. All'interno dell'astrocita il deidroascorbato viene ridotto ad acido ascorbico il quale può così essere ricaptato dai neuroni attraverso lo SVCT2 (Hedigher M.A., 2002) (**Figura 12**).

Ancora non è completamente noto il meccanismo attraverso il quale, l'acido ascorbico prodotto a livello astrocitario, sia rilasciato a livello extracellulare; alcuni ricercatori ritengono possa trattarsi di un'eteroscambio fra acido ascorbico e glutammato (Miele M. et al., 1994; Wilson J.X. et al., 2000).

Il ciclo AA-DHAA tra neurone e astrocita spiega l'abbondante presenza della vitamina C nel sistema nervoso centrale preservando il microambiente neuronale dalle specie reattive dell'ossigeno e garantendo l'integrità strutturale. L'acido ascorbico dunque, potrebbe avere un'importante ruolo nella terapia di diverse patologie neurodegenerative, compreso il Morbo di Parkinson (Harrison F. and May J.M., 2009).

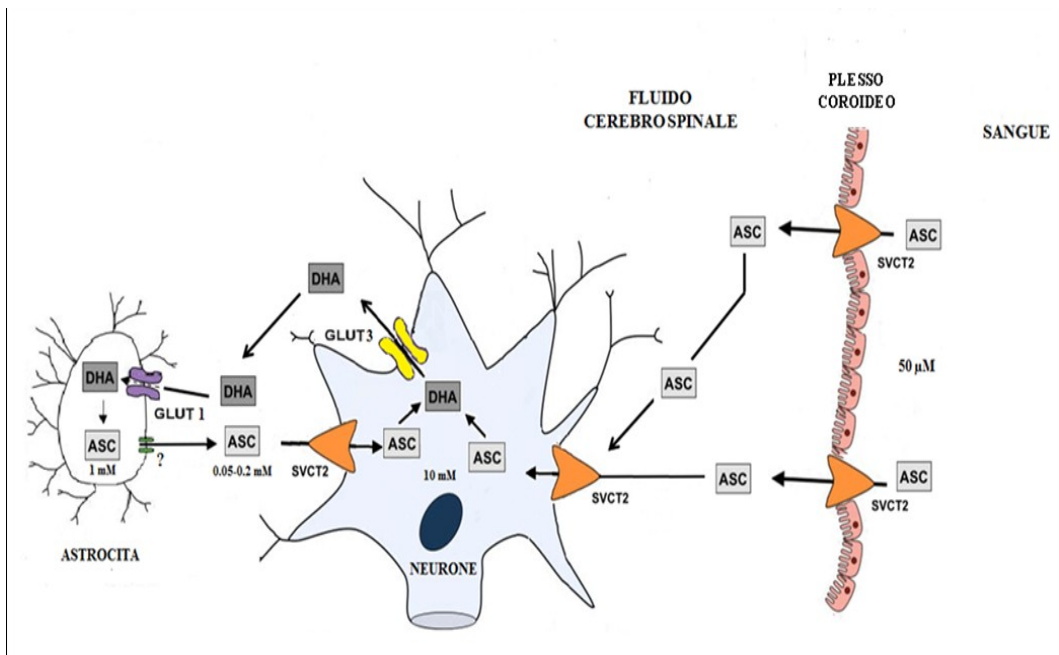


Figura 12. *Illustrazione schematica del ciclo AA/DHAA tra neuroni e astrociti*

2. SCOPO DELLA RICERCA

L'obiettivo principale di questo lavoro è stato quello di caratterizzare morfologicamente le neurosfere prelevate dalla SVZ di topi C57BL/6 e studiarne le proprietà antiossidanti in relazione ad un loro potenziale utilizzo nella malattia di Parkinson; il trapianto delle aNSC potrebbe rappresentare infatti una valida alternativa terapeutica per tale malattia per la quale al momento non è presente una cura risolutiva.

Nello specifico, ci si è proposti di:

- valutare la capacità delle aNSC di captare, ridurre e secernere l'acido ascorbico ed individuarne i relativi trasportatori per la forma ridotta (SVCT2) e per quella ossidata (GLUTs).
- dimostrare che l'AA riduce l'effetto tossico indotto dal manganese e dalla sua associazione con L-DOPA.
- verificare la capacità delle aNSC di proteggere da auto-ossidazione alcune molecole chiave, oggetto di questo studio, quali la dopamina, la L-Dopa e l'acido ascorbico.
- dimostrare che la dopamina e la L-DOPA inducono un aumento della *viability* delle aNSC e identificare sulle stesse i recettori dopaminergici D2L.

3. MATERIALI E METODI

3.1 *Animali sacrificati per l'espianto della zona subventricolare (SVZ)*

Le cellule staminali neurali adulte (aNSC) sono state prelevate dalla SVZ di topi C57BL/6 maschi (Charles Rivers, Milano, Italia) di 8 settimane con peso corporeo di circa 25 g. Tutti gli animali sono stati stabulati in condizioni standard di luce e buio (luce dalle 7.00 a.m. alle 7.00 p.m.) ad una temperatura compresa tra i 19 e i 22 °C, con disponibilità di cibo e acqua “ad libitum” in base alle norme vigenti (Direttiva della Comunità Europea 86/609 inclusa nel decreto legge n° 116/1992 del ministro della salute della Repubblica Italiana).

3.2 *Espianto della zona subventricolare*

La zona subventricolare è stata prelevata dal cervello dei topi C57BL/6, sminuzzata con forbicine e immersa nel buffer di digestione (vedi sottoparagrafo **3.2.1**) per 30 minuti a 37°C. Il tessuto digerito è stato centrifugato (1100 r.p.m. per 12 minuti) e lavato due volte nel medium *complete plus* (vedi sottoparagrafo **3.3.1**); dopo aver dissociato meccanicamente il *pellet*, le cellule sono state trasferite in flask p25 contenenti il terreno di coltura ed incubate a 37°C in atmosfera umidificata (95% aria/5% CO₂) per 10-15 giorni fino alla stabilizzazione della coltura.

3.2.1 Composizione del buffer di digestione

Il buffer è stato preparato con 25 mL di *Earle's Balanced Salt solution* (EBSS; Gibco, Italia) nel quale sono stati sciolti 5mg di cisteina, 5mg di acido etilendiamminotetraacetico (EDTA; Sigma-Aldrich, Italia) e 20mg di papaina (27 unità/mg di proteina) (Roche, Italia). La soluzione è stata filtrata prima dell'uso.

3.3 Colture cellulari staminali

Nel presente studio sono state utilizzate cellule staminali neurali adulte provenienti dalla zona subventricolare di topi C57BL/6. Le cellule sono state piastrate ad una densità di 70000 cell./mL, divise ogni 4 giorni, coltivate nel medium “*complete plus*” (vedi sottoparagrafo 3.3.1) e mantenute a 37°C in atmosfera umidificata (95% aria / 5% CO₂).

3.3.1 Composizione del medium di coltura complete plus

Le aNSC sono state propagate in un terreno di coltura composto da:

- 375 mL di H₂O apirogena per preparazioni iniettabili (Fresenius Kabi, Italia);
- 50mL di *Dulbecco's Modified Eagles medium* 10X (DMEM/F-12) (Life Technologies, Italia);

- 5mL di penicillina/streptomicina (P/S) (Life Technologies, Italia);
- 5 mL di L-glutamina 200 mM, (Life Technologies, Italia);
- 10 mL di glucosio al 30%, (Sigma Aldrich, Italia);
- 7.5 mL di NaHCO₃ al 7.5%, (Sigma Aldrich, Italia);
- 2.5 mL di hepes 1M, (Sigma Aldrich, Italia);
- 1 mL di eparina 0.2% (Sigma Aldrich, Italia);
- 50 µL del fattore di crescita fibroblastico (FGF-2; 10 ng/mL) (Listarfish, Italia);
- 50µL del fattore di crescita epidermico (EGF; 20 ng/mL) (Listarfish, Italia);
- 50 mL di ormone mix 10x (per composizione vedi sottoparagrafo 3.3.2).

3.3.2 Composizione dell'ormone mix

L' ormone mix è composto da:

- 40mL di DMEM/F-12 10X (Life Technologies, Italia);
- 8 mL di glucosio al 30%,(Sigma-Aldrich, Italia);
- 6 mL di NaHCO₃ al 7.5%,(Sigma-Aldrich, Italia);
- 2 mL di hepes 1M, (Sigma-Aldrich, Italia);
- 400 mg di apo-transferrina, (Sigma-Aldrich, Italia);
- 100 mg di insulina (da sciogliere in 4mL di HCl 0.1N portando, infine, a volume con 36 mL di H₂O apirogena), (Sigma-Aldrich, Italia);

- 38.6 mg di putrescina (da sciogliere in 40 mL di H₂O apirogena), (Sigma-Aldrich, Italia);
- 40µL di progesterone 2mM, (Sigma-Aldrich, Italia);
- 40µL di sodio-selenite 3 mM (Sigma-Aldrich, Italia);
- 300 mL di H₂O apirogena per preparazioni iniettabili (Fresenius Kabi, Italia).

La soluzione deve essere filtrata e conservata, in provette sterili da 50 mL, in freezer a -20°C.

3.4 Sostanze chimiche utilizzate per gli esperimenti

Per la realizzazione di questa tesi sono state utilizzate le seguenti molecole:

- *L-dihydroxyphenyl-alanina* (L-DOPA) (Sigma-Aldrich, Italia);
- dopamina (DA), (Sigma-Aldrich, Italia);
- acido ascorbico (AA), (Sigma-Aldrich, Italia);
- acido deidroascorbico (DHAA), (Sigma-Aldrich, Italia);
- *phloretin*, (Sigma-Aldrich, Italia);
- cloruro di manganese (MnCl₂), (Sigma-Aldrich, Italia);
- *cytochalasin B*, (Sigma-Aldrich, Italia).

3.5 Vitalità cellulare (Saggio MTT)

La vitalità (*viability*) delle colture, sottoposte a trattamenti farmacologici, è stata valutata mediante il saggio del 3-(4,5,-

dimetiltiazolo-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT) (Sigma-Aldrich, Italia).

Le cellule vitali, piastrate alla densità di 70000 cell./mL ed incubate per 4 ore a 37°C con 200 µl di MTT (soluzione madre 5mg/mL), sono in grado di metabolizzare il sale di tetrazolio in cristalli di blu formazano (insolubili in soluzione acquosa); dopo due lavaggi con un tampone fosfato salino (PBS), sono state centrifugate a 4000 r.p.m per 15 minuti e risospese in 2 mL di isopropanolo per sciogliere i cristalli di blu formazano; dopo un'ultima centrifuga a 4000 r.p.m. per 5 minuti, è stato prelevato il surnatante per la lettura dell'assorbanza a 580 nm con il lettore di micropiastre (*Bauty diagnostic microplate reader*).

3.6 Analisi neurochimica

Le sostanze da noi studiate, sono state identificate e quantificate mediante la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) utilizzando una pompa Varian 9001 HPLC con iniettore Rheodyne (mod.7725), una colonna a fase inversa (Adsorbosphere C18, 100 mm x 4.6 mm i.d. dimensione delle sfere: 3µm) (Alltech, USA) ed un rivelatore elettrochimico BAS (mod. LC4B).

