



Università degli studi di Sassari

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Neuroscienze e Scienze Materno Infantili

Sezione di Farmacologia

(Direttore: Prof.ssa Maria Speranza Desole)

Dottorato di Ricerca in Neuroscienze XXI Ciclo

Valutazione del potenziale antiossidante e neuroprotettivo di cellule staminali neurali adulte prelevate dalla zona subventricolare di topi C57BL/6

Tutor:

Prof.ssa Maria S. Desole

Coordinatore:

Prof. Egidio Miele

Tesi di dottorato del Dott. Giammario Calia

Anno Accademico 2007-2008

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Aspetti generali delle cellule staminali	1
1.1.1 Concetti generali sulle cellule staminali adulte	3
1.1.2 Le cellule neurali staminali adulte	5
1.1.3. Le neurosfere	15
1.1.4 Aspetti storici	17
1.2. Il morbo di Parkinson	19
1.2.1 Patogenesi	21
1.2.1.1 Parkinson genetico	21
1.2.1.2 Parkinson sporadico	24
1.3. Le specie reattive dell'ossigeno e lo stress ossidativo	28
1.4. Le cellule staminali ed il morbo di Parkinson	31
1.5. Ruolo biologico dell'acido ascorbico	36
2. SCOPO DELLA RICERCA	41
3. MATERIALI E METODI	42
3.1 Animali sacrificati per l'espanto della zona subventricolare (SVZ)	42
3.2 Espianto della zona subventricolare	42
3.3 Colture cellulari staminali	43
3.4 Microscopia	43
3.5 Composizione del medium complete plus	43
3.5.1 Composizione dell' ormone mix	44
3.6 Composizione del buffer di digestione	45
3.7 Vitalità cellulare	45
3.8 Analisi neurochimica	46
3.9. Sostanze chimiche utilizzate per gli esperimenti	46
4. RISULTATI	47
4.1 Aumento dell'attività mitocondriale indotto da L-Dopa e Dopamina	47
4.2 Potenziamento dell'attività mitocondriale indotto da L-Dopa e Acido Ascorbico	48
4.3 Tossicità indotta da Manganese e protezione sinergica dell'acido ascorbico e della L-Dopa	49
4.4 Tossicità indotta da MPTP ed MPP⁺ sulle aNSC	51
4.5 Trattamento delle staminali neurali adulte con l'inibitore del DAT	53
4.6 L-Dopa, Dopamina ed Acido Ascorbico aumentano la viability nel trattamento con MPTP ed MPP⁺	55
4.7 Effetto dell'Acido Ascorbico e del deidroascorbato sulla viability delle cellule staminali	56
4.8 Acido Ascorbico intracellulare	57
4.9. Presenza dell'acido ascorbico nel medium e all'interno delle cellule dopo trattamento con DHAA	59
4.10. Auto-ossidazione di AA, L-DOPA e DA in presenza o meno di aNSCs 60	
5. DISCUSSIONE	65
6. BIBLIOGRAFIA	75
7. RIASSUNTO	96

1. INTRODUZIONE

1.1 Aspetti generali delle cellule staminali

Le cellule staminali sono delle unità funzionali che rivestono un ruolo critico nello sviluppo dell'embrione e dei tessuti. Queste derivano da cellule staminali embrionali totipotenti (ES) presenti all'interno della blastocisti dalla quale, nel corso della gastrulazione, si sviluppano tre foglietti embrionali: ectoderma, mesoderma ed endoderma. Durante lo sviluppo, queste cellule maturano gradualmente sino a divenire staminali somatiche (SC) tessuto-specifiche e sono responsabili della crescita, del mantenimento e della riparazione dei tessuti (Faust C. et al., 1993) (**Figura 1**). Il numero di cellule staminali diminuisce quando il tessuto si avvicina alla maturità e rimane costante per il resto della vita. Per esempio, l'epidermide, il sistema ematopoietico e l'epitelio intestinale subiscono un continuo *turnover* cellulare; il sistema nervoso centrale (SNC) dei mammiferi adulti, invece, è stato per lungo tempo considerato incapace di svolgere questa attività fisiologica proprio per la mancanza di cellule staminali. Quest'opinione è stata messa in discussione negli ultimi decenni dopo che è stata dimostrata la presenza di staminali neurali nel cervello dei mammiferi adulti, ma già in precedenza cellule

mitogene furono rinvenute in alcune regioni del SNC, come si dirà più dettagliatamente in seguito. Si pensa che la zona subventricolare (SVZ), un monolayer di cellule che riveste le cavità ventricolari, sia il compartimento più ampio di staminali nel cervello dei mammiferi adulti; da tale regione, infatti, sono state prelevate e coltivate *in vitro* cellule neurali staminali adulte (aNSC) (Cameron H.A et al., 1998; Temple S. et al.,1999; Khun H.G. et al., 1999; Gage F.H, 2000).

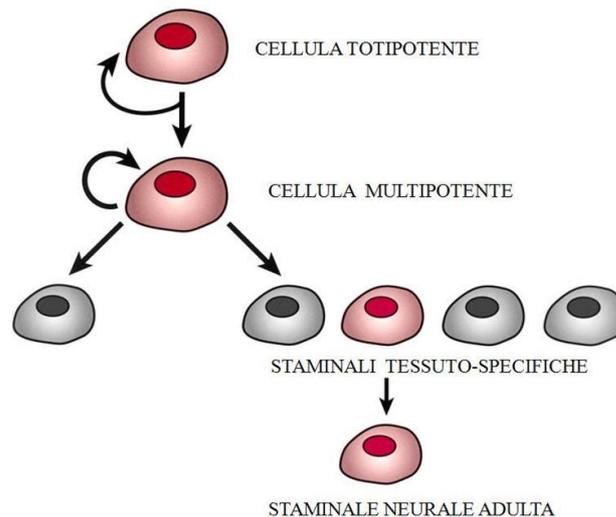


Figura 1. Gerarchia delle cellule staminali

Nonostante ci si possa aspettare un certo grado di plasticità in termini di crescita, velocità di espansione e differenziamento queste cellule possono differenziarsi solo ed esclusivamente in tre tipi cellulari: neuroni, astrociti ed oligodendrociti.

1.1.1 Concetti generali sulle cellule staminali adulte

Durante lo sviluppo, le cellule staminali proliferano e parte della progenie va incontro a differenziamento per generare tessuti ed organi specifici. Sebbene la diversificazione completa di distinti tipi cellulari maturi si ha solamente poco dopo la nascita, negli organismi adulti si hanno continue riparazioni e sostituzioni dovute alle staminali somatiche. Queste cellule spesso quiescenti, o con attività mitotica ridotta, dimostrano una particolare abilità nel sostituire cellule danneggiate o morte (Potten C.S. et al., 1990; Loeffler M. et al., 1997).

L'impegno dei ricercatori ha consentito d'identificare *marker* molecolari ed antigeni per i diversi tipi di cellule staminali; individuarle rimane impresa ardua fatta eccezione per le staminali ematopoietiche per le quali sono ampiamente disponibili i *marker* molecolari.

Per definizione, tuttavia, le cellule staminali mancano di antigeni particolari essendo esse indifferenziate e mostrano un certo potenziale proliferativo legato alla loro notevole capacità di autorinnovamento (*self-renewal*). Sono, inoltre, multipotenti poichè danno origine ad una vasta gamma di cellule differenziate nel tessuto nel quale risiedono ed in seguito ad un grave danno biologico

possiedono la capacità di rigenerarlo (Potten C.S et al., 1990; Loeffler M et al., 1997).

L'autorinnovamento è la capacità che una popolazione di cellule possiede nel mantenere un numero di staminali costante in uno specifico compartimento. Circostanze particolari possono fare incrementare o diminuire il numero di staminali. Tutto ciò è possibile perchè in un tessuto il numero di cellule è finemente regolato da equilibri tra divisioni simmetriche, che generano due cellule staminali, o, in alternativa, due cellule differenziate. Il primo o il secondo tipo di divisione incrementerà o diminuirà il numero di una popolazione di cellule in un tessuto. Le cellule staminali sono anche in grado di mantenere costante la popolazione di progenitori attraverso divisioni di tipo asimmetrico in cui, una cellula figlia rimane staminale e l'altra va incontro a differenziamento e/o migrazione.

Attraverso questo meccanismo varia, probabilmente, il numero di staminali o quello delle cellule differenziate in risposta ai cambiamenti dell'ambiente extracellulare (dovuti, per esempio, a lesioni o condizioni patologiche).

La capacità che una singola cellula possiede nel generare molti tipi di cellule mature è detta multipotenza. Fondamentalmente le staminali multipotenti risultano abili nel generare tutti i tipi di cellule

che costituiscono il tessuto in cui risiedono. *In vivo*, questo criterio può risultare difficile da spiegare perché le staminali potrebbero generare solo un sottotipo di cellule differenziate. Tale potenzialità può essere facilmente dimostrata, con dei saggi, *in vitro* (Reynolds B.A. et al., 1992; Gritti A. et al., 1996; Palmer T.D. et al., 1999; Gritti A. et al., 1999; Mi H. et al., 1999).

Una particolarità delle cellule staminali è quella di essere confinata in piccole aree dentro le quali la citoarchitettura, o i confini biochimici, creano nicchie specifiche. All'interno delle nicchie sono garantite tutte quelle condizioni che rendono uniche le staminali ossia l'autorinnovamento e la generazione di una progenie matura. Mentre nel fegato e nel sistema ematopoietico, per esempio, non è perfettamente chiara la posizione anatomica delle nicchie, al contrario, nel SNC, nell'epidermide, nei bulbi piliferi e nell'intestino queste aree sono spazialmente ben definite; le staminali possono essere identificate all'interno di tali nicchie per collocazione e morfologia (Fuchs E. et al., 2000; Weissmann I.L., 2000).

1.1.2 Le cellule neurali staminali adulte

Il cervello dei mammiferi si sviluppa a partire dal tubo neurale, la cui cavità ventricolare contiene liquido cerebrospinale. I precursori

neurali proliferanti che, inizialmente risiedono nella zona ventricolare (VZ) durante l'embriogenesi, migrano gradualmente nella zona subventricolare (SVZ) (Conover J.C. and Allen R.L., 2002). Nell'adulto, la zona ventricolare si riduce ad un monostrato continuo di cellule mitoticamente attive e risulta adiacente alle cellule ependimali che rivestono le cavità ventricolari del telencefalo. Per molto tempo si è pensato che in questa zona potessero originarsi solamente cellule gliali. Recentemente, differenti gruppi di ricerca (Gritti A. et al., 1996; Morshead C.M. et al., 1994) hanno avanzato l'ipotesi che, cellule staminali multipotenti isolate inizialmente dal corpo striato dei mammiferi adulti, possano risiedere, invece, nella zona subventricolare (Morshead C.M. et al., 1994; Doetsch F. et al., 1999). Cellule neurali staminali sono state successivamente isolate anche da altre regioni del cervello (Palmer T.D. et al., 1999; Weiss S. et al., 1996; Shihabuddin L.S et al., 1997).

La zona subventricolare è attualmente considerata come il compartimento più importante di cellule staminali nel sistema nervoso centrale degli adulti. Molte cellule generate nella SVZ di roditori neonati e adulti migrano lungo un percorso noto come *flusso migratorio rostrale* (*rostral migratory stream*, RMS) fino al bulbo

olfattivo, dove si differenziano in interneuroni (Luskin M.B., 1993; Doetsch F. et al., 1999) (**Figura 2**).