La fase mobile utilizzata per gli esperimenti è composta da KH₂PO₄ (2.1 g/L), K₂HPO₄ (0.7 g/L), EDTA (0.5 mM), sodio ottilsolfato (100 mg/L), metanolo 8% con pH=2.65, velocità di flusso 0.8 mL/minuto e potenziale applicato +780 mV.

3.7 Immunocitochimica

Le staminali, piastrate su vetrini collagenati (o in alternativa trattati con poliornitina/laminina), dopo 3 lavaggi in PBS sono state fissate con paraformaldeide (al 4% in PBS) per 45 min a temperatura ambiente. Dopo la fissazione e 3 lavaggi in PBS, le cellule sono state permeabilizzate con *Triton X-100* (0.2% in PBS, Fluka) per 10 min a temperatura ambiente. Si è, quindi, proceduto con la marcatura incubando le cellule con l'anticorpo primario per 120 min; trascorse le 2 ore le cellule sono state lavate con PBS ed incubate con l' anticorpo secondario per altri 60 minuti in camera umida. Infine le cellule sono state lavate con tampone fosfato ed il DNA nucleare evidenziato utilizzando il fluorocromo 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI 3 µg/ml, Sigma Italia) in PBS, per 10 min a temperatura ambiente. I preparati sono stati osservati e fotografati con il microscopio a fluorescenza Nikon TE300.

Anticorpi utilizzati nel presente lavoro:

Anticorpi primari:

- anti-nestina (rabbit polyclonal, diluizione 1:100 Sigma Aldrich Italia);
- anti-proteina fibrillare gliale acida (GFAP); mouse monoclonal, diluizione 1:500 Chemicon International);
- anti-β tubulina III (mouse monoclonal, diluizione 1:100 Sigma Aldrich Italia);
- anti-glucose transporter-1 (GLUT-1; rabbit polyclonal, diluizione 1:100 Millipore California);

- anti-sodium-dependent vitamin C transporter 2 (SVCT-2; goat polyclonal, diluizione 1:100 Santa Cruz Biotechnology Inc., California);
- anti-D2L (goat polyclonal, diluizione 1: 100, Santa Cruz).

Anticorpi secondari:

- goat anti-rabbit TRITC (diluizione 1:160, Sigma Aldrich Italia);
- goat anti-mouse TRITC (diluizione 1:100, Sigma Aldrich Italia);
- goat anti-rabbit FITC (diluizione 1:160, Sigma Aldrich Italia);
- rabbit anti-goat FITC (diluizione 1:250, Sigma Aldrich Italia).

3.8 Microscopia ottica

Le cellule sono state osservate con un microscopio Nikon TE300, con colonna d'illuminazione da 100W e condensatore modulare, e fotografate con fotocamera Nikon digitale D50 *single-lens reflex* (SLR).

3.9 Microscopia elettronica a scansione (SEM) e a trasmissione (TEM)

La caratterizzazione morfologica e ultrastrutturale delle aNSC è stata effettuata mediante la microscopia elettronica a scansione (SEM) e a trasmissione (TEM).

3.9.1 SEM

Le neurosfere sono state prefissate con glutaraldeide al 1% in tampone fosfato (pH 7.4) per 4 h. Dopo un lavaggio in PBS, le cellule sono state postfissate per 120 min con tetrossido di osmio (OsO_4) all'1% in tampone fosfato. I campioni sono stati successivamente sottoposti a disidratazione in una serie crescente di acetone (da 25 al 100%) e quindi trattate con esametildisilazano (HMDS, Sigma). Dopo l'evaporazione di quest'ultimo reagente (nella cappa chimica) le neurosfere sono state osservate, in *low vacuum*, con il microscopio elettronico a scansione ESEM FEI QUANTA 200.

3.9.2 TEM

Le cellule raccolte in flask da 75 cm² sono state centrifugate a 700 rpm per 10 min. I *pellets* cellulari ottenuti sono stati fissati per 2 h in glutaraldeide al 2.5% in tampone cacodilato di sodio (CB 0.1 M a pH 7.4). Dopo il lavaggio con CB contenente il 6% di saccarosio, i *pellets* sono stati post-fissati in OsO_4 1% in CB per 90 min a 4°C. Al termine della post-fissazione, le cellule sono state risospese in 1 ml di agarosio al 2% in acqua a 37°C e centrifugati a 300 x g per 10 min a 37°C. Dopo la centrifugazione ed 1h di permanenza a 4°C, i campioni sono stati frammentati e disidratati in una serie crescente di acetone (25%-100%). Infine, i frammenti sono stati inclusi in resina epossidica (Agar 100 standard) a 60°C per 48 h. Le sezioni ultrafini sono state colorate con acetato di uranile e citrato di piombo e quindi osservate con il microscopio elettronico a trasmissione ZEISS EM 900.

3.10 Western Blot

Proteine separate mediante SDS-PAGE, sono state trasferite su apposite membrane di nitrocellulosa e successivamente visualizzate con l'utilizzo di specifici anticorpi. Dopo aver lavato le neurosfere con PBS freddo queste sono state trattate con il buffer di lisi e centrifugate a 12000 rpm per 20 minuti in modo tale da ottenere un surnatante chiaro. Obiettivo successivo è stato determinare la concentrazione proteica con il kit *Bradford protein assay*, denaturare le proteine con il *Laemmli Buffer* e caricare, su SDS/PAGE 20 γ di proteine totali. Al termine dell'elettroforesi è stato effettuato l'elettroblotaggio, ovvero, il trasferimento delle proteine dal gel SDS/poliacrilammide su una membrana di nitrocellulosa utilizzando il *Transfert Buffer* ad amperaggio costante (0,8 mA per 2 h). In seguito la membrana è stata lavata per due volte con PBS e preibridata con latte al 3% (sciolto in PBS/Tween[®]20 allo 0.05%) per 1 h a temperatura ambiente. Allo scadere dei 60 minuti la membrana è stata incubata, a +4° C per 16 h (in agitazione), con l'anticorpo primario specifico (goat anti-SVCT2 in latte al 3% in PBS/Tween 20). Trascorse le 16 h la membrana è stata incubata per 1h con l'anticorpo secondario (anti-goat HRP), lavata con PBS/Tween[®]20 per 3 volte e sviluppata in chemiluminescenza utilizzando la soluzione *ECL Plus substrate* (Reagente A) e acridan in diossano/etanolo (Reagente B). La soluzione, a contatto con l'enzima, presente sull'anticorpo secondario, ha generato fotoni rilevabili dal ChemiDoc[™] XRS consentendo così la visualizzazione delle bande di proteine di nostro interesse.

3.11 Preparazione dei campioni per la citofluorimetria

Le staminali, coltivate in flask di 75 cm², sono state raccolte per centrifugazione (1500 rpm per 10 minuti). Dopo un lavaggio con PBS, le neurosfere sono state disgregate e fissate in etanolo al 70% a 4°C per 30 min. La fluorocromizzazione del DNA (45 minuti) è stata effettuata con ioduro di propidio (PI) in tampone fosfato a temperatura ambiente (pH 7.4). Al termine della colorazione le cellule sono state iniettate nel citofluorimetro C6 Accuri.

4. RISULTATI

Le cellule staminali neurali adulte per questa tesi di dottorato sono state prelevate dalla zona subventricolare (SVZ) di topi C57BL/6; queste, in opportune condizioni di coltura, formano le neurosfere (**Figura 13**).

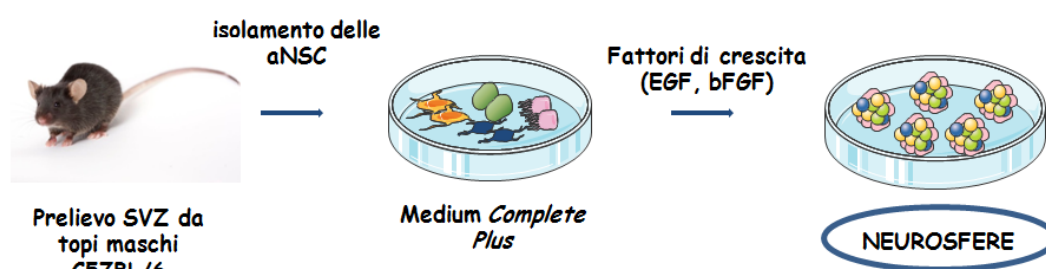


Figura 13.

L'esposizione della coltura ad alcune sostanze insieme alla caratterizzazione immunocitochimica hanno consentito di chiarire alcuni aspetti neurochimici e biologici delle aNSC.

4.1 Effetto dell'acido ascorbico e del deidroascorbato sulla viability delle cellule staminali

Il trattamento con AA 0.1 mM o DHAA 0.2 mM non ha determinato alcun effetto tossico sulla coltura, ma, al contrario, ha decretato un significativo aumento della *viability* cellulare (10%, $p < 0.05$ vs control), valutabile con il saggio MTT (**Figura 14**).

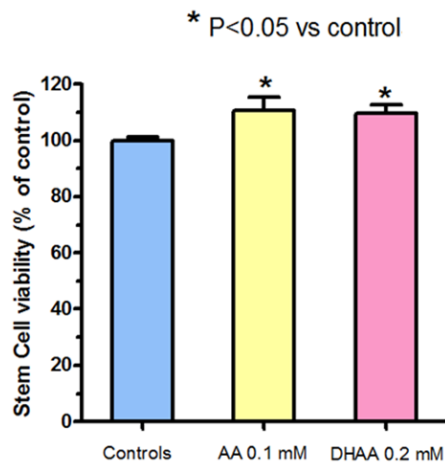


Figura 14.

4.2 Quantificazione dell'acido ascorbico intracellulare

Le analisi neurochimiche, eseguite con la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC), hanno rivelato che l'acido ascorbico 100 μ M, addizionato al terreno di coltura, viene immagazzinato dalle cellule staminali già nei primi 30 minuti di trattamento con una concentrazione pari 0.6 μ g/mg di proteine. Dopo 2h e 30' la quantità intracellulare di acido ascorbico quantificata è uguale a 3.07 μ g/mg di proteine (**Figura 15**).

Quando al medium di coltura, 30' minuti prima della somministrazione di AA, viene addizionata la *phloretin* (100 μ M), un inibitore specifico per il trasportatore SVCT2, l'ingresso dell'acido ascorbico nel compartimento intracellulare viene bloccato in modo significativo (P<0.05) già nella prima mezz'ora dall'inizio dell'esperimento (**Figura 15**). Dopo 2h e 30' la quantità di AA intracellulare è pari a 0.25 μ g/mg di proteine, un quantitativo 12 volte

inferiore rispetto alle cellule non trattate con l'inibitore *phloretin* (Figura 15).

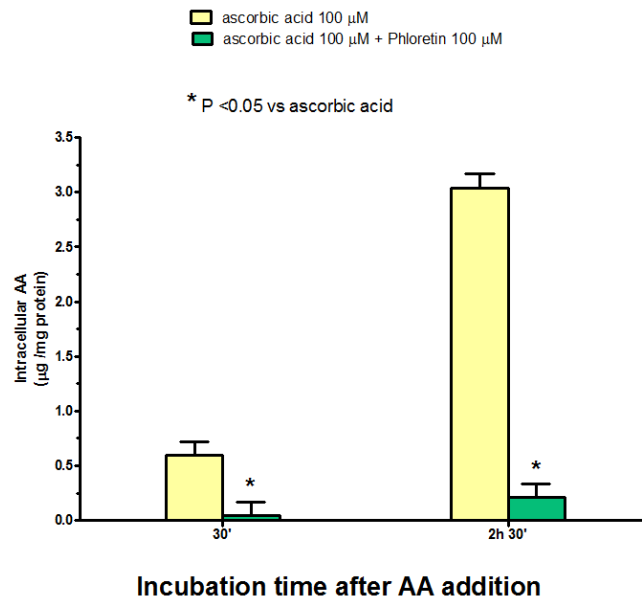


Figura 15.

4.3 Quantificazione dell'acido ascorbico nel medium e all'interno delle cellule dopo trattamento con DHAA

Incubando per 30' le staminali con deidroascorbato (0.2 mM), sono stati misurati circa 140 ng di AA per 5mL di medium. Dopo 2h e 30 minuti il quantitativo di acido ascorbico nel terreno di coltura è risultato essere 350 ng/5mL (Figura 16).

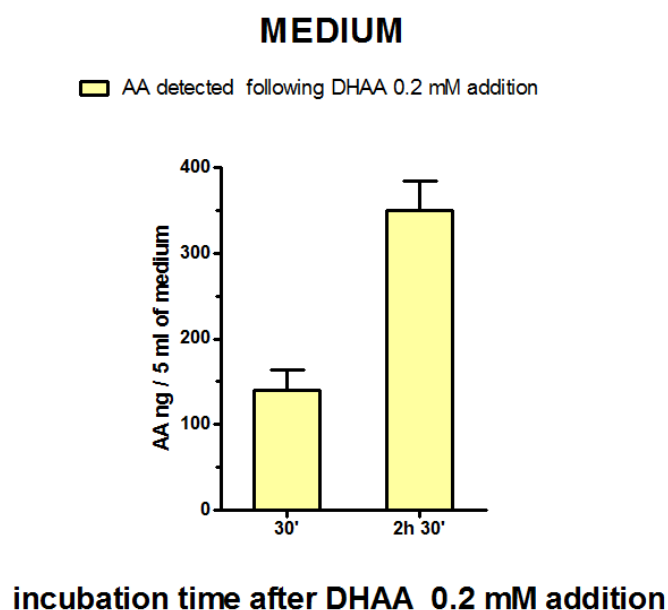


Figura 16.

E' stata valutata anche la presenza di acido ascorbico intracellulare dopo il trattamento con DHAA (0.2mM) (**Figura 17**). I risultati hanno dimostrato che circa 60 ng di AA per milligrammo di proteine sono stati quantificati dentro le cellule dopo 30 minuti di trattamento (**Figura 17**) mentre, dopo 2h e 30 minuti di trattamento l'acido ascorbico è aumentato fino a 100 µg/mg di proteine (+ 40% di acido ascorbico intracellulare rispetto ai primi 30' di trattamento).

Non è stato possibile quantificare l'acido ascorbico intracellulare quando le cellule sono state trattate con la *Cytochalasin B* (100 µM), un inibitore specifico del GLUT (**Figura 17**); viceversa, il trattamento con la *phloretin* (100 µM), un inibitore aspecifico del GLUT, ha permesso di quantificare acido ascorbico intracellulare in tracce (**Figura 17**).

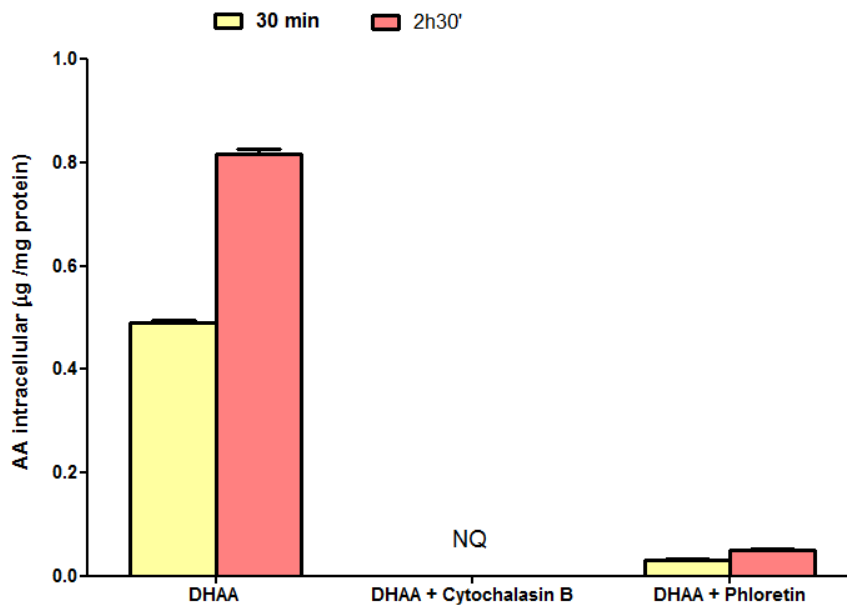


Figura 17.

4.4 Identificazione delle strutture biologiche associate al ciclo dell'acido ascorbico

Attraverso l'immunocitochimica sono state identificate le strutture biologiche coinvolte nel ciclo dell'acido ascorbico: SVCT2 e GLUT1. In particolare, il trasportatore per l'acido ascorbico, lo SVCT-2 (fluorescenza verde), è stato localizzato nelle cellule di tipo A, immunoreattive alla β - tubulina III (fluorescenza rossa). Il DNA nucleare è stato controcolorato con il DAPI (fluorescenza blu) (Figura 18A).

La presenza del trasportatore dello AA (p.m. ~ 60 KDa) è stata confermata anche dall'analisi molecolare western blot nella quale le cellule HEK 293 (Human Embryonic Kidney) sono state utilizzate

come controllo positivo e il talamo di ratto come controllo negativo (Mun G.H. et al., 2006) (**Figura 18B**).

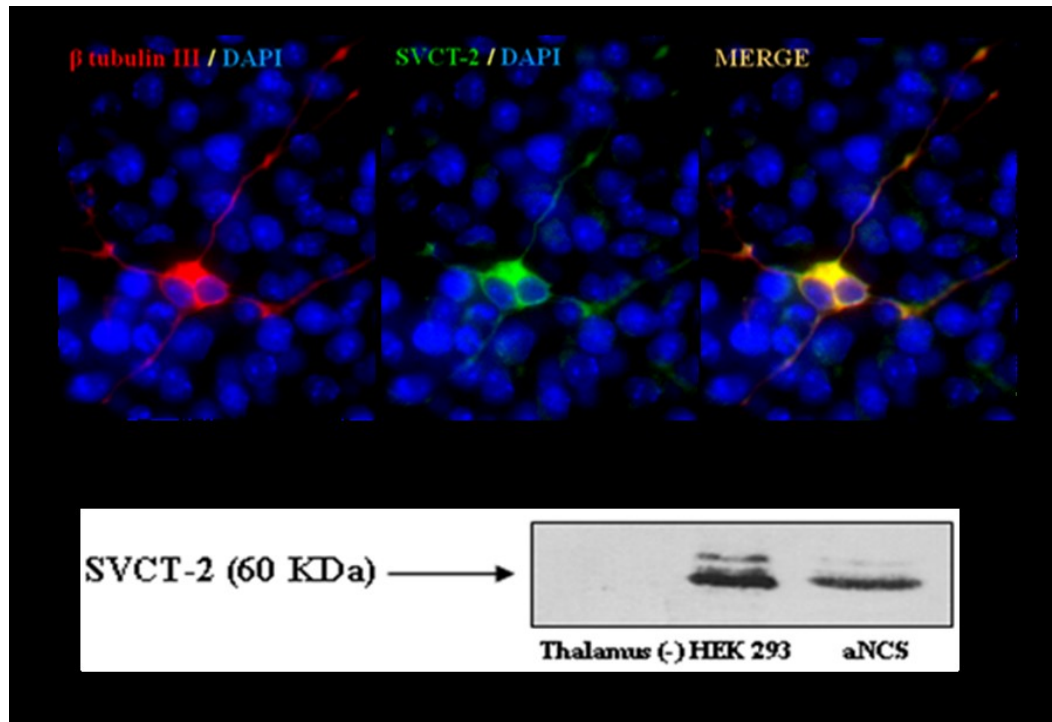


Figura 18.

Il trasportatore per il deidroascorbato, GLUT-1 (fluorescenza verde), è stato identificato nelle cellule di tipo B, positive alla GFAP (fluorescenza rossa). Il DNA nucleare è stato controcolorato con il DAPI (fluorescenza blu) (**Figura 19**).

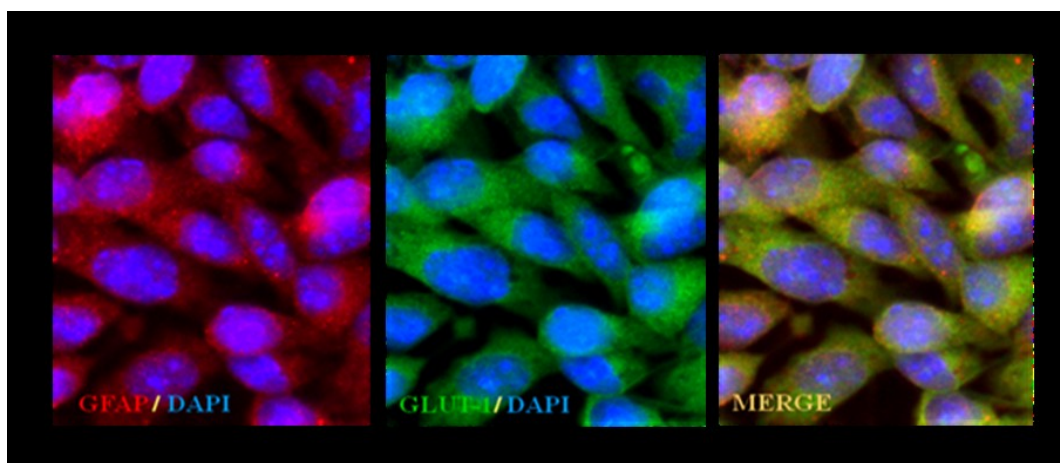


Figura 19.

4.5 Potenziamiento dell'attività mitocondriale indotto da L-Dopa e acido ascorbico

Come già riportato nella **figura 14**, l'esposizione delle neurosfere ad una soluzione di AA 0.1mM ha decretato un significativo aumento dell'attività mitocondriale di circa il 10% ($p < 0.05$), rispetto alla condizione di controllo (**Figura 20**).

Trattando le cellule con la L-Dopa 50 μ M si è potuto osservare un aumento significativo dell'attività mitocondriale. Inoltre, l'associazione AA+L-DOPA ha determinato un incremento significativo della *viability* delle neurosfere (+125% rispetto al controllo e +25% rispetto alla sola L-Dopa) ($p < 0.05$) (**Figura 20**).