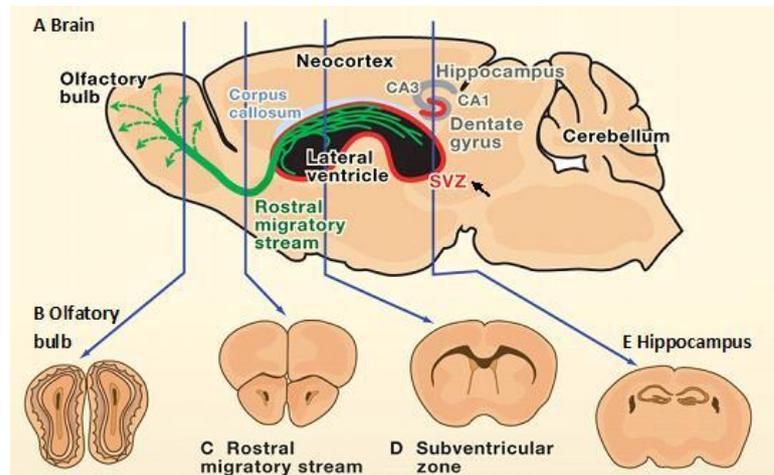


Figura 2. Flusso migratorio rostrale

Le staminali neurali adulte, isolate dalla SVZ, possono essere coltivate *in vitro* conservando stabilmente le loro caratteristiche funzionali: la multipotenzialità e l'auto-rinnovamento. In un terreno di coltura privo di siero, tali cellule necessitano della presenza del fattore di crescita epidermico (EGF) e del fattore di crescita fibroblastico (FGF-2) (Reynolds B.A. et al., 1992; Gritti A. et al., 1996; Richards K.J. et al., 1992; Morshead C.M. et al., 1994); la velocità di espansione cellulare è condizionata dai segnali mitogeni presenti nel mezzo di coltura. La presenza contemporanea dell'EGF e dell'FGF (Gritti A. et al., 1999) favorisce un'intensa attività proliferativa nella quale è possibile osservare numerose divisioni simmetriche (Morrison S.J. et

al., 1997); quando dal medium viene sottratto uno dei due fattori di crescita la velocità di proliferazione diminuisce mentre aumenta il numero di cellule differenziate (Gritti A. et al., 1999). Questo importante aspetto fisiologico dimostra come le staminali adulte neurali modifichino la loro attività proliferativa in seguito a cambiamenti dell'ambiente extracellulare. Le condizioni per il differenziamento possono essere modulate da vari segnali extracellulari in modo tale da generare glia oppure neuroni con diversi fenotipi neurotrasmettitoriali (Johe K.K. et al., 1996). *In vitro*, il tempo di comparsa delle diverse linee cellulari del sistema nervoso centrale (SNC), è simile a quello delle regioni neurogeniche dell'embrione *in vivo*: per primi sono generati i neuroni, seguiti da cellule astrogliali ed oligodendrociti.

La sopravvivenza delle cellule nella fase di maturazione dipende da segnali extracellulari. Per esempio, l'FGF-2 evita il differenziamento dei precursori neurali in glia e neuroni; l'aggiunta di siero in basse concentrazioni promuove la maturazione neurale e l'espressione di antigeni gliali (Vescovi A.L. et al., 1993). E' importante ricordare come alcuni neuroni maturi, derivati da staminali propagate in coltura per lungo tempo, siano realmente attivi funzionalmente cioè capaci di evocare potenziali d'azione (Gritti A. et

al., 1996). I fenotipi neurotrasmettitoriali che più frequentemente possono essere identificati *in vitro* sono quello GABA-ergico e quello glutammatergico; in questo caso il differenziamento è indotto dalla semplice rimozione dei fattori di crescita da un medium di coltura privo di siero. Prove sperimentali indicano la plasticità delle staminali adulte poiché, in condizioni ideali, si possono ottenere fenotipi neurotrasmettitoriali specifici come quello catecolaminergico (Daadi M.M. et al., 1999; Yan J. et al., 2001; Wagner J. et al., 1999).

Anche i fattori epigenetici possono condizionare l'attività delle cellule staminali adulte sia in *ex vivo* che *in vivo*. Tutto ciò è stato osservato nel cervello di mammiferi adulti in seguito alla somministrazione intraventricolare di EGF, FGF (Wagner J. et al., 1999; Craig C.G. et al., 1996) o del fattore neurotrofico cerebrale (BDNF): tali sostanze stimolerebbero la proliferazione cellulare (Khun H.G. et al., 1997; Zigova T. et al., 1998). Mentre l'FGF ed il BDNF favoriscono un aumento nel numero di neuroni, l'EGF stimola il differenziamento delle staminali neurali adulte in cellule gliali (Wagner J. et al., 1999; Craig C.G. et al., 1996). Anche il fattore di crescita trasformante (TGF α), somministrato in ratti con lo striato lesionato, determina un incremento delle cellule sub ventricolari; queste sono capaci di migrare nella zona lesa e differenziarsi in

neuroni tirosina-idrossilasi positivi (TH^+) (Fallon J. et al., 2000); in sintesi, si può affermare che fattori genetici ed epigenetici regolano finemente nel tempo la proliferazione ed il differenziamento delle cellule staminali neurali adulte.

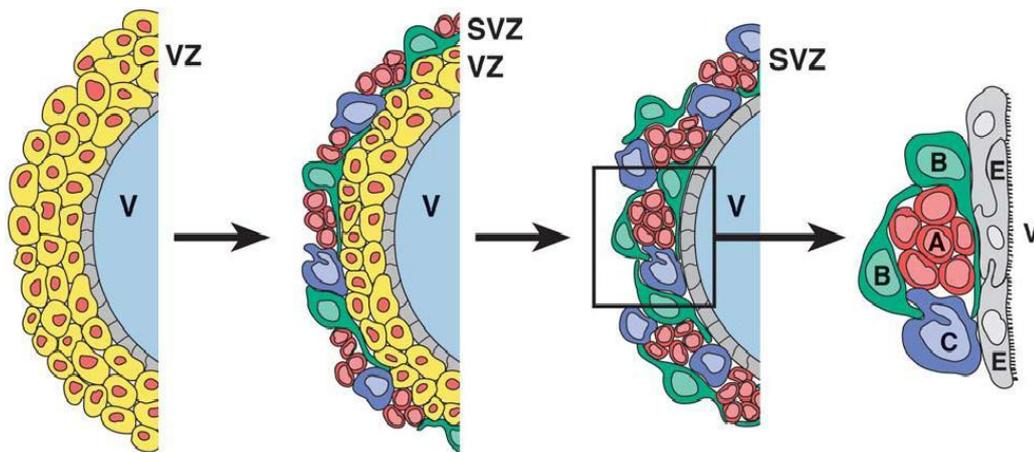


Figura 3. Formazione della SVZ dalla VZ (Conover J.C. and Allen R.L. 2002)

Nella SVZ, cellule con caratteristiche molecolari e strutturali comuni agli astrociti vengono considerate staminali e sono note come cellule di tipo B (Doetsch F. et al., 1999; Laywell E.D. et al., 2000; Garcia A.D. et al., 2004); queste sono immunoreattive alla proteina gliale fibrillare acida (GFAP) e stanno molto vicino ad altri due tipi cellulari della zona subventricolare: le cellule con morfologia transizionale (tipo C) ed i neuroblasti (tipo A) (**Figura 3**). Anche le cellule di tipo A e di tipo C esprimono *marker* particolari: le prime risultano essere immunoreattive alla *doublecortin* (DCX^+) ed alla molecola di adesione

cellulare neurale (NCAM⁺), le seconde alla *distal-less homeobox 2* (DLX⁺) (Doetsch F. et al., 1999). Cellule di tipo B, e progenitori multipotenti della SVZ del cervello adulto umano, sono state ampiamente studiate *in vivo* ed *in vitro* (Sanai N. et al., 2004).

Si è già detto che la SVZ è un importante strato germinale che si forma durante lo sviluppo da precursori primari della VZ (Morshead C.M. et al., 1994) (**Figura 3**). Queste due zone esprimono due peptidi differenti: la *distal-less homeobox 2* (DLX⁺) e *noggin* (Corbin J.C. et al., 2000). *Noggin* previene l'attivazione di alcuni recettori legando le *bone morphogenetic proteins* (BMP) (McMahon J.A. et al., 1998), mentre DLX⁺ è un fattore trascrizionale espresso in progenitori neurali (Panganiban G. and Rubenstein J.L., 2002).

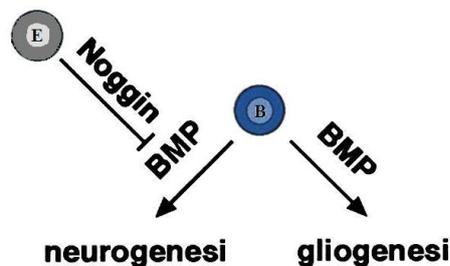


Figura 4. Neurogenesi indotta da *noggin*

Noggin viene espresso principalmente da cellule della VZ mentre DLX⁺ è espresso da quelle della SVZ. Il peptide DLX è sintetizzato dalle cellule di tipo C e di tipo A, ma non è espresso dai progenitori

primari (cellule di tipo B) suggerendo dunque la sua espressione nei precursori secondari (Tramontin A.D. et al., 2003). Studi recenti confermano l'espressione di *noggin* nelle cellule ependimali (Lim D.A. et al., 2000) e di BMP nella vicina SVZ.

Le BMP potenzialmente inibiscono la formazione di nuovi neuroni nella zona subventricolare legandosi ad una classe di recettori particolari (BMPR); *noggin* promuove la neurogenesi prevenendo il legame tra le *bone morphogenetic proteins* ed il recettore BMPR (Wilson P.A. and Hemmati-Brivanlou A. 1995). BMP non solo blocca i precursori della SVZ nella formazione di nuovi neuroni, ma favorisce il differenziamento delle cellule staminali in cellule gliali. Infatti, dati sperimentali suggeriscono che *noggin* contribuisce alla formazione di un ambiente neurogenico all'interno della SVZ (Lim D.A. et al., 2000) (**Figura 4**).

La SVZ persiste in età adulta generando neuroni e glia (Lois C. and Alvarez-Buylla A., 1993; Kirschenbaun B. and Goldman S.A., 1995); è stata descritta come una zona in cui sono presenti cellule con morfologia indifferenziata, cellule gliali e cellule con morfologia transizionale. In particolare sono stati evidenziati tre fenotipi cellulari: neuroblasti o cellule di tipo A, cellule astrocitarie di tipo B e cellule con morfologia transizionale (cellule di tipo C). Le cellule di tipo A

formano catene orientate tangenzialmente avvolte da cellule di tipo B, mentre insiemi di cellule proliferanti di tipo C sono associati a catene di neuroblasti (Doetsch F. et al., 1997) (**Figura 5**). La dimostrazione che gli astrociti della SVZ sono i precursori primari neuronali *in vivo*, ma anche cellule staminali *in vitro*, è data dalla somministrazione dell'antimitotico citosina-b-arabinofuranoside (Ara-C). Dopo il trattamento le cellule A e le C vengono selettivamente eliminate e gli astrociti della SVZ iniziano a dividersi dando origine a cellule di tipo C che, a loro volta, generano cellule di tipo A (Doetsch F. et al., 1999).

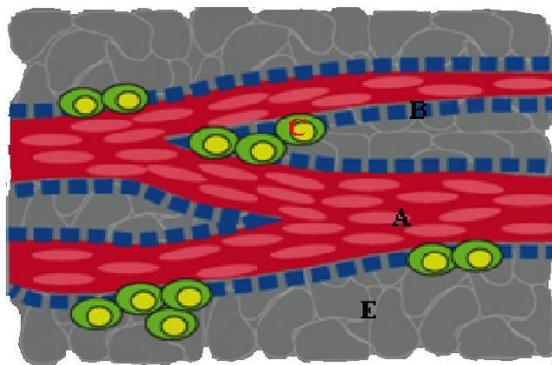


Figura 5. SVZ in sezione tangenziale

Le cellule di tipo A presentano corpo allungato con uno o due processi, abbondante cromatina contenente due, o più, piccoli nucleoli, citoplasma scuro contenente molti ribosomi liberi, un piccolo apparato di Golgi e microtubuli orientati lungo l'asse delle cellule. I nuclei sono raramente invaginati. Sono unite ad altre cellule di tipo A

tramite piccoli complessi giunzionali circolari distribuiti sulla superficie cellulare (0.5-1 μ m). Vicino a questi complessi sono presenti vescicole endocitiche correlate, probabilmente, allo scambio di segnali fra cellule oppure alla rimozione dei complessi stessi.