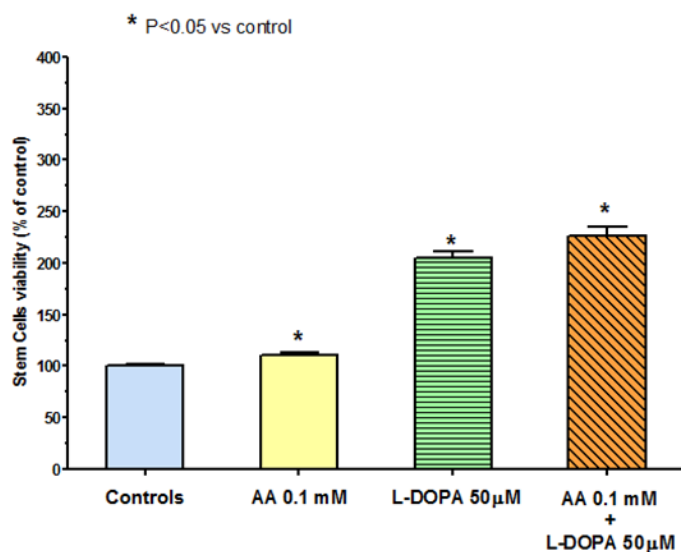


Figura 20.

4.6 Protezione dell'acido ascorbico dalla tossicità indotta dal manganese e dalla L-DOPA

L'esposizione delle neurosfere al manganese (Mn 25 μM per 24h) ha determinato una riduzione significativa della *viability* (75% circa di cellule vitali rispetto al controllo, $p < 0.05$) (**Figura 21**). L'associazione L-DOPA+Mn ha ulteriormente contribuito a ridurre la vitalità cellulare (30% di cellule vitali in meno rispetto al solo trattamento con Mn 25 μM e 50% in meno rispetto al controllo, $p < 0.05$).

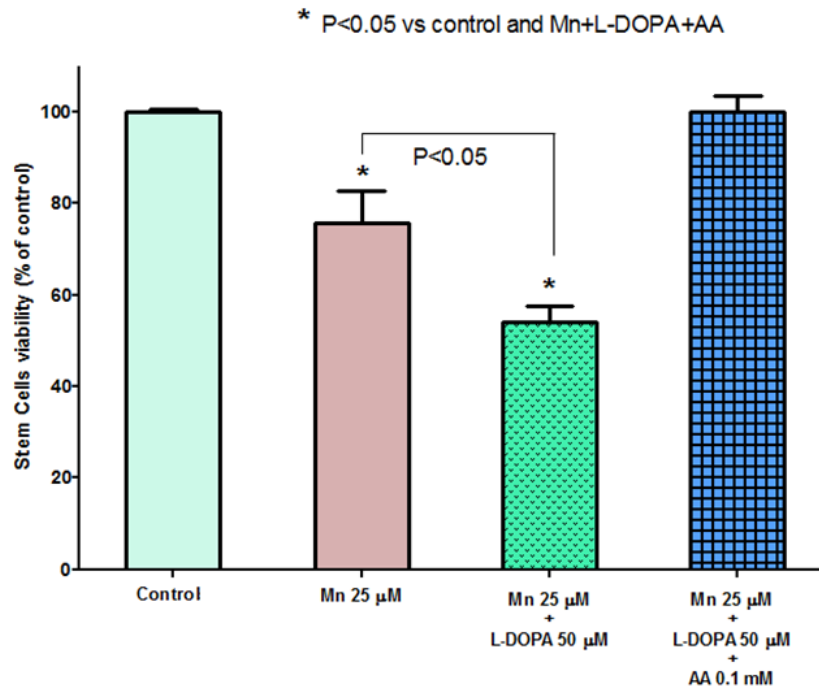


Figura 21.

L'effetto dello AA sulla viability delle neurosfere, contemporaneamente esposte all'associazione L-DOPA+Mn, è stato quello di incrementare la vitalità cellulare riportandola ai valori di controllo (100% di cellule vitali) (**Figura 21**).

I risultati ottenuti con il saggio MTT sono stati ulteriormente confermati da analisi citofluorimetriche; infatti, come è possibile osservare nel cistogramma in **Figura 22**, sono presenti picchi apoptotici ("Apo", evidenziati con il colore fucsia) in corrispondenza delle cellule trattate con solo Mn 25 μ M (riquadro C) o con Mn 25 μ M+L-DOPA 25 μ M (riquadro D). Per contro, le cellule trattate con Mn+L-DOPA+AA (riquadro E) non mostrano picchi apoptotici.

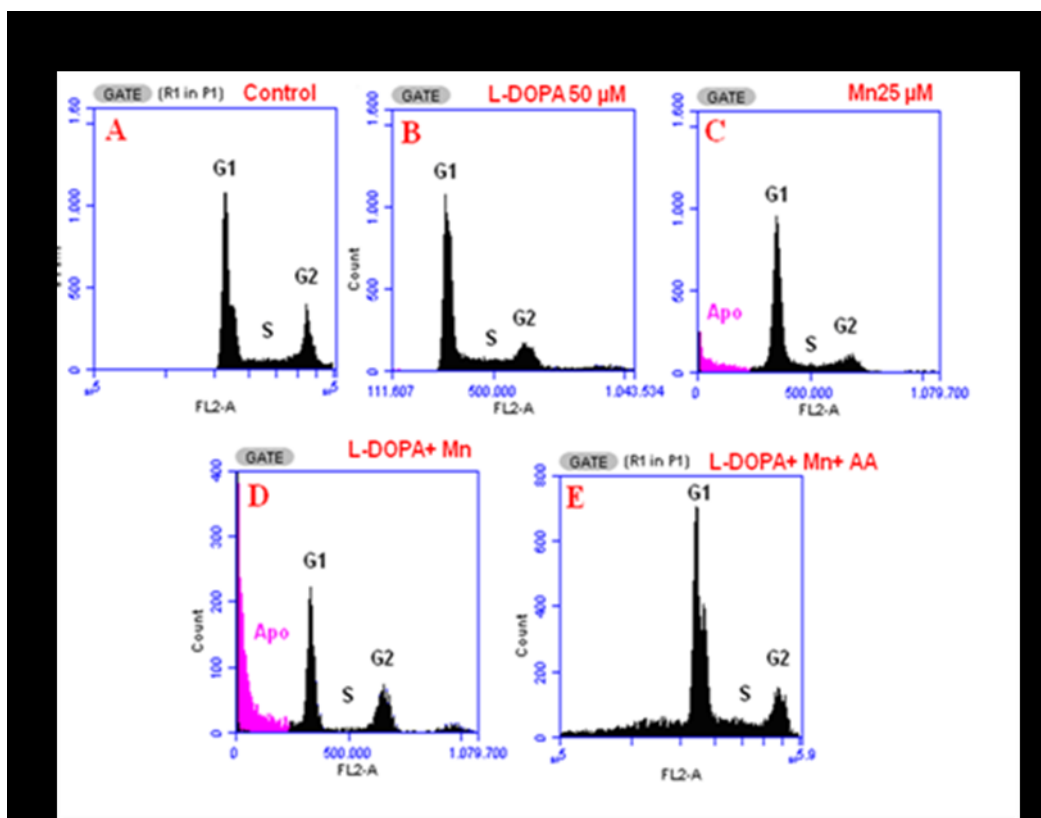


Figura 22.

4.7 Aumento dell'attività mitocondriale indotto da L-DOPA e dopamina e identificazione del recettore dopaminergico D2L

Mediante il saggio MTT è stato possibile osservare un aumento dell'attività mitocondriale dose-dipendente delle cellule staminali trattate con dopamina (DA) e L-DOPA (10, 25 e 50 μM) (**Figura 23**) sia quando queste sono addizionate singolarmente ($p < 0.05$) sia in associazione ($p < 0.05$); in quest'ultimo caso si osserva un significativo potenziamento della *viability* cellulare (**Figura 23**).

Dottoressa Donatella Farina-Studio del potenziale neuroprotettivo delle cellule staminali neurali adulte prelevate dalla zona subventricolare di topi C57BL/6, con particolare riferimento al ciclo dell'acido ascorbico-Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche, XXV ciclo-Università degli Studi di Sassari

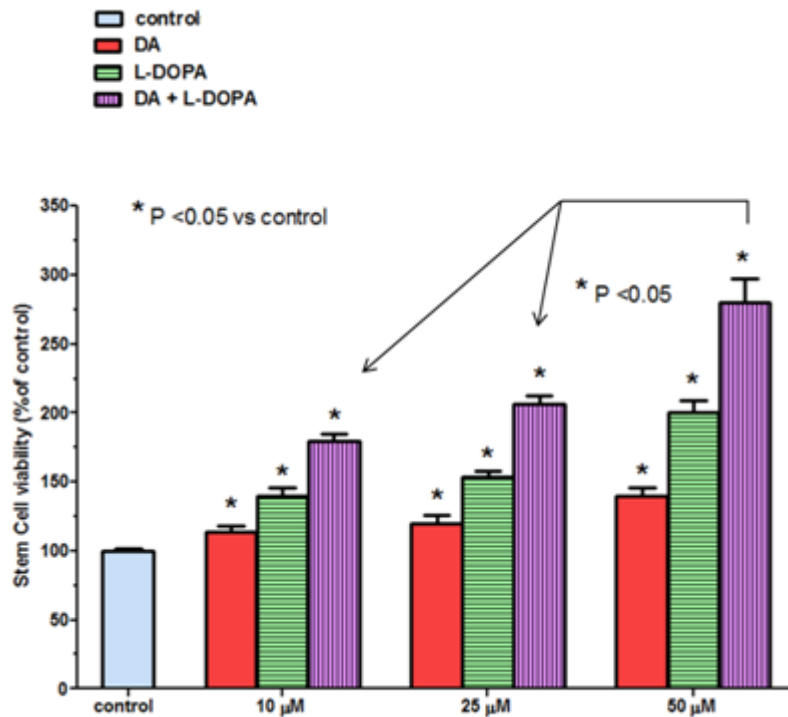


Figura 23.

Attraverso l'analisi immunocitochimica è stato identificato il recettore dopaminergico D2L (fluorescenza verde), localizzandolo nelle cellule di tipo A che, come precedentemente illustrato, sono positive alla β -tubulina III (fluorescenza rossa). Il DNA nucleare è stato controcolorato con il DAPI (fluorescenza blu) (**Figura 24**).

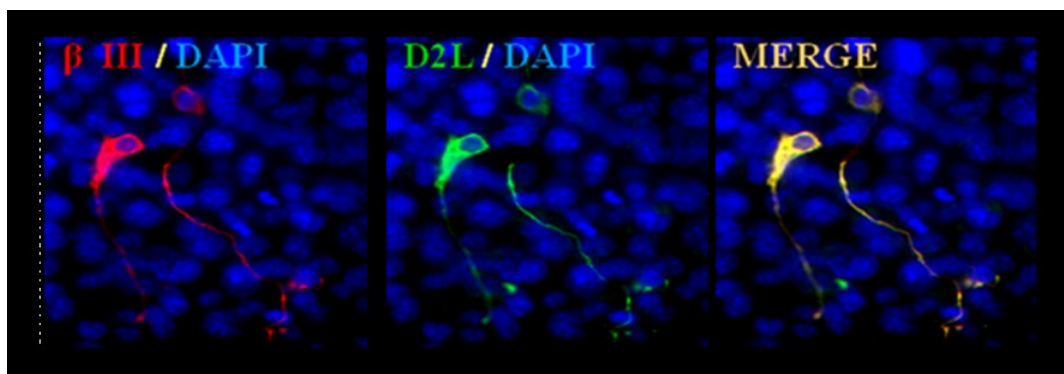


Figura 24.

Dottoressa Donatella Farina-Studio del potenziale neuroprotettivo delle cellule staminali neurali adulte prelevate dalla zona subventricolare di topi C57BL/6, con particolare riferimento al ciclo dell'acido ascorbico-Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche, XXV ciclo-Università degli Studi di Sassari

4.8 Auto-ossidazione di AA, L-DOPA e DA in presenza o meno di aNSC

L'acido ascorbico (100 μ M), la L-Dopa (50 μ M) e la dopamina (50 μ M), sono state addizionate al medium *complete plus* in presenza o meno di cellule staminali, onde valutare la loro auto-ossidazione ed il ruolo delle aNSCs nel rallentare tale processo.

Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato utilizzando sia *flask* p75 contenenti 10 ml di medium fresco senza cellule, sia *flask* contenenti le neurosfere in un medium al terzo giorno di coltura.

Il medium di tre giorni è stato sostituito con quello fresco al tempo zero (t_0) (n=3). Alle sei piastre è stata addizionata una miscela standard di AA, L-DOPA e DA alle concentrazioni precedentemente indicate e sono stati effettuati prelievi seriatati di medium a 0, 0.5, 8, 22, 30, 44, 56 e 72 ore. I campioni sono stati immediatamente congelati a -80° e successivamente iniettati in HPLC per poi essere analizzati.

Nella **figura 25** è riportata la concentrazione di AA nei diversi campioni di medium, prelevati a tempi differenti in presenza o meno di aNSCs.

L'auto-ossidazione di AA nel solo medium è avvenuta in modo estremamente rapido, a 30' dall'inizio dell'esperimento, con una riduzione del 40% rispetto alla concentrazione iniziale di AA; tale fenomeno è risultato essere estremamente rallentato in presenza delle cellule staminali con una concentrazione di AA pari al 90% di quella iniziale. Dopo 8h di trattamento l'acido ascorbico è stato trovato in

forma ridotta solo nelle *flask* contenenti cellule staminali (31 μM) ($p < 0.05$ vs medium [A]).

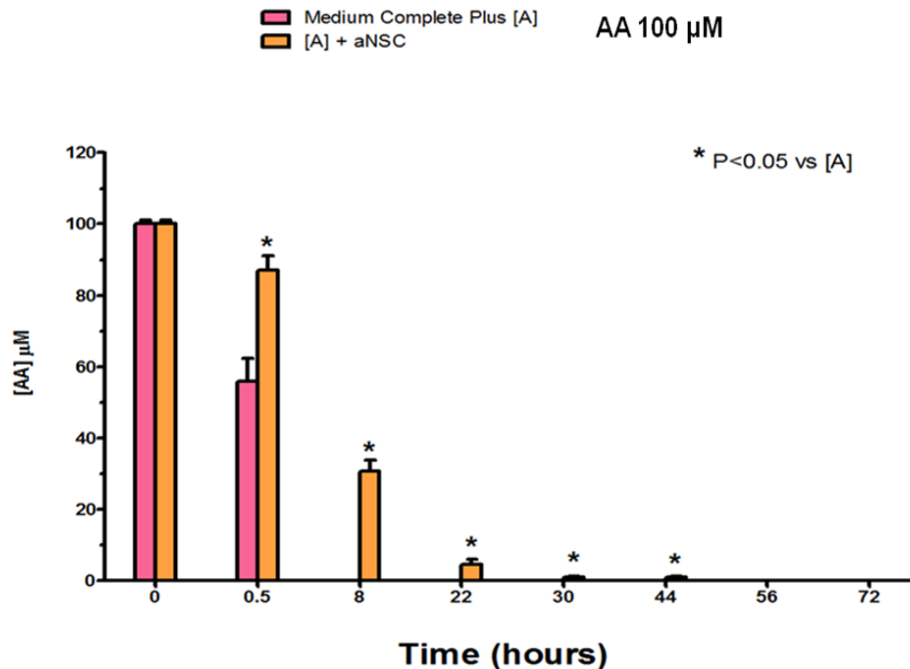


Figura 25.

A due giorni dal trattamento (30h) sono state rilevate ancora quantità significative di acido ascorbico (1 μM) in presenza di cellule staminali ($p < 0.05$ vs medium). Alle 72 ore l'acido ascorbico è andato incontro a completa auto-ossidazione e non è stato possibile quantificarlo all'interno delle due piastre con e senza neurosfere (**Figura 25**).

Nella **figura 26** vengono riportate le concentrazioni di L-Dopa corrispondenti ai diversi prelievi effettuati nelle 72h di esperimento. Le metodiche e le condizioni di lavoro sono identiche alle precedenti ($n=3$).

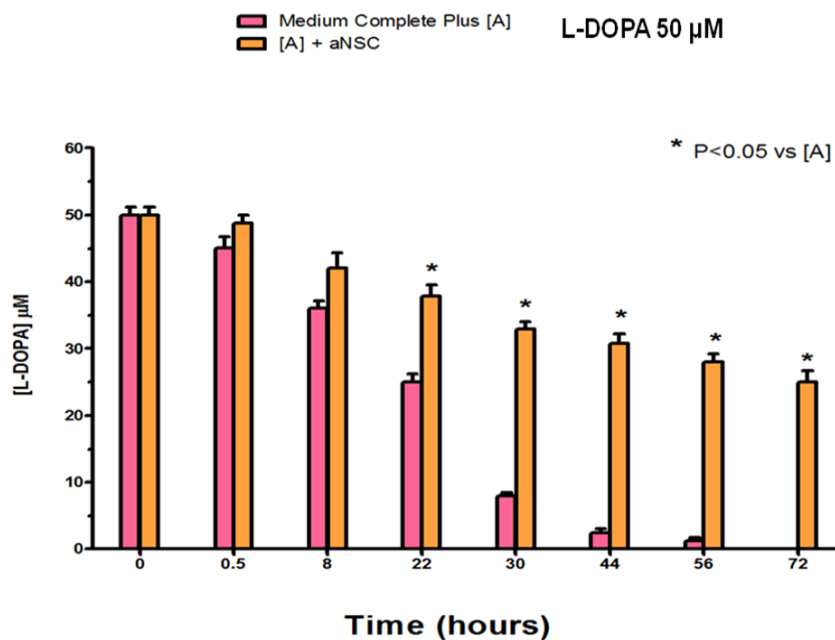


Figura 26.

Analizzando globalmente il grafico, si può osservare un calo progressivo nella concentrazione della L-Dopa nel medium *complete plus* senza cellule [A]; già alla ventiduesima è stato possibile evidenziare un calo drastico nella concentrazione di L-Dopa; dopo 56h di trattamento, la sua concentrazione non è risultata essere apprezzabile rispetto al medium contenente anche le cellule staminali. Osservando il grafico (**Figura 26**), si deduce che la presenza delle cellule staminali rallenta i fenomeni di auto-ossidazione della L-Dopa; infatti, dopo 72h essa è ancora presente nel medium *complete plus* + neurosfere in concentrazioni significative rispetto al medium senza le cellule staminali ($p < 0.05$ vs [A]).

Nella **figura 27** sono riportate le concentrazioni di dopamina per ogni prelievo effettuato in 72h di trattamento. Si è verificato un calo lineare

della DA, dopo 8h di esperimento, sia nelle *flask* contenenti cellule staminali, sia in quella che ne erano prive. Dopo 72h è risultata comunque apprezzabile, rispetto alle piastre con solo medium [A], la quantità di DA presente nel medium contenente le cellule staminali pari a 6 μ M.

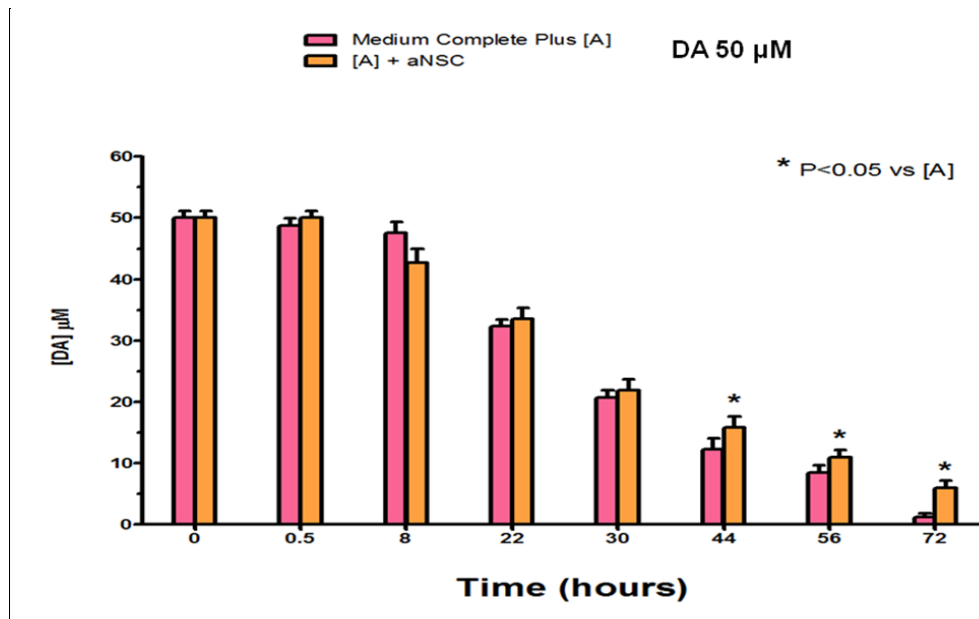


Figura 27.

5. DISCUSSIONE

Da un' analisi critica della letteratura scientifica internazionale sulle cellule staminali emerge la grande potenzialità di sviluppo di terapie utili al trattamento di numerose patologie a carico di diversi organi.

Le cellule staminali ematopoietiche prelevate dal midollo osseo, ad esempio, sono state le prime ad essere utilizzate in clinica per la cura delle leucemie. Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche permette, infatti, di ripristinare completamente il *pool* cellulare ematico del paziente.

Le malattie neurodegenerative rappresentano un obiettivo d'eccezione nell'impiego delle cellule staminali, a causa della carenza di cure risolutive e dell'aumento di incidenza di tali patologie nella popolazione anziana (Ginberg G. et al., 2012). Le staminali utilizzate nei nostri esperimenti potrebbero rappresentare un' alternativa o una valida integrazione alla terapia farmacologica della malattia di Parkinson. Attualmente la levodopa, un precursore della dopamina, rimane il farmaco di elezione nella terapia sintomatica del morbo di Parkinson, in grado di ripristinare il tono dopaminergico a livello centrale. Tale terapia non rappresenta però la soluzione definitiva, in quanto ha un'efficacia limitata nel tempo e i pazienti dopo pochi anni vanno incontro ad un progressivo deterioramento della sintomatologia. A tal proposito, il *target* dei ricercatori è quello di sfruttare le enormi potenzialità delle cellule staminali per migliorare o rallentare la progressione della patologia (Wang Y. et al., 2007).

Sono state proposte molteplici interazioni fra le aNSC e l'ambiente patologico. Infatti tali cellule, probabilmente, possiedono gli attributi per fornire protezione sia anatomica che funzionale nelle patologie neurodegenerative ma anche la capacità di ristabilire le condizioni fisiologiche di partenza (Redmond D.E. et al., 2007).

La produzione di ROS è uno dei meccanismi imputabili alla degenerazione progressiva e irreversibile dei neuroni della *substantia nigra pars compacta* di pazienti parkinsoniani, con conseguente deplezione di dopamina a livello dello striato. Nel nostro organismo, lo squilibrio tra la produzione di specie radicaliche e molecole antiossidanti e il metabolismo anomalo dei metalli di transizione (come ferro e manganese) genera ROS avviando il meccanismo patogenetico della morte neuronale nel morbo di Parkinson (Gerlach M. et al., 2006).