Le cellule di tipo B presentano contorni irregolari che riempiono gli spazi fra cellule vicine: hanno nuclei irregolari ed invaginati, pochi ribosomi e molti filamenti intermedi. Vi sono due sottotipi cellulari: B1 e B2. Gli astrociti di tipo B1 sono più chiari, possiedono un citoplasma abbondante e sono più grandi rispetto a quelli di tipo B2. Inoltre, nelle cellule B1 la cromatina è relativamente dispersa, mentre, nelle B2 è più compatta. Le cellule B1 si collocano vicino alle cellule ependimali per formare una lamina che ricopre lo strato ependimale stesso. Le cellule B2, invece, sono localizzate in prossimità del corpo striato. Le cellule di tipo C sono più larghe e più sferiche (sono meno allungate). I loro nuclei presentano profonde invaginazioni e abbondante cromatina lassa anche se talvolta può apparire più compatta. Hanno un nucleolo largo e reticolato ed il citoplasma contiene un ampio apparato di Golgi e pochissimi ribosomi; non sono presenti fasci di filamenti intermedi tipici delle cellule di tipo B. Il contorno di tali cellule è liscio e frequentemente si

uniscono alle cellule di tipo A con le quali occasionalmente si osserva la formazione di piccoli complessi giunzionali.

Le cellule endoteliali di tipo E (**Fig.3**) formano un monostrato epiteliale che separa la SVZ dalla cavità ventricolare. I processi laterali di cellule endoteliali adiacenti sono fortemente interdigitati e contengono complessi giunzionali apicali. La superficie esposta alla cavità ventricolare contiene microvilli, spesso cigliati; il citoplasma si presenta ricco di mitocondri con nuclei sferici e cromatina non condensata (Doetsch F. et al., 1997).

1.1.3. Le neurosfere

Nel 1992, Reynolds e Weiss isolano e caratterizzano *in vitro* per la prima volta cellule indifferenziate con limitata capacità proliferativa conosciute come progenitori neurali (NPC) prelevate dal cervello di topo adulto (Reynolds B.A. e Weiss S., 1992). I due ricercatori individuano nella SVZ popolazioni di cellule che esprimono la nestina e si differenziano in diversi fenotipi cellulari del sistema nervoso: neuroni, astrociti ed oligodendrociti.

Le cellule subventricolari, trasferite in un medium di coltura ideale, contenente il fattore di crescita epidermico, formano le neurosfere (**Figura 6**).

La nestina è una proteina citoscheletrica, appartenente ai filamenti intermedi, che caratterizza i neuroepiteli e le cellule staminali del sistema nervoso centrale durante lo sviluppo; è considerata un *marker* dei progenitori neuronali e delle staminali adulte. Nel 1995 vengono caratterizzate *in vitro* cellule molto simili provenienti dall'ipocampo di ratto adulto che necessitano del fattore di crescita fibroblastico (FGF-2) (Gage et al., 1995).

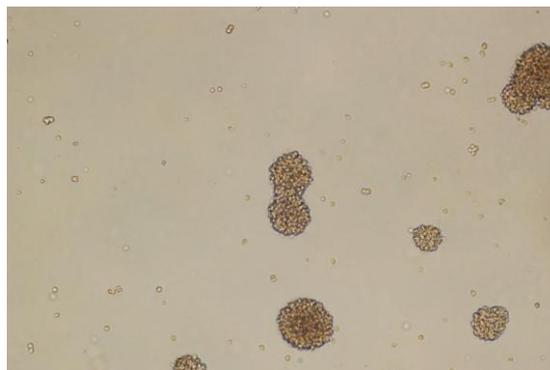


Figura 6. Neurosfere in coltura

Esperimenti successivi hanno dimostrato la multipotenzialità e la capacità di autorinnovamento di queste cellule (Gritti A. et al., 1996; Palmer T.D. et al., 1997) presenti non solo nel cervello ma anche nel midollo spinale di specie animali diverse compreso l'uomo (Taupin P. et al., 2002); questi studi indicano la distribuzione di cellule staminali

adulte in diverse aree del sistema nervoso centrale, ed in modo particolare all'interno della SVZ e dell'ipocampo.

Spesso nei laboratori di ricerca vengono utilizzate neurosfere che esprimono la proteina fluorescente verde (*green fluorescent protein*, GFP) (**Figura 7**), perché individuarle, dopo un trapianto, diventa più semplice (Pluchino S. et al., 2003).

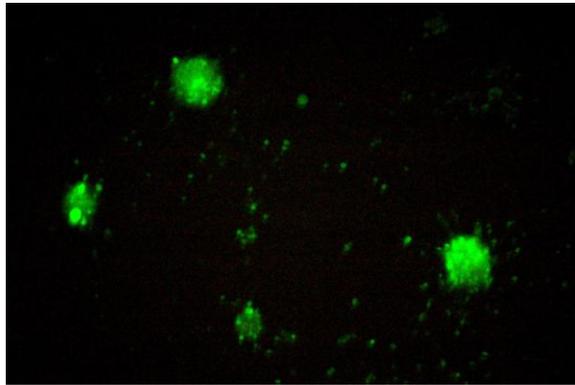


Figura 7. Neurosfere che esprimono la GFP

1.1.4 Aspetti storici

Il concetto di neurogenesi nel cervello adulto dei mammiferi, trova le sue radici nel secolo scorso ma ha ottenuto un ampio consenso, da parte della comunità scientifica, solo di recente. Infatti, già dai primi del novecento era nota la continua attività mitotica della SVZ. Tra il 1912 ed il 1944 diversi gruppi di ricerca identificano nel cervello di roditori neonati ed adulti una zona mitoticamente attiva lungo il muro del ventricolo laterale (Allen E., 1912; Rydberg E.,

1932; Kershman J., 1938; Globus J. H. and Kunlenbeck H., 1944). Con l'innovativa tecnica autoradiografica viene dimostrata nei topi la proliferazione ed il differenziamento delle cellule subventricolari (Smart I., 1961). Altman tra il 1962 ed il 1963 ipotizza la neurogenesi anche in ratti e gatti adulti (Altman J., 1962; Altman J., 1963) tuttavia la funzione di queste cellule proliferanti non è del tutto chiara; si pensa che molte cellule prodotte nella SVZ durante l'embriogenesi possano differenziare in neuroni e, dopo la nascita, in cellule gliali (Smart I., 1961; Altman J., 1966; Boulder Committee, 1970; Paterson J. A. et al., 1973; Sturrock R. R. and Smart I. H., 1980; Levison S. W. and Goldman J. E., 1993). Negli anni ottanta viene dimostrata la rigenerazione neuronale nel telencefalo di uccelli adulti (Goldman S. A. and Nottebohm F., 1983) e nel 1993 la neurogenesi nella parte anteriore della zona subventricolare (Luskin M. B., 1993); nello stesso anno Alvarez-Buylla dimostra definitivamente che la SVZ ha la capacità di generare nuove cellule e che esse hanno un limitato potenziale nel differenziarsi in neuroni e glia (Lois, C and Alvarez-Buylla A., 1993). Qualche anno prima, nel 1992, Reynolds e Weiss avevano indicato la SVZ come fonte di cellule staminali (Reynolds B. A. and Weiss S., 1992).

1.2. Il morbo di Parkinson

La malattia di Parkinson (MP) prende il nome dal medico inglese James Parkinson che per primo nel 1817 ne descrisse i sintomi in “*An Essay on the shaking palsy*” definendola paralisi agitante. Si tratta di una patologia derivante dall’alterazione dei processi di degradazione delle proteine nei neuroni dopaminergici della sostanza nera di Sömmering o *substantia nigra pars compacta*. Ciò porta alla loro morte per stress proteolitico e quindi ad un grave deficit nella produzione di dopamina (Migheli R. et al., 2008), un neurotrasmettitore catecolaminico coinvolto nel circuito nervoso dei nuclei della base del telencefalo, ovvero cinque aggregati neuronici interconnessi fra loro e implicati nella coordinazione del movimento. I sintomi clinici nella malattia di Parkinson possono essere riconosciuti nel momento in cui il 60-70% dei neuroni dopaminergici degenerano, determinando nel sistema nigrostriatale una carenza di dopamina (DA), il neurotrasmettitore implicato nel controllo delle vie eccitatorie ed inibitorie interne ai nuclei della base (Lang A. et Lozano A.M., 1998). La malattia è caratterizzata da movimenti involontari quali tremore a riposo, bradicinesia, rigidità, riduzione dei movimenti spontanei. A livello terapeutico si attua una terapia a base di L-3,4,-diidrossifenilalanina (L-DOPA), il precursore metabolico della

dopamina (DA) (Serra P.A. et al., 2008). La DA non può essere somministrata perchè non è in grado di attraversare la barriera ematoencefalica. La L-DOPA, somministrata oralmente, è rapidamente assorbita dall'intestino tenue attraverso un sistema di trasporto attivo degli aminoacidi aromatici. Si può dunque verificare competizione tra la L-DOPA e gli aminoacidi assunti con la dieta. L'ingresso del farmaco nel sistema nervoso centrale (SNC) attraverso la barriera ematoencefalica è anche esso un processo attivo mediato dal trasportatore degli aminoacidi aromatici e dunque competitivo con essi. Nel cervello la L-DOPA viene convertita in DA dall'enzima L-DOPA-decarbossilasi nelle terminazioni presinaptiche dei neuroni dopaminergici della *substantia nigra pars compacta* all'interno dello striato. 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).

Nonostante i livelli di questo enzima siano ridotti a causa della degenerazione dei neuroni dopaminergici, permane comunque una discreta attività enzimatica nelle terminazioni residue permettendo così la trasformazione della L-DOPA in DA.

1.2.1 Patogenesi

L'eziologia della malattia di Parkinson è ancora oggi poco conosciuta anche se sono state formulate ipotesi su possibili cause genetiche o sporadiche. Le prime forniscono un quadro patologico che rientra nel cosiddetto Parkinson genetico; le altre determinano quello che viene definito Parkinson sporadico.

1.2.1.1 Parkinson genetico

Tra le cause genetiche del morbo di Parkinson si riconoscono mutazioni a livello di geni che codificano per determinate proteine: alcune di queste fanno parte del sistema di degradazione proteosoma ubiquitina (UPS), altre come per esempio l' α -sinucleina, hanno diversa funzione ma in condizioni patologiche sono ugualmente determinanti per lo sviluppo della malattia.

L' α -sinucleina è una proteina della famiglia delle sinucleine, costituita da 140 amminoacidi (George J.M., 2002). Sebbene le sue normali funzioni fisiologiche siano sconosciute, si è ipotizzato che possa essere coinvolta nei meccanismi di trasporto delle vescicole contenenti dopamina, a livello delle terminazioni sinaptiche dei neuroni dopaminergici (Clayton D.F. and George J.M., 1999). Mutazioni puntiformi nel gene che codifica per questa proteina, nel

locus 4q21-23 (PARK1), sono responsabili della forma autosomica dominante della malattia (Warner T.T. and Schapira A.H., 2003). Tali mutazioni favoriscono la tendenza della proteina ad aggregarsi in filamenti; questi si ritrovano abbondanti in inclusioni citoplasmatiche dette corpi di Lewy, i più evidenti elementi diagnostici della malattia (Steece-Collier K. and al., 2002).

L' α -sinucleina mutata non può, inoltre, essere degradata dai sistemi proteolitici UPS ed è anche in grado di inibirne la funzione; di conseguenza viene incrementato l'accumulo intracellulare di proteine danneggiate. Questa condizione prende il nome di stress proteolitico (McNaught K.S. and Olanow C.W., 2003). Si è anche ipotizzato che le cellule contenenti l' α -sinucleina mutata risultino più suscettibili allo stress ossidativo: le proteine ossidate, infatti, non vengono più degradate efficientemente dal complesso ubiquitina-proteosoma (Jenner P., 2003).