Così uno degli obiettivi della terapia con cellule staminali potrebbe essere il mantenimento e/o il ripristino dell'omeostasi ossidativa nel compartimento extracellulare nigro-striatale. Esperimenti condotti *in vitro* hanno evidenziato che le aNSC sono in grado di proteggere i neuroni danneggiati dallo stress ossidativo grazie alle loro proprietà intrinseche: hanno cioè meccanismi di difesa e vigilanza antiossidante superiori ad altre linee cellulari, come già dimostrato in letteratura (Madhavan L. et al., 2006). Lavori scientifici mostrano infatti la capacità delle aNSC di neutralizzare i ROS grazie a un'elevata espressione di enzimi chiave antiossidanti come la glutatione perossidasi e la *uncoupling protein 2* (UCP2). Anche i risultati *ex vivo* confermano le osservazioni sopra menzionate; infatti, cellule

proliferanti della SVZ di topi C57BL/6 biosintetizzano enzimi chiave del sistema antiossidante, confermando che il meccanismo “di vigilanza” antiossidante e neuroprotettivo delle staminali adulte neurali potrebbe essere un importante caratteristica di queste cellule sfruttabile, non solo nella malattia di Parkinson, ma anche, in molte altre patologia neurodegenerative (Madhavan L. et al., 2006).

Nel cervello i neuroni contengono concentrazioni elevate di acido ascorbico (10 mM), potente molecola antiossidante, che viene immagazzinata attraverso un trasportatore sodio-dipendente: lo SVCT2 (Hediger M.A., 2002). Gli astrociti invece, sono in grado di captare, attraverso il GLUT1, il DHAA (la forma ossidata dell’acido ascorbico) e ridurlo ad AA per rifornire direttamente i neuroni. Si stabilisce così un vero e proprio ciclo tra neuroni e astrociti che giustifica l’abbondante presenza di AA nel cervello (Hediger M.A., 2002).

Le nostre analisi cromatografiche dimostrano che il ciclo AA-DHAA esiste anche nelle neurosfere poiché le stesse sono in grado di captare, ridurre e secernere l’acido ascorbico preservandolo in forma ridotta. Infatti, il trattamento con un inibitore specifico dello SVCT2, la *phloretin*, impedisce alle neurosfere di immagazzinare l’acido ascorbico e dimostra la presenza del trasportatore, confermata immunocitochimicamente, nelle cellule di tipo A (**Figura 14 e 17**). Il trattamento con un inibitore del GLUT, la *cythocalasin B*, ha impedito alle neurosfere di internalizzare il DHAA (**Figura 16**), rendendo ipotizzabile la presenza del GLUT1, successivamente confermata con la tecnica immunocitochimica, nelle cellule di tipo B (**Figura 18**).

Nei nostri esperimenti abbiamo mostrato una riduzione della *viability* nelle cellule trattate con Mn e Mn + L-Dopa. Questi dati sono confermati anche dall'analisi citofluorimetrica nella quale sono presenti picchi apoptotici sia nelle cellule trattate con manganese che in quelle trattate con Mn + L-DOPA (**Figura 21**). L'ulteriore trattamento con AA mostra una neuroprotezione confermata anche da analisi citofluorimetriche in cui si evidenzia il ripristino delle condizioni iniziali.

I nostri risultati sperimentali dimostrano, anche, che le aNSC sono in grado di rallentare i fenomeni di autossidazione della L-DOPA, della DA e dell'AA *in vitro* (**Figura 25 e 26**). Infatti, è noto dalla letteratura che la L-Dopa e la dopamina, spesso vanno incontro ad auto-ossidazione *in vivo* (Serra P.A. et al., 2000) con la conseguente formazione dei derivati chinonici e dell'anione superossido, l'AA invece si auto-ossida a DHAA e derivati. I nostri esperimenti hanno infatti dimostrato che in *flask* contenenti solo medium il processo di auto-ossidazione avviene rapidamente rispetto alle *flask* contenenti cellule staminali, evidenziando quindi la loro azione neuroprotettiva. E' stato riportato inoltre in letteratura che la DA proveniente dai neuroni dopaminergici della *substantia nigra pars compacta*, induce proliferazione delle cellule della SVZ attraverso l'interazione con il recettore D2L (Höglinger G.U. et al., 2004). I nostri saggi di vitalità cellulare mostrano un incremento nella *viability* delle cellule staminali indotto da dopamina (**Figura 22**), successivamente confermato dalle analisi immunocitochimiche che evidenziano la presenza del recettore D2L (**Figura 23**). In letteratura è riportato anche una proliferazione

cellulare indotta da L-DOPA riscontrata anche nei nostri esperimenti (**Figure 19 e 22**), ma rimane sconosciuto il meccanismo molecolare alla base di questo processo.

Nel morbo di Parkinson le cellule staminali potrebbero essere impiantate direttamente nel nucleo striato oppure, mediante inoculo sistemico o intraventricolare, raggiungere la regione lesa (*substantia nigra pars compacta*) per differenziarsi in neuroni dopaminergici; qualora non potessero differenziarsi sarebbero, probabilmente, capaci di “riparare” la via dopaminergica nigro-striatale, fungendo da compartimento *buffer* riducendo, immagazzinando e liberando l’acido ascorbico negli spazi extracellulari. In questo modo le aNSC potrebbero preservare i neuroni superstiti da ulteriori danni ossidativi.

Un primo impianto di staminali avrebbe la funzione di ripristinare lo stato ossidativo del microambiente nigrale, mentre un secondo trapianto avrebbe come obiettivo la ricostituzione della via nigrostriatale, offrendo alle cellule trapiantate maggiori possibilità di sopravvivenza. Le maggiori perplessità riguardano tuttavia la capacità delle cellule staminali di ricostituire la innervazione nigro-striatale, per cui si ha ancora il dubbio sul nucleo specifico in cui effettuare un microtrapianto.

Analisi sempre più approfondite potrebbero aprire nuove strade nel trattamento della malattia di Parkinson; per l’applicazione di questa tecnica all’uomo sono tuttavia necessari ulteriori studi, soprattutto per verificare la sicurezza della metodica e la reale efficacia rendendo prematura qualunque previsione su quando i trapianti potranno

realmente essere la valida risposta terapeutica alla malattia di Parkinson.

6. RIASSUNTO

Il trapianto di cellule staminali neurali (aNSC) potrebbe rappresentare, nel prossimo futuro, una valida strategia terapeutica per numerose patologie neurodegenerative fra le quali il morbo di Parkinson (MP). Nel sistema nervoso centrale dei mammiferi adulti la zona subventricolare è il compartimento più importante di staminali neurali adulte; queste, *in vitro*, in presenza del fattore di crescita epidermico originano aggregati sferici, definiti come neurosfere, le cui cellule, in opportune condizioni, sono in grado di differenziarsi in neuroni, astrociti ed oligodendrociti. Le aNSC possiedono meccanismi di difesa e proprietà antiossidanti superiori ad altri fenotipi cellulari, tale caratteristica le rende di estremo interesse per il loro potenziale ruolo neuroprotettivo.

Obiettivo del presente lavoro è stato quello di dimostrare le potenzialità antiossidanti delle aNSC, correlate alla loro capacità di captare, ridurre e secernere l'acido ascorbico (AA), importante molecola antiossidante ed identificare le strutture biologiche associate a tale ciclo. Nel cervello infatti, i neuroni contengono concentrazioni elevate di AA il quale è immagazzinato dai neuroni attraverso il trasportatore SVCT2. Gli astrociti, invece, sono in grado di ridurre il deidroascorbato (DHAA) ad AA rifornendo direttamente i neuroni. Al pari di quanto si verifica tra neuroni e astrociti, le nostre analisi molecolari e immunocitochimiche hanno evidenziato che anche le aNSC possiedono i due trasportatori chiave nel ciclo dello AA: il GLUT1 ed lo SVCT2. Inoltre, prelievi intra- ed extra-cellulari

analizzati mediante cromatografia, hanno confermato che le aNSC sono capaci di ridurre il DHAA ad AA e rilasciarlo nel mezzo extracellulare. L'acido ascorbico stesso è in grado di ridurre l'azione tossica indotta sulla coltura staminale dal manganese o dalla sua associazione con levodopa. I nostri studi hanno anche confermato che le aNSC sono in grado di rallentare, *in vitro*, i fenomeni di auto-ossidazione di levodopa, dopamina e acido ascorbico. Inoltre, in accordo con la letteratura, dal nostro lavoro è emerso che la dopamina induce *in vitro*, un aumento della *viability* delle neurosfere e tale fenomeno è strettamente correlato alla presenza del recettore dopaminergico D2L, da noi identificato sulle neurosfere nelle cellule di tipo A.

In conclusione, l'impianto di cellule staminali neurali adulte, in virtù delle loro proprietà antiossidanti, potrebbe rappresentare, in futuro, una valida alternativa terapeutica in grado di limitare la progressione del MP riparando la via dopaminergica e/o ripristinando lo stato ossidativo del microambiente nigrale.

7. BIBLIOGRAFIA

Alison M.R., Poulson R., Forbes S., Wright N.A. (2002). An Introduction to stem cells. *J of Pathol*; 197 (4): 419-423.

Allen E. (1912). The cessation of mitosis in the central nervous system of the albino rat. *J Comp Neurol.*, 22: 547–568.

Altman J. (1962). Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science*, 135:1127–1128.

Altman J. (1963). Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *Anat. Rec*, 145: 573–591.

Altman J. (1966). Proliferation and migration of undifferentiated precursor cells in the rat during postnatal gliogenesis. *Exp. Neurol*, 16: 263–278.

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.

Alvarez-Buylla A. and Lim D.A. (2004). For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron*, 41 (5): 683-686.

Arenas E. (2010). Towards stem cell replacement therapies for Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 396: 152–156.

Barnham K.J., Masters C.L., Bush A.I. (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov.*, 3 (3):205-214.

Beckervordersandforth R., Tripathi P., Ninkovic J., Bayam E., Lepier A., Stempfhuber B., et al. (2010). In vivo fate mapping and expression analysis

reveals molecular hallmarks of prospectively isolated adult neural stem cells. *Cell stem cell*, 7(6): 744-58.

Bez A., Corsini E., Curti D., Biggiogera M., Colombo A., Nicosia R.B., Pagano S.F., Parati E.A. (2003). Neurosphere and neurosphere-forming cells: morphological and ultrastructural characterization. *Brain Res*, 993:18-29.

Bjugstad K.B. Redmond D.E. Jr, Teng Y.D., Elsworth J.D., Roth R.H., Blanchard B.C., Snyder E.Y., Sladek J.R. Jr. (2005). Neural stem cells implanted into MPTP-treated monkeys increase the size of endogenous tyrosine hydroxylase-positive cells found in the striatum: a return to control measures. *Cell Transplant*, 14(4):183-192.

Bové J., Prou D., Perier C., Przedborski S. (2005). Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx*, 2 (3): 484-494.

Brundin L., Brismar H., Danilov A. I., Olsson T., Johansson C.B. (2003). Neural stem cells: a potential source for remyelination in neuroinflammatory disease. *Brain Pathol.*, 13: 322–328.

Cedar S.H., Cooke J.A., Patel M.R., Luo Z., Minger S.L. (2007) The therapeutic potential of human embryonic stem cells. *Indian J Med Res*, 125: 17-24.

Conley B.G., Young J.C., Trounson A.O., Mollard R. (2004) Derivation, propagation and differentiation of human embryonic stem cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 36:555-567.

Corbin J.G., Gaiano N., Machold R.P., Langston A., Fishell G., (2000). The Gsh2 homeodomain gene controls multiple aspects of telencephalic development. *Development* 127:5007-5020.

Corti A., Casini A.F., Pompella A. (2010). Cellular pathways for transport and efflux of ascorbate and dehydroascorbate. *Arch Biochem Biophys.*, 500 (2):107-115.

Dottoressa Donatella Farina-Studio del potenziale neuroprotettivo delle cellule staminali neurali adulte prelevate dalla zona subventricolare di topi C57BL/6, con particolare riferimento al ciclo dell'acido ascorbico-Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche, XXV ciclo-Università degli Studi di Sassari

Coskun V., Wu H., Blanche B., Tsao S., Kim K., Zhao J., et al., (2008). CD133+ neural stem cells in the ependyma of mammalian postnatal forebrain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105(3): 1026-31.

Day B.J., Patel M., Calavetta L., Chang L.Y., Stamler J.S. (1999). A mechanism of paraquat toxicity involving nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(22):12760-12765.

Desole M.S., Sciola L., Delogu R., Sircana S., Migheli R., Miele E. (1997). Role of oxidative in the manganese and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced apoptosis in PC12 cells. *Neurochem. Int*, 20 (1): 58-65.

Dev K.K., Hofele K., Barbieri S., Buchman V.L., Van der Putten H. (2003). Part II: α synuclein and its molecular pathophysiological role in neurodegenerative disease. *Neuropharmacology*, 45(1):14-44.

Doetsch F. (2003). A niche for adult neural stem cells. *Curr Opin in Genet & Dev*, 13:543–550.

Doetsch F., Caille I., Lim D. A., Garcia-Verdugo J. M. and Alvarez - Buylla A. (1999a). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*, 97: 703–716.

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.

Doetsch F., Petreanu L., Caille I., Garcia-Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A. (2002). EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron*, 36 (6): 1021-1034.

Elbaz A., Moisan F. (2008). Update in the epidemiology of Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol.*, 21(4):454-460.

Dottoressa Donatella Farina-Studio del potenziale neuroprotettivo delle cellule staminali neurali adulte prelevate dalla zona subventricolare di topi C57BL/6, con particolare riferimento al ciclo dell'acido ascorbico-Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche, XXV ciclo-Università degli Studi di Sassari

Ericksson P.S., Perfilieva E., Alborn A.M., Nordborg C. et al., (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*, 4 (11): 1313-1317.

Fernandez M., Pirondi S., Manservigi M., Giardino L., Calzà L. (2006). Thyroid hormone participates in the regulation of neural stem cells and oligodendrocyte precursor cells in the central nervous system of adult rat. *Eur J Neurosci*, 20 (8): 2059-2070.

Gage F.H. (2000) Mammalian Neural Stem Cells. *Science*, 287: 1433-1438.

García Mde L., Salazar K., Millán C., Rodríguez F., Montecinos H., Caprile T., Silva C., Cortes C. et al., (2005). Sodium vitamin C cotransporter SVCT2 is expressed in hypothalamic glial cells. *Glia*, 50:32-47.

Garcia-Verdugo J. M., Ferron S., Flames N., Collado L., Desfilis E. and Font E., (2002). The proliferative ventricular zone in adult vertebrates: a comparative study using reptiles, birds, and mammals. *Brain Res Bull*, 57(6): 765-775.

Gerlach M., Double K.L., Youdim M.B., Riederer P. Potential sources of increased iron in the substantia nigra of parkinsonian patients. *J Neural Transm Suppl.*, (70):133-142.

Ginberg G., Arien-Zakay H., Lazarovici P., Lelkes P.I. (2012). Neural stem cells: therapeutic potential for neurodegenerative diseases. *Br Med Bull*.

Goldman S.A. and Nottebohm F. (1983). Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 2390–2394.

Gonzalez-Perez O. (2012). Neural stem cells in the adult human brain. *Biological and Biomedical Reports*, 2(1):59-69.

Gorell J.M., Johnson C.C., Rybicki B.A., Peterson E.L., Richardson R.J. (1998). The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. *Neurology*, 50(5):1346-1350.

Dottoressa Donatella Farina-Studio del potenziale neuroprotettivo delle cellule staminali neurali adulte prelevate dalla zona subventricolare di topi C57BL/6, con particolare riferimento al ciclo dell'acido ascorbico-Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche, XXV ciclo-Università degli Studi di Sassari

Greenamyre J.T., Betarbet R., Sherer T.B. (2003). The rotenone model of Parkinson's disease: genes, environment and mitochondria. *Parkinsonism Relat Disord.* 2:S59-64.

Gritti A., Frolichsthal P., Galli R., Parati E.A., Cova L., Pagano S. F., Bjornson C.R., Vescovi A.L. (1999). Epidermal and fibroblast growth factors behave as mitogenic regulators for a single multipotent stem cell-like population from the subventricular region of the adult mouse forebrain. *J. Neurosci.* 19: 3287–3297.

Harrison F.E. and May J.M. (2009). Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter (SVCT2). *Free Radic Biol Med*, 46 (6): 719-730.

Hartfuss E., Galli R., Heins N., Gotz M. (2001). Characterization of CNS precursor subtypes and radialglia. *Dev Biol.*, 229(1):15-30.

Hediger M.A. (2002). New view at C. *Nature medicine*, 8 (5): 514–517.

Hoglinger G.U., Carrard G., Michel P.P., Medja F., Lombes A., Ruberg M. et al. (2003). Dysfunction of mitochondrial complex I and the proteasome: interactions between two biochemical deficits in a cellular model of Parkinson's disease. *J Neurochem*, 86:1297–1307.

Höglinger G.U., Rizk P., Muriel M.P., Duyckaerts C., Oertel W.A., Caille I., Etienne Hirsch (2004). Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat Neurosci*, 7: 726-735.

Jackson E.L., Garcia-Verdugo J.M., Gil-Perotin S., Roy M., Quinones-Hinojosa A., VandenBerg S., Alvarez-Buylla A., (2006). PDGFR alpha-positive B cells are neural stem cells in the adult SVZ that form glioma-like growths in response to increased PDGF signaling. *Neuron* 51: 187–199.

Jenner P. (2003). Dopamine agonists, receptor selectivity and dyskinesia induction in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol.* 1:S3-7.

Jiménez-Jiménez F.J., Fernández-Calle P., Martínez-Vanaclocha M., Herrero E., Molina J.A., Vázquez A., Codoceo R. (1992). Serum levels of zinc and copper in patients with Parkinson's disease. *J Neurol Sci*, 112(1-2):30-33.

Kaplan M.S. and Hinds J.W. (1977). Neurogenesis in the adult rat: Electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science*, 197:1092–1094.

Kaur D. and Andersen J. (2004). Does cellular iron dysregulation play a causative role in Parkinson's disease?. *Ageing Res Rev.* 3 (3): 327-343.

Kim E.J., Won R., Sohn J.H., Chung M.A., Nam T.S., H.J. Lee, B.H. Lee (2008). Anti-oxidant effect of ascorbic and dehydroascorbic acids in hippocampal slice culture. *Biochem Biophys Res Commun.*, 366: 8–14.

Kim J.H., Auerbach J.M. Rodriguez-Gómez J.A., Velasco I., Gavin D., Lumelsky N., Lee S.H., Nguyen J., Sánchez-Pernaute R., Bankiewicz K., McKay R. (2002). Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature*, 418: 50-56.

Kirschenbaun B. and Goldman S.A. (1995). Brain-derived neurotrophic factor promotes the survival of neurons arising from the adult rat forebrain subependymal zone. *Proc Natl Acad Sci*, 92:210-214.

Kriegstein A. and Alvarez-Buylla A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci.*, 32:149-84.

Kruger R., Muller T., Riess O. (2000). Involvement of alpha-synuclein in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders. *J Neural Transm*, 107:31–40.

Laird D.J., von Handrian U.H., Wagers A.J. (2008). Stem Cell Trafficking in Tissue Development, Growth, and Disease. *Cell* 132: 612-630.

Lang A.E. and Lozano A.M., (1998). Parkinson's disease. Second of two parts. *N Engl J Med*, 339 (16): 1130-1143.

Dottoressa Donatella Farina-Studio del potenziale neuroprotettivo delle cellule staminali neurali adulte prelevate dalla zona subventricolare di topi C57BL/6, con particolare riferimento al ciclo dell'acido ascorbico-Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche, XXV ciclo-Università degli Studi di Sassari

Lee F.J. and Liu F. (2008). Genetic factors involved in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Brain Res Rev.* 58 (2):354-364.

Levi G. (1898). Sulla cariocinesi delle cellule nervose. *Riv Patol Nerv Ment.*, 3:97-113.

Lim D.A., Tramontin A.D., Trevejo J.M., Herrera D.G., Garcia - Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A. (2000). Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron*, 28: 713-726.

Linster C.L. and Van Schaftingen E. (2007). Vitamin C. Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. *FEBS Journal*, 1-22

Lledo P.M., Alonso M. and Grubb M.S. (2000). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci*, 7: 179-193.

Loeffler M. and Potten C.S. (1997). Stem cells and cellular pedigrees: a conceptual introduction. *Stem Cells (Potten, C. S., ed.)*, Academic Press, London, 1-27.

Lois C. and 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.

Lois C. and Alvarez-Buylla A. (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*, 264: 1145-1148.

Lois C., García-Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A., (1996). Chain migration of neuronal precursors. *Science*, 16; 271(5251):978-81.

Luskin M.B. (1993). Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 11: 173-189.

Madhavan L., Ourednik V., Ourednik J. (2006). Increased "vigilance" of antioxidant mechanisms in neural stem cells potentiates their capability to resist oxidative stress. *Stem Cells.*, 24,(9):2110-2119.

Madhavan L., Ourednik V.C., Ourednik J. (2005). Grafted neural stem cells shield the host environment from oxidative stress. *Ann.Y.Acad.Sci* ,1049: 185–188.

Madhavan L., Ourednik V.C., Ourednik J. (2008). Neural Stem/Progenitor Cells Initiate the Formation of Cellular Networks That Provide Neuroprotection by Growth Factor- Modulated Antioxidant Expression. *Stem Cell* ,26: 254–265.

Martínez- Morales P.L. and Liste I. (2012). Stem Cells as In Vitro Model of Parkinson's Disease. *Stem Cells Int*,1-7.

McMahon J.A., Takada S., Zimmerman L.B., Fan C.M., Harland R.M., McMahon A.P. (1998). Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. *Genes Dev*, 12:1438-1452.

McNaught K.S. and Olanow C.W. (2003). Proteolytic stress: a unifying concept for the etiopathogenesis of Parkinson's disease. *Ann Neuro*, . 53 Suppl 3:S73-84; discussion S84-6.

Miele M., Boutelle M.G., Fillenz M. (1994). The physiologically induced release of ascorbate in rat brain is dependent on impulse traffic, calcium influx and glutamate uptake. *Neurosci*, 62: 87–91.