La parkina è un enzima costituito da 465 amminoacidi appartenente alla classe delle E3 ubiquitin protein ligasi; la sua funzione consiste nel legare catene di poliubiquitina alle proteine destinate alla degradazione (Von Coelln R. et al., 2004). In condizioni patologiche, si riscontra una mutazione nel gene che codifica per la parkina, presso il locus PARK2 (6q25.2-q27): questo determina la

condizione autosomica recessiva del morbo (Warner T.T. and Schapira A.H., 2003). Ciò non consente alla parkina di legare le ubiquitine alle proteine da degradare, accumulandosi, in questo modo, nel citoplasma.

Infine va ricordato l'enzima UCH-L1, della classe delle ubiquitin idrolasi, che rimuove e smonta le catene di poliubiquitina dalle proteine in fase di degradazione rendendo disponibili i monomeri di ubiquitina per successive proteolisi (Leroy E. et al., 1998). La mutazione che interessa il gene che codifica per UCH-L1 si trova nel locus 4p14 (Warner T.T. and Schapira A.H., 2003). Con tale mutazione si riduce la possibilità di recuperare molecole di ubiquitina, che non si trovano più libere nel citoplasma: le successive proteolisi sono dunque compromesse (McNaught K.S. and Olanow C.W., 2003). Fattori genetici possono giocare un ruolo importante nell'eziologia del Parkinson sporadico (Warner T.T. and Schapira A.H., 2003). Individui predisposti alla patologia mostrano nel loro genoma mutazioni che riguardano i geni codificanti per diverse classi di proteine: molecole coinvolte nel metabolismo della DA, enzimi epatici deputati alla detossificazione e le già sopracitate proteine tra le cause della forma familiare del morbo di Parkinson (α -sinucleina, parkina ed UCH-L1). Di recente, è stato individuato un gene, *Nurr1*, essenziale nello

sviluppo e nel sostentamento dei neuroni dopaminergici della substantia nigra: una mutazione, in condizioni di omozigosi, può costituire un altro fattore che predispone alla malattia.

E' stato infine osservato che mutazioni nel DNA mitocondriale aumentano le possibilità di rischio verso tale patologia, soprattutto se i geni interessati sono quelli che vanno a costituire il complesso I della catena respiratoria. Conseguenza di tutto ciò una ridotta disponibilità di ATP e una maggiore vulnerabilità nei confronti del morbo (Warner T.T. and Schapira A.H., 2003).

1.2.1.2 Parkinson sporadico

E' noto che un certo grado di ereditarietà possa rendere un individuo più suscettibile all'azione di agenti tossici sia endogeni che esogeni. Tuttavia la possibilità che questa malattia si trasmetta su basi ereditarie viene scartata nel momento in cui non è riscontrata familiarità. Molti casi di Parkinson si manifestano senza cause evidenti, anche se l'età avanzata è un importante fattore di rischio. Si crede che la malattia possa insorgere da complesse interazione fra suscettibilità genetica e fattori ambientali.

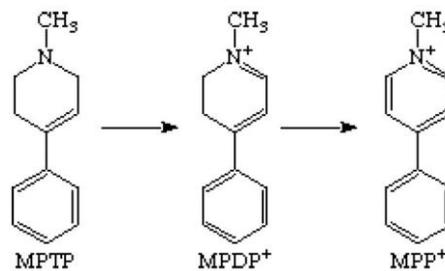
Esperimenti hanno dimostrato che l'1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) e la 6-idrossi-dopamina (6-OH-DA) sono i

principali composti coinvolti nello sviluppo del parkinsonismo sporadico come dimostrato in cavie da laboratorio. Si anche osservato che sostanze presenti in pesticidi ed insetticidi, come il rotenone ed il paraquat per esempio, sono implicati nella patogenesi del morbo di Parkinson. La tossicità di queste molecole si esplica in un deficit di ATP e in una condizione di stress ossidativo (Schober A. 2004). **(Figura 8).**

L'MPTP una neurotossina analoga del narcotico meperedina, spesso utilizzata nei laboratori di ricerca per lo studio della malattia di Parkinson su modelli animali (Schober A., 2004). Agli inizi degli anni ottanta giovani tossicodipendenti svilupparono sintomi analoghi alla malattia di Parkinson in seguito ad assunzione di eroina sintetica (*China White*) a base di 1-metil-4-fenil-propion-ossipiperidina (MPPP) in quanto questa veniva metabolizzata a MPTP. La molecola in questione è altamente lipofila, ed è in grado di attraversare la barriera ematoencefalica. Viene captata dagli astrociti e trasformata, per mezzo delle *monoamino ossidasi B*, in 1-metil-4-fenil-2,3-diidropiridina (MPDP), la 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 (DAT). Le cellule della sostanza nera di Sömmering, che in condizioni fisiologiche esprimono questa proteina di membrana, mostrano una grande affinità per l'MPP⁺, venendone selettivamente uccise 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).

L'MPP⁺ è, anche, capace di legarsi ai trasportatori vescicolari delle monoamine (VMAT) accumulandosi nelle vescicole che contengono dopamina per poi interferire con il trasporto ed il rilascio del neurotrasmettitore (Schober A., 2004) (**Figura 8**).

Altre neurotossine come la 6-OH-DA o il rotenone possono interferire con il complesso I della catena respiratoria mitocondriale; anche questi due composti sono ampiamente utilizzati per lo studio del morbo di Parkinson su modelli animali (Schober A., 2004).

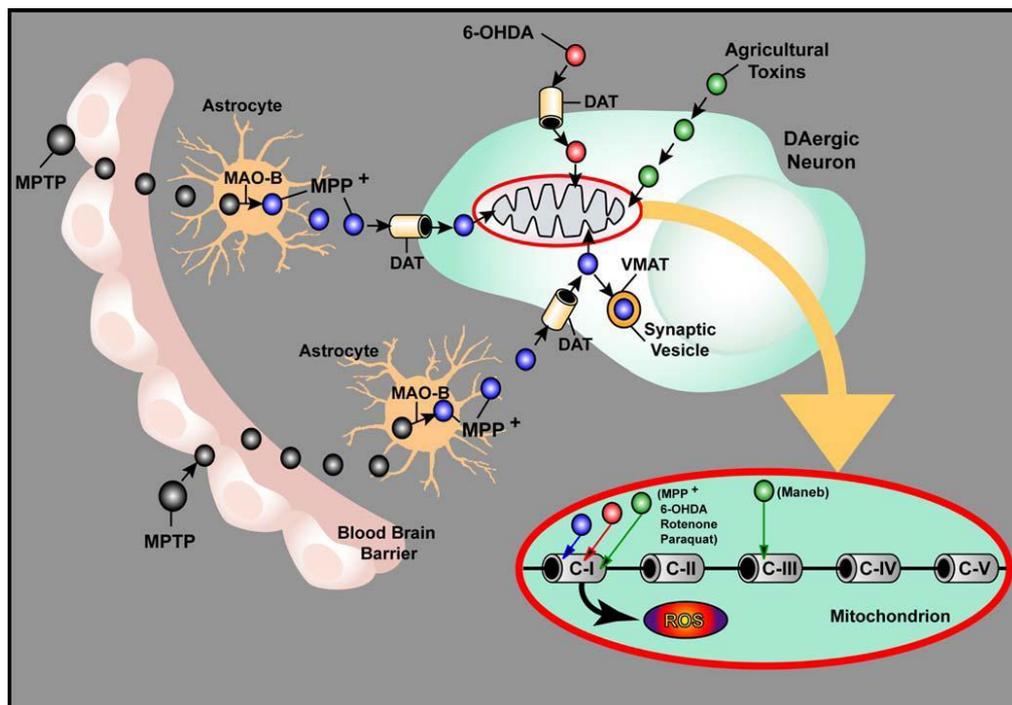


Figura 8. Meccanismi d'azione di alcune neurotossine (Shober A., 2004)

Il rotenone, oltretutto, è un insetticida di origine naturale estratto dalle radici di alcune specie di piante; viene utilizzato come potente insetticida nelle coltivazioni. 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.

1.3. Le specie reattive dell'ossigeno e lo stress ossidativo

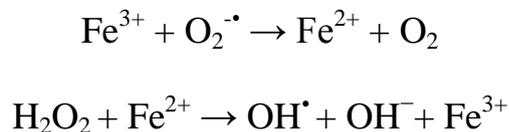
Nelle malattie neurodegenerative, come il morbo di Parkinson e l'Alzheimer, la perdita di neuroni specifici è associata alla formazione di aggregati proteici. In tali patologie sembrerebbe avere un ruolo determinante lo stress ossidativo come risultato di una non controllata produzione di specie reattive dell'ossigeno (**ROS**); l'ossigeno (O_2) è un elemento chimico indispensabile per gli organismi aerobi ma talvolta risulta essere tossico se vengono a generarsi intermedi di riduzione molto più reattivi. La completa riduzione dell'ossigeno ad acqua nella catena respiratoria richiede quattro elettroni. Questo processo genera, molto spesso, nel mitocondrio molecole altamente reattive dell'ossigeno come l'acqua ossigenata (H_2O_2), il nitrossido (NO), lo ione superossido ($O_2^{\cdot-}$) ed i radicali idrossilici (OH^{\cdot}) (Barnham K.J et al., 2004). Il consumo elevato di ossigeno, un livello basso di antiossidanti ed una scarsa capacità rigenerativa del tessuto cerebrale favorirebbero danni biologici dovuti alla formazione di specie reattive dell'ossigeno. Lo stress ossidativo potrebbe quindi avere un ruolo determinante nell'evoluzione dei processi neurodegenerativi. Risultano particolarmente suscettibili all'attacco dei ROS i lipidi insaturi ed il DNA. L'attacco dei radicali liberi sul doppio legame degli acidi grassi insaturi genera radicali perossilipidici

che attaccano altri acidi grassi insaturi compromettendo l'integrità delle membrane biologiche. Anche il DNA e le proteine risultano essere un bersaglio dei radicali liberi (sono particolarmente abbondanti nel cervello dei parkinsoniani la 8-idrossi-guanina e la 8-idrossi-2-deossiguanina) (Gabbita S.P. et al., 1998).

Le cellule possiedono, tuttavia, dei meccanismi di difesa contro lo stress ossidativo e questi vengono utilizzati come *marker* sia nell'attività di ricerca che nella diagnostica. Per esempio, proteine antiossidanti quali la catalasi, la superossido dismutasi (SOD), la glutatione perossidasi e la riduttasi incrementano nell'ipocampo e nell'amigdala dei malatti di Alzheimer (Zemlan F.P. et al., 1989; Pappolla M.A. et al., 1992).

In condizioni fisiologiche nella *substantia nigra* si possono riscontrare concentrazioni piuttosto alte di ROS (Sudha K. Et al., 2003): questa condizione risulta incrementata nei neuroni dopaminergici di individui affetti da morbo di Parkinson. Lo stress ossidativo contribuisce alla serie di eventi che porta alla morte neuronale: agisce in sinergia con altre disfunzioni, tra cui deficit mitocondriali e alterazioni del sistema UPS di degradazione delle proteine cellulari (McNaught K.S. and Olanow C.W., 2003).

Il metabolismo della dopamina è responsabile degli alti livelli di stress ossidativo della substantia nigra (Jenner P., 2003); infatti, la degradazione di questo neurotrasmettitore ad opera delle MAO produce perossido d'idrogeno (H₂O₂) dalla quale possono formarsi radicali idrossilici e anioni superossido altamente tossici in presenza di di ferro normalmente riscontrabile nella sostanza nera di Sömmering nella seguente reazione di Fenton:



e di Haber-Weiss:



Entrambe queste reazioni avvengono in presenza di metalli di transizione come il ferro libero non legato alla ferritina (Prasad K.N.et al.,1999). In condizioni patologiche il nitrossido contribuisce al distacco del ferro dalla ferritina aumentando la concentrazione di Fe libero nella cellula.

Questo processo non riguarda solamente i neuroni dopaminergici, ma ha luogo anche nelle cellule gliali che esprimono enzimi della classe delle monoamino ossidasi. E' stato anche dimostrato che l'attivazione di particolari cellule gliali, la microglia, durante i processi infiammatori porta alla morte dei neuroni dopaminergici a causa del

rilascio di specie reattive dell'azoto e dell'ossigeno altamente tossiche (Hunot S. and Hirsch E.C., 2003). Infine è importante sottolineare che lo stress ossidativo può contribuire al danneggiamento del meccanismo UPS di degradazione delle proteine avviando il processo di neurodegenerazione (McNaught K.S. and Olanow C.W., 2003). Altri metalli sono coinvolti nella malattia di parkinson fra i quali quelli di transizione come l'alluminio, il rame ed il manganese; soprattutto quest'ultimo, sembra essere coinvolto nell'eziopatogenesi professionale della malattia. Infatti ciò si è verificato in Cile dove minatori del manganese svilupparono la patologia in modo significativamente superiore rispetto alla popolazione di controllo. Il manganese, inoltre, determina un forte stress ossidativo capace di indurre l'auto-ossidazione dei catecoli tra cui L-DOPA e DA sia *in vitro* che *in vivo* (Serra P.A. et al., 2000; Migheli R. et al., 1999).

1.4. Le cellule staminali ed il morbo di Parkinson

Il trapianto di cellule staminali potrebbe rappresentare una prospettiva terapeutica per numerose patologia neurodegenerative e neuromuscolari al momento incurabili, che sono dovute ad eventi spesso geneticamente determinati. Tale ipotesi si basa sulla loro capacità di formare nuovo tessuto e sostituire quello danneggiato o

comunque fornire supporto trofico alle cellule danneggiate dalla malattia. Le staminali potrebbero rappresentare una sorgente cellulare per il morbo di Parkinson, traumi del midollo spinale e distrofie muscolari; malattie per le quali non è disponibile nessuna cura.

La degenerazione dei neuroni dopaminergici della *substantia nigra pars compacta*, ed il conseguente deficit della dopamina all'interno dello striato, si collocano alla base della malattia di Parkinson. La somministrazione per via sistemica dei precursori della dopamina, come la L-DOPA, non eliminano la causa della patologia ma apportano dei benefici momentanei rallentando i processi neurodegenerativi per cui possono essere considerati dei farmaci sintomatici (Redmond D.E et al., 2007). Tra le varie classi di farmaci, solamente gli inibitori della MAO B, quali la selegilina o i derivati della rasagilina, interverrebbero nel rallentamento della progressione della malattia in quanto contrasterebbero sia la formazione di ROS che la attivazione di pro-neurotossine (simili al MPTP) da parte delle MAO.

Oggi diversi gruppi di ricerca hanno la convinzione che la terapia cellulare possa dare un importante contributo nella lotta alle malattie neurodegenerative come già dimostrato in esperimenti condotti su roditori e primati da laboratorio; sono, infatti, apprezzabili

i risultati comportamentali e biochimici ottenuti in seguito al trapianto di neuroni dopaminergici fetali in animali da esperimento (Perlow M.J. et al., 1979; Björklund A. et Stenuvi E., 1979; Brundin P. et al., 1988; Redmond D.E. et al., 1986; Taylor J.R. et al., 1991; Bankiewicz K. et al., 1993). Si è ipotizzato, perciò, che oltre alla rinormalizzazione del tono dopaminergico (*target* delle vecchie terapie sostitutive basate su impianti di cellule dopaminergiche a livello striatale) possa esservi un ripristino funzionale della zona lesa (via nigro-striatale) (Redmond D.E et al., 2007). L'impianto di cellule staminali nel cervello dei primati parkinsoniani potrebbe essere di fondamentale importanza clinica perché, esse non solo sono capaci di secernere citochine, che consentono loro di svilupparsi ed adattarsi al nuovo ambiente, ma possono dare origine ai diversi tipi cellulari differenziati regolandone il numero e la locazione. Cellule staminali neurali umane (hNSC) sembrerebbero ideali per sostenere tale ipotesi. 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).

Recentemente è stato dimostrato che la “transplantation” di cellule staminali neurali adulte protegge il sistema nervoso centrale

anche in patologie neurodegenerative diverse dal morbo di Parkinson (Martino G. and Pluchino S., 2006). E' noto dalla letteratura scientifica che, in modelli animali con encefalomyelitis autoimmune sperimentale (EAE), cellule della SVZ si spostano lungo il midollo spinale per arrivare nelle aree demielinizzate dove si differenziano in cellule di tipo gliale per fornire supporto alla zona lesa (Brundin L. et al., 2003; Picard-Riera N. et al., 2002).

Sebbene le potenzialità delle cellule staminali neurali adulte trapiantate nel cervello di roditori e primati, affetti da patologie neurodegenerative, siano ampiamente riconosciute, ancora poco o niente si conosce circa il loro comportamento o reattività in un microambiente ostile. Poiché molte neuropatologie sono accompagnate da stress ossidativo, lavori recenti hanno voluto mettere in evidenza le proprietà antiossidanti delle aNSC. Infatti, in esperimenti condotti “*in vitro*”, staminali adulte sono state comparate con cellule immortalizzate (cellule neurali postmitotiche o PNC); le aNSC hanno dimostrato di possedere meccanismi di difesa e vigilanza antiossidante superiori alle PNC. Già nella fase di controllo, le staminali adulte hanno rivelato, rispetto alla linea immortalizzata, una minor quantità di ROS, derivati dal metabolismo mitocondriale, ed una marcata espressione di enzimi chiave antiossidanti come la glutathione

perossidasi (GP) e la *uncoupling protein 2* (UCP2). In seguito a trattamento con tossine mitocondriali, le cellule PCN hanno immediatamente presentato una scarsa attività mitocondriale ed un incremento della concentrazione di specie reattive dell'ossigeno deleterie per la coltura. Al contrario cellule aNSC hanno reagito prontamente sintetizzando una moltitudine di enzimi come la GP, la UCP e la superossido dismutasi 2 recuperando, così, all'iniziale condizione di deterioramento. Il recupero delle cellule staminali può essere bloccato, *in vitro*, solamente se viene inibito o danneggiato l'intero apparato enzimatico antiossidante.

Il gruppo di ricerca di Lalitha Madhavan ha, perciò, messo in evidenza nel 2006 tali differenze nei due sistemi redox. Dati "*in vivo*" hanno confermato e rinforzato le osservazioni sopra menzionate; infatti, cellule proliferanti della SVZ di topini C57BL/6 hanno biosintetizzato enzimi chiave del sistema antiossidante. In conclusione, il meccanismo "di vigilanza" antiossidante e neuroprotettivo potrebbe rappresentare una caratteristica innata delle cellule staminali adulte sfruttabile non solo nel morbo di Parkinson ma anche in molte altre patologia neurodegenerative (Madhavan L. et al., 2006).

1.5. Ruolo biologico dell'acido ascorbico

L'acido ascorbico (o anche vitamina C) è una molecola idrosolubile indispensabile per l'uomo e deve essere obbligatoriamente assunta con la dieta: infatti gli uomini, come anche altre specie animali, non sono più capaci di sintetizzarlo autonomamente, per l'assenza di un enzima chiave nella sua biosintesi, la L-gulonogamma-lattone ossidasi (Hediger M.A., 2002). La vitamina C, ha un ruolo centrale nella formazione del collagene (Hediger M.A., 2002) ed una sua carenza, provocata generalmente da errate abitudini alimentari, è causa di molte dermopatie. Oltre a ciò, la vitamina C svolge altre funzioni nell'organismo, risultando essenziale in molte attività enzimatiche e processi fisiologici (Tolbert B., 1985). E' noto anche il coinvolgimento dell'acido ascorbico nell'assorbimento del ferro. Alcuni dei suoi effetti fisiologici rimangono poco conosciuti, ma alterazioni nel suo metabolismo sono responsabili di molte malattie. Dati di laboratorio sembrerebbero indicare come ruolo principale dell'acido ascorbico quello di antiossidante, inibendo, per esempio, la perossidazione lipidica (Niki E. et al., 1984; Leung H. W. et al., 1981), mantenendo gli ioni ferro e rame nella forma ridotta di alcuni enzimi (Tsukaguchi H. et al., 1999) e neutralizzando l'azione di pericolose sostanze ossidanti. E' giusto considerare l'acido ascorbico

come uno degli agenti antiossidanti più potenti (Kim E.J. et al., 2007), capace d'interrompere l'azione nociva di molti radicali liberi (Tsukaguchi H. et al., 1999). Si pensa infatti che il danno provocato dai radicali dell'ossigeno sia uno dei fattori che maggiormente contribuisca all'invecchiamento dei tessuti ed allo sviluppo di molti processi degenerativi, compreso il cancro (Harman D., 1981; Halliwell B. and Gutteridge J.M.C., 1990). L'acido ascorbico sembrerebbe svolgere un duplice ruolo protettivo in condizioni di stress ossidativo: riduce i gruppi ossidati dei centri prostetici degli enzimi e rimuove gli stessi agenti ossidanti, o specie radicaliche, dal microambiente. L'acido ascorbico è necessario per la protezione dei componenti cellulari in ambiente acquoso, mentre i carotenoidi, la vitamina A ed E esplicano tale azione in un ambiente non acquoso. La vitamina C è fondamentale per la biosintesi della carnitina e per l'attività della tirosina idrossilasi, enzima chiave nella biosintesi delle catecolamine (Hediger M.A., 2002); risulta determinante nel mantenere costante la concentrazione cellulare della vitamina E, riciclandola dalla forma ossidata a quella ridotta (McCay P.B., 1985). Altro importante ruolo dell'acido ascorbico è quello di essere essenziale, *in vitro*, nella formazione dei neuroni dopaminergici (Yan J. et al., 2001).

L'assorbimento dell'acido ascorbico nell'organismo avviene per mezzo dei trasportatori della vitamina C sodio-dipendenti (SVCT1 ed SVCT2). Il trasportatore SVCT1 si trova negli epitelii dell'intestino e del rene mentre SVCT2 viene espresso, in misura maggiore, nei neuroni, nel sistema endocrino e nelle ossa (Hediger M.A, 2002). In topini *knockout*, per il trasportatore SVCT2, sono stati riscontrati alla nascita gravissimi danni all'apparato respiratorio ed abbondanti emorragie cerebrali. La concentrazione plasmatica di tale molecola è tra 10 e 160 μM ; l'eccesso viene eliminato tramite i reni. La concentrazione dell'acido ascorbico risulta essere molto più alta, circa cento volte, in altri organi e tessuti come il timo, il corpo luteo, la retina ed il sistema nervoso (in modo particolare all'interno neuroni). L'acido ascorbico viene assorbito dalle SVCT1 delle cellule epiteliali intestinali attraverso un meccanismo tuttavia sconosciuto (Miele M. et al., 1994; Wilson J.X. et al., 2000). Il trasporto attivo della vitamina C, attraverso la SVCT2, permette la distribuzione di tale molecola negli organi e nelle cellule che la richiedono. Le SVCT2 mediano anche il trasporto nel plesso corioideo, l'epitelio che separa il sangue dal tessuto nervoso, liberando l'acido ascorbico nel liquido cerebro-spinale (Tsukaguchi H. et al., 1999; Spector R., 1977). Anche il trasporto all'interno dei neuroni è mediato dalle SVCT2. Le cellule

gliali, che supportano i neuroni, mancano dei trasportatori SVCT1 e SVCT2 ma esprimono il trasportatore dell'acido deidroascorbico GLUT1 (noto anche come trasportatore del glucosio) (**Figura 9**). La concentrazione extracellulare della vitamina C può essere modulata attraverso il *release* del neurotrasmettitore glutammato, molto probabilmente con un scambio acido ascorbico-glutammato effettuato da GLUT (Miele M. et al., 1994; Rice M.E., 2000).