Migheli R., Godani C., Sciola L., Delogu M.R., Serra P.A, Zangani D., De Natale G., Miele E., Desole M.S. (1999). Enhancing Effect of Manganese on L-DOPA-Induced Apoptosis in PC12 Cells: Role of Oxidative Stress. *J. Neurochem*, 73: 1155–1163.

Migheli R., Puggioni G., Dedola S., Rocchitta G., Calia G., Bazzu G., Esposito G., Lowry J.P., O'Neill R.D., Desole M.S., Miele E., Serra P.A. (2008).

Dottoressa Donatella Farina-Studio del potenziale neuroprotettivo delle cellule staminali neurali adulte prelevate dalla zona subventricolare di topi C57BL/6, con particolare riferimento al ciclo dell'acido ascorbico-Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche, XXV ciclo-Università degli Studi di Sassari

Novel integrated microdialysis–amperometric system for in vitro detection of dopamine secreted from PC12 cells: Design, construction, and validation. *Anal Biochem*, 380: 323–330.

Mirzadeh Z., Merkle F.T., Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo J. M., Alvarez-Buylla A. (2008). Neural Stem Cells Confer Unique Pinwheel Architecture to the Ventricular Surface in Neurogenic Regions of the Adult Brain. *Cell Stem Cell*, 3: 265-278.

Mission J.P., Takahashi T., Caviness VS Jr (1991). Ontogeny of radial and other astroglial cells in murine cerebral cortex. *Glia*, 4 (2):138-148.

Moore K.A. and Lemischka I.R. (2006). Stem cells and their niches. *Science*, 311: 1880-1885.

Morrison S. J., Shah N. M. and Anderson D. J. (1997). Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*, 88: 287–298.

Morshead C.M., Reynolds B.A., Craig C.G., McBurney M.W., Staines W.A., 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.

Mujtaba T. and Rao M.S. (2002). Isolation of lineage-restricted neural precursor from cultured ES cells. *Methods mol biol*, 185: 189-204.

Mun G.H., Kim M.J., Lee J.H., Kim H.J., Chung Y.H., Chung Y.B., Kang J.S., et al., (2006). Immunohistochemical study of the distribution of sodium-dependent vitamin C transporters in adult rat brain. *J Neurosci Res.*, 83 (5): 919-28.

National Institutes of Health (NIH) report, (2001). Stem cells: scientific progress and future research directions.

O'Keeffe G.C., Tyers P., Aarsland D., Dalley J.W., Barker R.A., Caldwell M.A. (2009). Dopamine-induced proliferation of adult neural precursor cells in the

Dottoressa Donatella Farina-Studio del potenziale neuroprotettivo delle cellule staminali neurali adulte prelevate dalla zona subventricolare di topi C57BL/6, con particolare riferimento al ciclo dell'acido ascorbico-Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche, XXV ciclo-Università degli Studi di Sassari

mammalian subventricular zone is mediated through EGF. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 106(21):8754-9.

Palmer T.D., Markakis E.A., Willhoite A.R., Safar F. and Gage F. H. (1999). Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J. Neurosci.* 19: 487–497.

Pappolla M.A., Omar R.A., Kim K.S., Robakis N.K. (1992). Immunohistochemical evidence of oxidative [corrected] stress in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.*, 140(3):621-628.

Parras C.M., Galli R., Britz O., Soares S., Galichet C., Battiste J., et al. (2004). Mash1 specifies neurons and oligodendrocytes in the postnatal brain. *Embo J.* 23(22): 4495-4505.

Pastrana E., Cheng L.C., Doetsch F. (2009). Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(15): 6387-92.

Potten C.S. and Loeffler M. (1990). Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lesson for and from the crypt. *Development*, 110 (4): 1001–1020.

Ramón y Cajal S. Degeneration and Regeneration of the Nervous System. (Trans. Day, R. M., from the 1913 Spanish edn) (Oxford Univ. Press, London, 1928).

Rebenko N.M., Liu L., Cardona A., Ransohoff R.M. (2006). Chemokines, mononuclear cells and the nervous system: heaven (or hell) is in the details. *Current Opinion in Immunology*, 18:683–689.

Redmond D.E. Jr., Bjugstad K.B., Teng Y.D., Ourednik V., Ourednik J., Wakeman D.R., Parsons X.H., Gonzalez R. (2007). Behavioral improvement in a primate Parkinson's model is associated with multiple homeostatic effects of human neural stem cells. *PNAS* 104 (29), 12175–12180.

Dottoressa Donatella Farina-Studio del potenziale neuroprotettivo delle cellule staminali neurali adulte prelevate dalla zona subventricolare di topi C57BL/6, con particolare riferimento al ciclo dell'acido ascorbico-Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche, XXV ciclo-Università degli Studi di Sassari

Reynolds B.A. and Weiss S., (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 255: 1707–1710.

Rumsey S.C., Daruwala R., Al-Hasani H., Zarnowski M.J., Simpson I.A., Levine M. (2000). Dehydroascorbic acid transport by GLUT4 in *Xenopus* oocytes and isolated rat adipocytes. *J Biol Chem.*, 275 (36): 28246-28253.

Sawamoto K., Gonzalez-Perez O., Spassky N., Garcia-Verdugo J. M. *et al.* (2006). New Neurons Follow the Flow of Cerebrospinal Fluid in the Adult Brain. *Science*, 311, 629- 632.

Schober A. (2004). Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res.*, 318(1):215-224.

Schwarz S.C. and Schwarz J. (2010). Translation of stem cell therapy for neurological diseases. *Trans Resl*, 156 (3): 155-160.

Semchuk K.K., Love E.J., Lee R.G. (1993) Parkinson's disease: A test of the multifactorialetiological hypothesis. *Neurology*, 46:1173-1180.

Serra P.A., Esposito G., Enrico P., Mura M.A., Migheli R., Delogu M.R., Miele M., Desole M.S., Grella G., Miele E. (2000). Manganese increases L-DOPA auto-oxidation in the striatum of the freely moving rat: potential implications to L-DOPA long-term therapy of Parkinson's disease. *British Journal of Pharmacology*, 130, 937-945.

Serra PA., Pluchino S., Marchetti B., Desole M.S., Miele E. (2008). The MPTP mouse model: Cues on DA release and neural stem cell restorative role. *Parkinsonism Relat Disord*, 14: S189-S193.

Serra PA., Sciola L, Delogu MR, Spano A, Monaco G, Miele E, Rocchitta G, Miele M, Migheli R, Desole MS. (2002). The neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine induces apoptosis in mouse nigrostriatal glia.

Dottoressa Donatella Farina-Studio del potenziale neuroprotettivo delle cellule staminali neurali adulte prelevate dalla zona subventricolare di topi C57BL/6, con particolare riferimento al ciclo dell'acido ascorbico-Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche, XXV ciclo-Università degli Studi di Sassari

Relevance to nigral neuronal death and striatal neurochemical changes. *J Biol Chem*, 277(37):34451-61.

Shannon T.A. (2001). Human embryonic stem cell therapy. *Theol Stud*, 62(4): 811-824.

Shihabuddin L.S., Ray J. and Gage F. H. (1997). FGF-2 is sufficient to isolate progenitors found in the adult mammalian spinal cord. *Exp. Neurol.* 148: 577–586.

Sng J. and Lufkin T. (2012). Emerging Stem Cell Therapies: Treatment, Safety, and Biology. *Stem Cells Int*, 1-9.

Spassky N., Merkle F.T., Flames N., Tramontin A.D., Garcia-Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A. (2005). Adult Ependymal Cells Are Postmitotic and Are Derived from Radial Glial Cells during Embryogenesis. *J Neurosci*, 25(1): 10–18.

Spillantini M.G., Schmidt M.L., Lee V.M., Trojanowski J.Q., Jakes R., Goedert M. (1997). Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*, 388:839–840.

Spradling A., Drummond-Barbosa D., Kai T. (2001). Stem cells find their niche. *Nature*, 414:98-104.

Steece-Collier K., Maries E, Kordower JH. (2002). Etiology of Parkinson's disease: Genetics and environment revisited. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(22):13972-13974.

Stockl M., Fischer P., Wanker E., Herrmann A. (2008). Alpha-synuclein selectively binds to anionic phospholipids embedded in liquid-disordered domains. *J Mol Biol*, 375:1394–404.

Sudha K., Rao A.V., Rao S., Rao A. (2003). Free radical toxicity and antioxidants in Parkinson's disease. *Neurol India.*, 51 (1):60-62.

Takagi, Y., Takahashi J., Saiki H., Morizane A. et al. (2005). Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *J Clin Invest*, 115(1): 102-109.

Takanaga H. Mackenzie B. and Hedigher M.A. (2004). Sodium-dependent ascorbic acid transporter family SLC23. *Eur J Physiol*, 447:677-682.

Tatton W.G., Chalmers-Redman R, Brown D, Tatton N. (2003). Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation. *Ann Neurol.*, Suppl 3:S61-70; discussion S70-2.

Taupin P. and Gage F.H. (2002). Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *J. Neurosci. Res.* 69: 745-749.

Taylor C.A., Sainte-Hilaire M.H., Cupples L.A., Thomas C.A., Burchard A.E., Feldman R.G., Myers R.H. (1999) Environmental, medical, and family history risk factors for Parkinson's disease: A new England based case control study. *Am. J. Med. Genet*, 88: 742–749.

Tramontin A.D., Garcia-Verdugo J.M. (2003). Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment. *Cereb Cortex*, 13:580-587.

Tuan R.S., Boland G. and Tuli R. (2003). Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Research and Therapy*, 5 (1): 32-45.

Vescovi A.L., Galli R., Gritti A. (2001). The neural stem cells and their transdifferentiation capacity. *Biomed Pharmacother*, 55: 201-205.

Vescovi A.L., Galli R., Reynolds B.A. (2006). Brain tumour stem cells. *Nature, Cancer*, 6: 425-436.

Vescovi, A.L., Reynolds, B.A., Fraser, D.D., Weiss, S., (1993). bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells. *Neuron* 11: 951–966.

Wang T.Y., Sen A., Behie L.A., Kallos M.S. (2006). Dynamic behavior of cells within neurospheres in expanding populations of neural precursor. *Brain Res*, 1107:82-96.

Wang Y., Chen S., Yang D., Le W. (2007). Stem cell transplantation: a promising therapy for Parkinson's disease. *J Neuroimmune Pharmacol* 2: 243-250.

Weiss S., Dunne C., Hewson J., Wohl C., Wheatley M., Peterson A. C., Reynolds B.A. (1996). Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J. Neurosci.* 16: 7599–7609.

Wilson E.B. (1896). The cell in development and inheritance. MacMillan, London.

Wilson J.X., Peters C.E., Sitar S.M., Daoust P., Gelb A.W., (2000). Glutamate stimulates ascorbate transport by astrocytes. *Brain Research*, 858:61-66.

Yan J., Studer L. and McKay R.D.G. (2001). Ascorbic acid increases the yield of dopaminergic neurons derived from basic fibroblast growth factor expanded mesencephalic precursor. *J.Neurochem*, 76: 307-311.

Young K.C. and Sugihara C. (2012). Role of Stem Cells in Neonatal Lung Injury. *The Newborn Lung: Neonatology Questions and Controversies*, Chapter 9 (Second Edition), 197-215.

Zhao C., Wei D., Gage F.H. (2008). Mechanisms and Functional Implications of Adult Neurogenesis. *Cell*, 132: 645–660.