La vitamina C viene chiaramente riciclata nei neuroni per ostacolare il danno prodotto dalle specie reattive dell'ossigeno. Il metabolismo ossidativo presente nei neuroni è elevato quindi è indispensabile l'ausilio offerto dagli astrociti nel rigenerare l'acido ascorbico dal deidroascorbato (Wilson J.X., 1997). La vitamina C prende parte a molte reazioni enzimatiche e funge da *scavenger* contro i radicali liberi; il risultato è la formazione del deidroascorbato, il quale prontamente esce dai neuroni attraverso il GLUT3 per entrare nell'astrocita via GLUT1 (**Figura 9**).

All'interno dell'astrocita il deidroascorbato viene ridotto ad acido ascorbico e rilasciato per essere immediatamente captato dai neuroni per mezzo delle SVCT2. Tale ciclo spiega la dominante presenza della vitamina C all'interno dei neuroni (Rice M.E., 2000).

Le alte concentrazioni di acido ascorbico e l'elevata espressione del

trasportatore SVCT2, osservate nel cervello fetale, suggeriscono il ruolo protettivo della vitamina C durante le diverse fasi dello sviluppo (Castro M. et al., 2001).

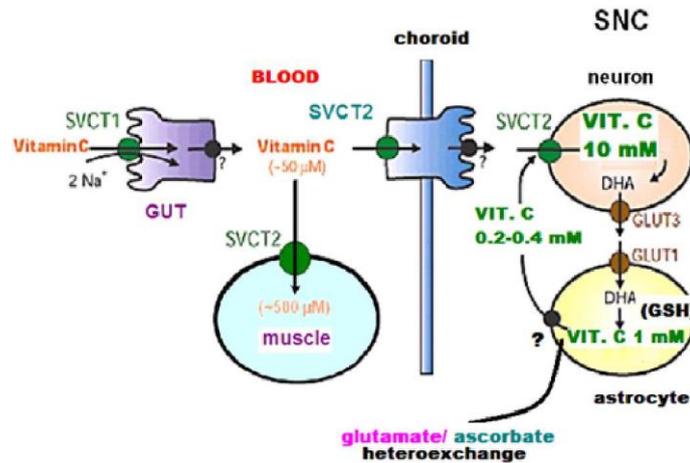


Figura 9. Ciclo dell'acido ascorbico

In conclusione, si può affermare che alte concentrazioni di acido ascorbico potrebbero rappresentare un adattamento per prevenire danni cellulari o tissutali causati da un elevato metabolismo ossidativo (Hediger M:A., 2002).

2. SCOPO DELLA RICERCA

Le cellule staminali utilizzate per i nostri esperimenti potrebbero rappresentare un'alternativa o una valida integrazione alla terapia farmacologica della malattia di Parkinson. Obiettivo della nostra ricerca è stato quello di dimostrare che:

- I. La dopamina e la L-Dopa, in accordo con altri studi *in vitro*, inducono un aumento della *viability* delle aNSC.
- II. L'associazione AA+L-Dopa+DA, *in vitro*, riduce l'effetto tossico del Mn, dell'MPTP e dell'MPP⁺ sulle aNSC.
- III. Le staminali neurali adulte, *in vitro*, sono in grado di captare, ridurre e secernere l'acido ascorbico e di proteggere la L-Dopa e la dopamina dall'auto-ossidazione.

3. MATERIALI E METODI

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

Le cellule staminali neurali adulte (aNSC) sono 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 vengono stabulati in gabbie in condizioni standard di luce e buio (luce dalle 7.00 a.m. alle 7.00 p.m.), temperatura 19-22 °C, 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

Dal cervello degli animali decapitati si preleva integralmente la zona subventricolare. La SVZ viene sminuzzata con forbicine e immersa nel buffer di digestione (vedi paragrafo **3.6**) per 30 minuti a 37°C. Il tessuto digerito viene centrifugato (1100 r.p.m. per 12 minuti) e lavato due volte nel medium complete plus (vedi paragrafo **3.3**); dopo aver dissociato meccanicamente il pellet, le cellule sono trasferite in piastre p25 contenenti il medium complete plus ed

incubate a 37°C in atmosfera umidificata (95% aria / 5% CO₂) per 10-15 giorni fino alla stabilizzazione della coltura.

3.3 Colture cellulari staminali

Nel corso dell'attività sperimentale, sono state utilizzate cellule staminali neurali adulte provenienti dalla zona subventricolare di topi C57BL/6. Le cellule piastrate ad una densità di 70000 cell./mL vengono divise ogni 4 giorni, coltivate nel medium complete plus e mantenute a 37°C in atmosfera umidificata (95% aria / 5% CO₂).

3.4 Microscopia

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).

3.5 Composizione del medium complete plus

Le aNSC sono 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), 5mL di penicillina/streptomina (P/S), 5 mL di L-

glutamina 200 mM (Invitrogen, Italia), 10 mL di glucosio al 30%, 7.5 mL di NaHCO₃ al 7.5%, 2.5 mL di hepes 1M, 1 mL di eparina 0.2% (Sigma Aldrich, Italia), 50 µL del fattore di crescita fibroblastico (FGF-2) 10 ng/mL, 50µL del fattore di crescita epidermico (EGF) 20 ng/mL (Listarfish, Italia) e 50 mL di ormone mix 10x (per composizione vedi paragrafo **3.5.1**).

3.5.1 Composizione dell' ormone mix

L' ormone mix è composto da 40mL di DMEM/F-12 10X (Invitrogen, Italia), 8 mL di glucosio al 30%, 6 mL di NaHCO₃ al 7.5%, 2 mL di hepes 1M, 400 mg di apo-transferrina, 100 mg di insulina (da sciogliere in 4mL di HCl 0.1N portando, infine, a volume con 36 mL di H₂O apirogena), 38.6 mg di putrescina (da sciogliere in 40 mL di H₂O apirogena), 40µL di progesterone 2mM, 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.

3.6 Composizione del buffer di digestione

Il buffer viene preparato con 25 mL di Earle's Balanced Salt solution (EBSS)(Gibco, Italia) nel quale sono 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 deve essere filtrata e non può essere conservata.

3.7 Vitalità cellulare

La vitalità delle colture, sottoposte a trattamenti farmacologici, viene 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), metabolizzano il sale di tetrazolio in cristalli di blu formazano (insolubili in soluzione acquosa); le cellule vengono lavate per due volte con un tampone fosfato salino (PBS), centrifugate, a 4000 r.p.m per 15 minuti e risospese in 2 mL di isopropanolo per sciogliere i cristalli di blu formazano; si effettua un'ultima centrifugata a 4000 r.p.m. per 5 minuti, si preleva il surnatante e si legge l'assorbanza a 580 nm con il lettore di micropiastre (Bauty diagnostic microplate reader).

3.8 Analisi neurochimica

Le sostanze, da noi studiate, sono 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: 3 μ m) (Alltech, USA) ed un rivelatore elettrochimico BAS (mod. LC4B).

La fase mobile utilizzata per gli esperimenti è composta da KH_2PO_4 (2.1 g/L), K_2HPO_4 (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.

3.9. Sostanze chimiche utilizzate per gli esperimenti

Per la realizzazione di questa tesi sono state utilizzate le seguenti molecole: L-dihydroxyphenyl-alanina (L-DOPA), dopamina (DA), acido ascorbico (AA), acido deidroascorbico (DHAA), phloretin, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP), 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP^+) (acquistate dalla Sigma, Italia), GBR 12783 HCl (TOCRIS bioscience), cloruro di manganese (MnCl_2) (MERCK Darmstadt, Germany).

4. RISULTATI

Il modello *in vitro*, da noi utilizzato, è costituito neurosfere composte da cellule staminali neurali provenienti dalla zona subventricolare (SVZ) di topi C57BL/6. Le colture sono state esposte al trattamento con diversi farmaci per valutare *viability* e comportamento neurochimico.

4.1 Aumento dell'attività mitocondriale indotto da L-Dopa e Dopamina

Nella **figura 10** è rappresentato l'aumento della *viability* (attività mitocondriale) mediante il saggio MTT, indotto dalla dopamina e dalla L-DOPA (10, 25 e 50 μ M) nell'arco delle 24 ore.

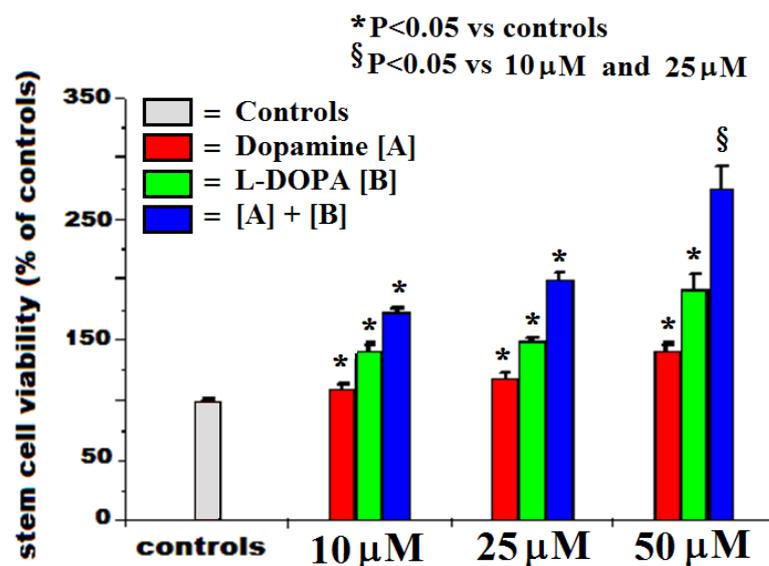


Figura 10

Addizionate singolarmente, DA e L-DOPA, determinano un aumento significativo, dose dipendente, nella produzione di cristalli di blu formazano rispetto alle cellule di controllo ($p < 0.05$). L'associazione L-DOPA+DA potenzia tali effetti sulla *viability* delle neurosfere ($p < 0.05$), mantenendo la dose-dipendenza (**figura 10**).

4.2 Potenziamiento dell'attività mitocondriale indotto da L-Dopa e Acido Ascorbico

L'esposizione delle neurosfere ad una soluzione di acido ascorbico (AA) 100 μ M aumenta significativamente l'attività mitocondriale di circa il 10% ($p < 0.05$), rispetto alla condizione di controllo (**Fig. 11**).

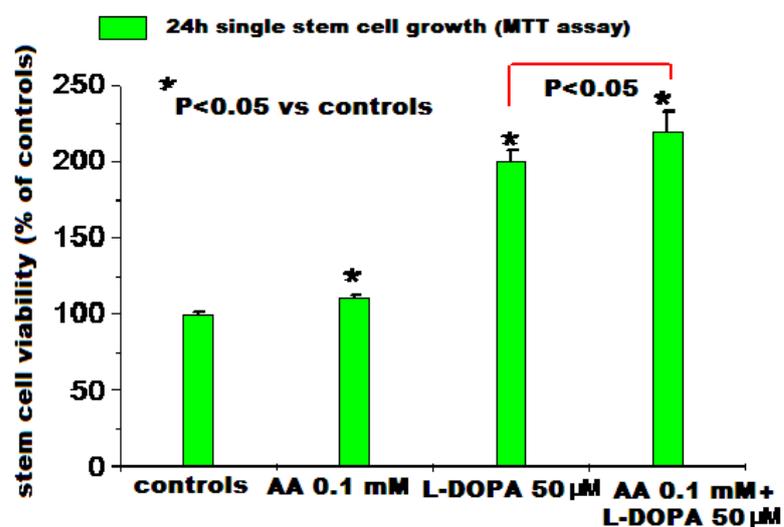


Figura 11

Si è già visto, in **figura 10**, come la L-Dopa possa aumentare in modo significativo l'attività mitocondriale. Infatti la sua associazione con AA (100 μ M) incrementa significativamente la *viability* delle neurosfere (+125% rispetto al controllo e +25% rispetto alla sola L-Dopa) ($p < 0.05$) (**Fig.11**).

4.3 Tossicità indotta da Manganese e protezione sinergica dell'acido ascorbico e della L-Dopa

Come già osservato su altre linee cellulari (Migheli R. et al., 1999) l'esposizione delle neurosfere a concentrazioni elevate di manganese (0.2 mM) determina una riduzione significativa della *viability* alle 24 h (meno del 40% di cellule vitali rispetto al controllo) ($p < 0.05$).

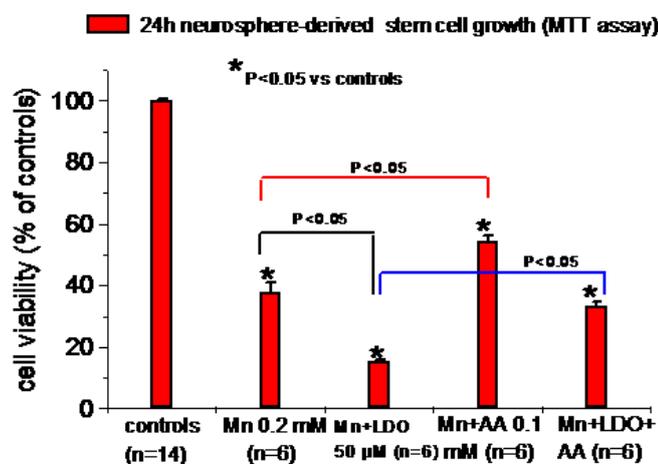


Figura 12

L'associazione L-Dopa (50 μ M) + Mn (0.2 mM) determina un significativo incremento della mortalità (15% di cellule staminali vitali rispetto al controllo ed un ulteriore abbattimento del 25% rispetto al solo trattamento con Mn) ($p < 0.05$) (**Fig 12**).

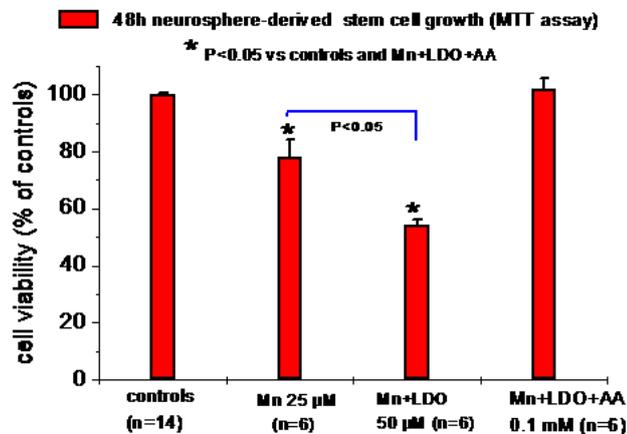


Figura 13

Quando alle piastre di coltura, trattate con Mn (0.2 mM), viene addizionato AA (0.1 mM) i valori iniziali della viability, equivalenti alle colture di controllo, non vengono raggiunti; comunque in presenza di AA, si ha il 20% in più di cellule vitali rispetto al solo trattamento con Mn ($p < 0.05$) (**Fig. 12**). L'acido ascorbico, somministrato al medium di coltura contenente L-Dopa+Mn, induce un aumento significativo della vitalità delle cellule staminali del 20% in più rispetto al solo trattamento L-Dopa + Mn ($p < 0.05$) (**Fig. 12**).

Preso atto dell' azione tossica del Mn 0.2 mM si è deciso di utilizzare una concentrazione inferiore di Mn ma si è prolungato il tempo di esposizione a 48h. I trattamenti sono stati quindi eseguiti con Mn 25µM ottenendo una riduzione della *viability* delle neurosfere del 20% rispetto alla condizione di controllo ($p<0.05$) (**Fig. 13**); l'associazione L-Dopa+Mn ha ulteriormente ridotto, in modo significativo, la vitalità cellulare del 30% rispetto al solo trattamento con Mn 25µM (-50% rispetto al controllo) ($p<0.05$) (**Fig. 13**).

L'effetto dell'AA sulla *viability* delle neurosfere contemporaneamente esposte all'associazione L-Dopa (50 µM) + Mn (25 µM) è stato quello di incrementare la vitalità cellulare riportandola ai valori di controllo (100% cellule vitali) (**Fig. 13**). L'acido ascorbico ha quindi portato ad un aumento significativo nella *viability* rispetto al solo trattamento L-Dopa+Mn ($p<0.05$) (**Fig. 13**).

4.4 Tossicità indotta da MPTP ed MPP⁺ sulle aNSC

La vitalità cellulare è stata valutata, inoltre, dopo trattamento con MPTP ed MPP⁺ per 24 e 48h (**Fig.14-15**).

L'MPTP 0.5 mM non sembra incidere sull'attività mitocondriale, anzi, si può notare un lieve ma non significativo aumento della *viability* pari al 5% (**Fig.14**); dopo 48h, però, si ha una riduzione

significativa nel numero di cellule pari al 20% ($p < 0.05$) rispetto al controllo (**Fig.15**).

L'MPTP 2 mM, a 24h, riduce drasticamente la *viability* dell' 80% ($p < 0.05$ vs control) (**Fig.14**). Inoltre, l'effetto dell'MPTP 2mM è significativamente più marcato ($p < 0.05$) rispetto all'MPP⁺ (il 40% di cellule in meno rispetto all' MPP⁺ 0.5 mM ed il 10% di cellule in meno rispetto all' MPP⁺ 2mM) (**Fig.14**).

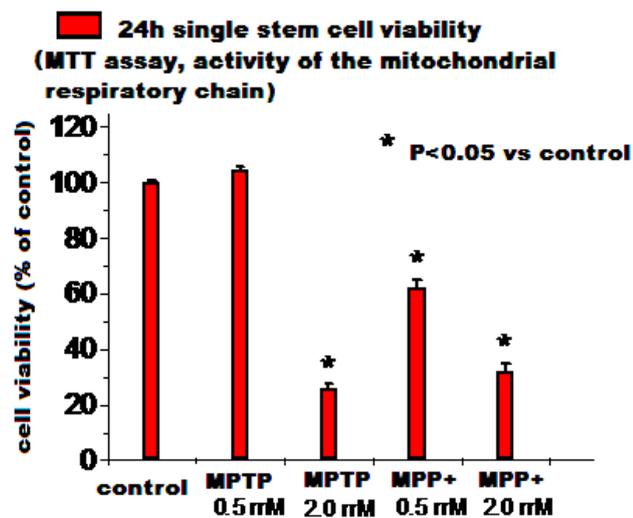


Figura 14

Dopo 24h di trattamento con MPP⁺, 0.5mM e 2mM, si evidenzia una mortalità significativa del 30% ($p < 0.05$ vs control) e del 65% circa ($p < 0.05$ vs control) (**Fig.14**).

Dopo 48h di esposizione l'MPP⁺ (0.5, 1 e 2 mM) riduce visibilmente la *viability* del 65, 70 e 75 % (p<0.05 vs control) mentre l'MPTP 1 e 2 mM rispettivamente del 50 e 75% (p<0.05 vs control) (**Fig.15**).

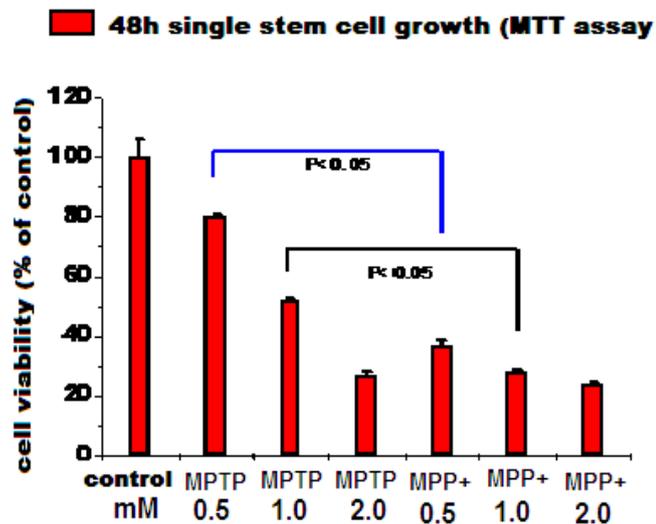


Figura 15

In pratica l'MPP⁺ 0.5 mM riduce ulteriormente del 40% la *viability* rispetto all' MPTP 0.5 mM (p<0.05) così come L'MPP⁺ 1 mM si rivela più tossico dell' MPTP 1mM del 20% circa (p<0.05) (**Fig.15**).

4.5 Trattamento delle staminali neurali adulte con l'inibitore del DAT

Come già discusso nel **paragrafo 4.4** il trattamento con MPTP ed MPP⁺ riduce drasticamente la *viability* cellulare (vedi anche la **fig.14-15**).

L'inibitore del DAT (GBR 12783 HCl) non fornisce alcuna protezione alla coltura dopo il trattamento con MPTP ed MPP⁺ (Fig.16).

Effect of DAT inhibitor GBR 12783.HCl on MPTP- and MPP⁺-induced decreases in stem cell viability (24h single stem cell growth, MTT assay)

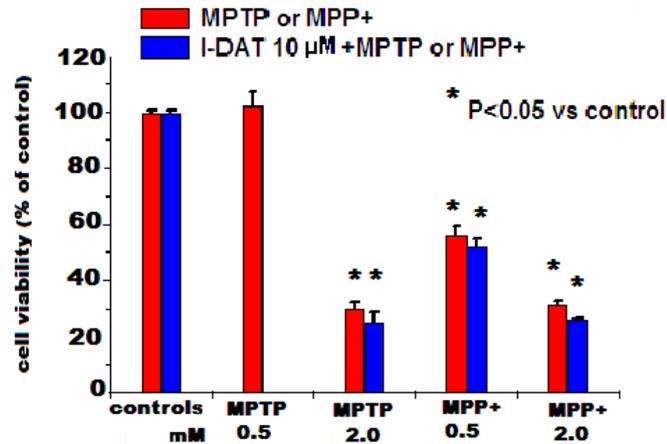


Figura 16

Si consideri che l'inibitore del DAT è stato aggiunto al terreno di coltura 30' prima del trattamento con MPTP ed MPP⁺ per favorire l'interazione fra il GBR 12783 HCl e le cellule stesse; queste, quando pretrattate con GBR 12783 HCl, se provviste del DAT, avrebbero dovuto bloccare, o attenuare, la tossicità mitocondriale dell' MPP⁺.

4.6 L-Dopa, Dopamina ed Acido Ascorbico aumentano la viability

nel trattamento con MPTP ed MPP⁺

Nei nostri esperimenti è stata considerata anche la combinazione fra MPTP (2mM), MPP⁺ (0.5 e 2 mM), DA (50µM) ed acido ascorbico (0.1 mM) (Fig.17).

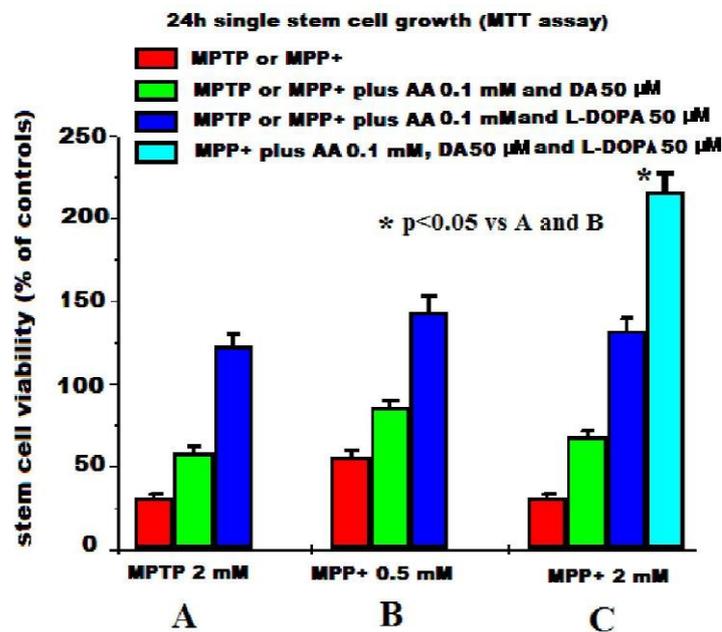


Figura 17

Come già visto in precedenza, i trattamenti con l'MPTP (2mM) e MPP⁺(0.5 e 2 mM) determinano una riduzione drammatica nella *viability* delle aNSC (Fig.14); si voluto, allora, aggiungere acido ascorbico (0.1mM) e DA (50µM) nelle piastre trattate con MPTP (2mM) ottenendo una riduzione della mortalità del 25% rispetto al solo trattamento con MPTP (2mM) (Fig.17).

Lo stesso esperimento è stato eseguito sostituendo la DA con L-Dopa 50 μ M ottenendo un ulteriore aumento della *viability*, rispetto al DA+MPTP+AA precedentemente descritto, pari al 25% in più rispetto al controllo (**Fig.17**).

Il solo trattamento con MPP⁺ 0.5mM riduce la *viability* cellulare del 50% circa; ancora una volta, l'associazione con acido ascorbico (0.1mM) e DA (50 μ M) incrementa la *viability* del 30% rispetto al solo trattamento con MPP⁺ (**Fig.17**).

L'effetto tossico dell'MPP⁺ viene contrastato dall'associazione L-Dopa (50 μ M) + acido ascorbico (0.1 mM); l'attività mitocondriale della coltura staminale viene rafforzata passando da una mortalità del 50% ad una *viability* del 150% rispetto al controllo (**Fig.17**).

Infine, il sinergismo L-Dopa+DA+AA porta la *viability* della coltura staminale al 200% contrastando così l'effetto deleterio dell'MPP⁺ 2mM ed inducendo un significativo aumento anche rispetto al gruppo di controllo (**Fig.17**).

4.7 Effetto dell'Acido Ascorbico e del deidroascorbato sulla *viability* delle cellule staminali

Le staminali adulte provenienti dalla SVZ incrementano, in modo significativo, la loro *viability* del 10% circa, dopo aver addizionato al

medium di coltura acido ascorbico 0.1 mM ($p < 0.05$ vs control) o deidroascorbato 0.2 mM ($p < 0.05$ vs control) come illustrato in **figura 18**.

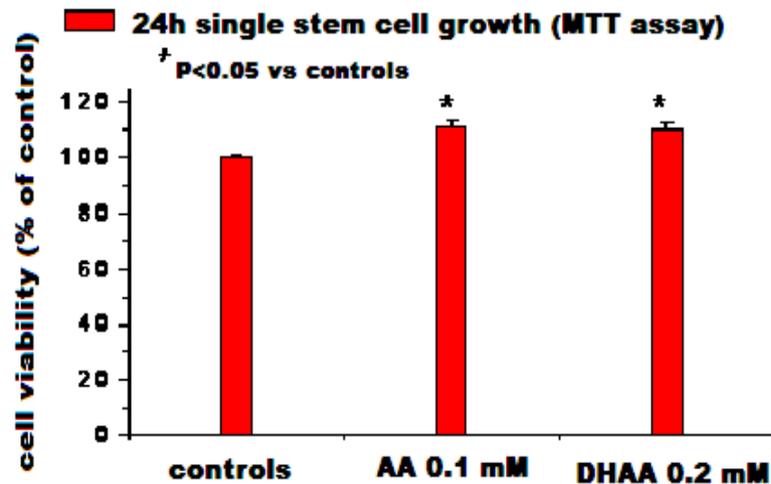


Figura 18

4.8 Acido Ascorbico intracellulare

L'analisi neurochimica, eseguita sulle aNSC con la cromatografia liquida ad alte prestazioni, rivela che l'acido ascorbico 50 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 2.25 μ g/mg di proteine (**Fig.19**).

Utilizzando un inibitore specifico per le SVCT1 e SVCT2, la *phloretin* 100 μ M aggiunta 30' minuti prima della somministrazione di AA al medium di coltura, viene bloccato in modo significativo ($P < 0.05$) l'ingresso dell'acido ascorbico nel compartimento intracellulare a 30' dall'inizio dell'esperimento (**Fig.19**).

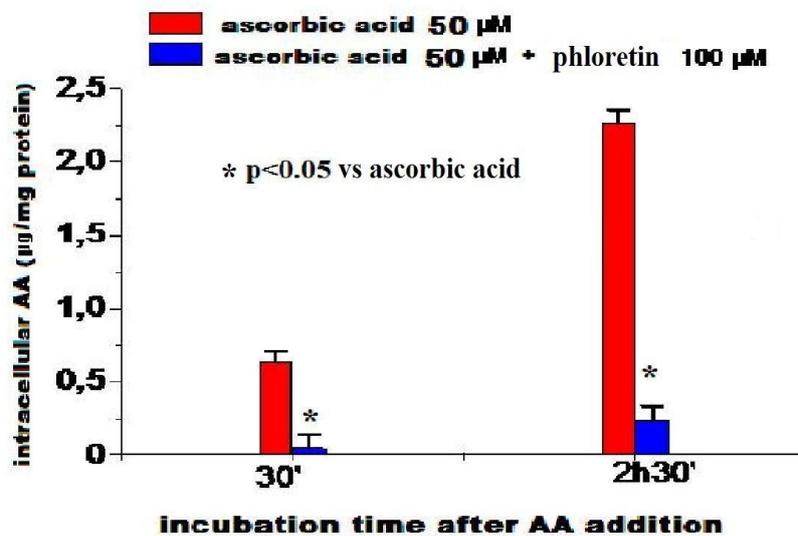


Figura 19

Dopo 2h e 30' si trovano, all'interno delle cellule, 0.25 μ g di acido ascorbico per milligrammo di proteine, 9 volte inferiore rispetto alle neurosfere non trattate con *phloretin* (**Fig.19**).

4.9. Presenza dell'acido ascorbico nel medium e all'interno delle cellule dopo trattamento con DHAA

Incubando le staminali con deidroascorbato (8mM), per 30', sono stati misurati circa 140 ng di AA per 5mL di medium. Dopo 2h e 30 min. 350 ng/5mL nel terreno di coltura (**Fig.20**).

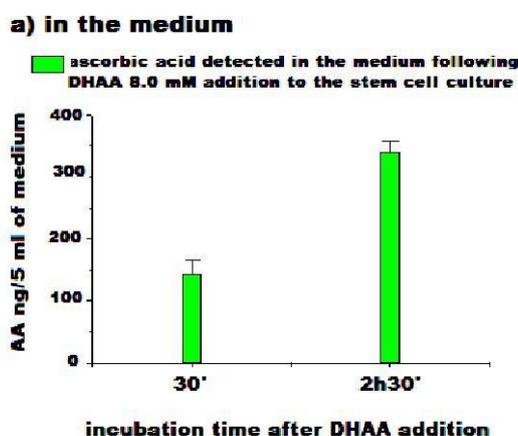


Figura 20

E' stata valutata anche la presenza di acido ascorbico intracellulare dopo il trattamento con DHAA (8mM) (**Fig.21**).

I risultati dimostrano che circa 60 ng di AA per milligrammo di proteine sono presenti dentro le cellule dopo 30 minuti di trattamento (**Fig.21**).

Sempre in **figura 21**, si può notare che la concentrazione di acido ascorbico dopo 2h e 30 minuti di trattamento, con DHAA 8 mM, aumenta dentro le cellule fino a 100 µg/mg di proteine (+ 40% di acido ascorbico intracellulare rispetto ai primi 30' di trattamento).

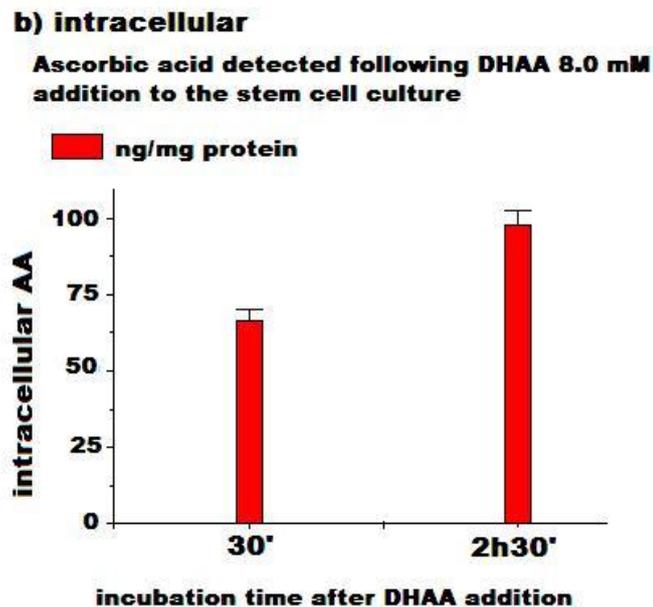


Figura 21

4.10. Auto-ossidazione di AA, L-DOPA e DA in presenza o meno di aNSCs

L'acido ascorbico (100µM), la L-Dopa (50 µM) e la dopamina (50 µM), sono state addizionate al medium di coltura (*complete plus*) in presenza o meno di cellule staminali, onde valutare comparativamente

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 (n=3) 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 essere analizzati.

Nella **figura 22** 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 avviene in modo estremamente rapido, a 30' dall'inizio dell'esperimento, con una riduzione del 40% rispetto alla concentrazione iniziale di AA; tale fenomeno risulta essere estremamente rallentato in presenza delle cellule staminali con una concentrazione di AA pari a al 90% di quella iniziale.

Dopo 8h di trattamento l'acido ascorbico si ritrova in forma ridotta solo nelle *plate* contenenti cellule staminali (31 μM) ($p < 0.05$ vs medium [A]).

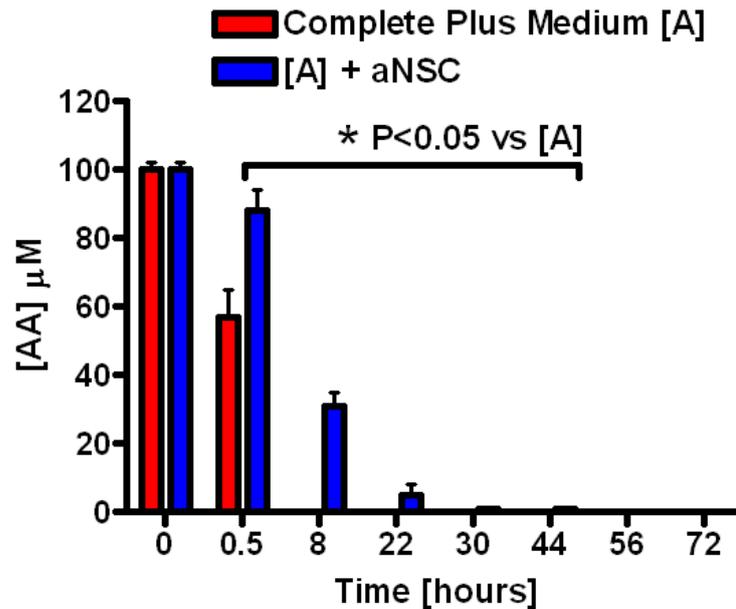


Figura 22

A due giorni dal trattamento (30h) si rilevano ancora quantità significative di acido ascorbico (1 μM) in presenza di cellule staminali ($p < 0.05$ vs medium). Alle 72 ore l'acido ascorbico va incontro a completa auto-ossidazione e non è più quantificabile all'interno delle due piastre con e senza neurosfere (**Fig.22**).

Nella **figura 23** 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).

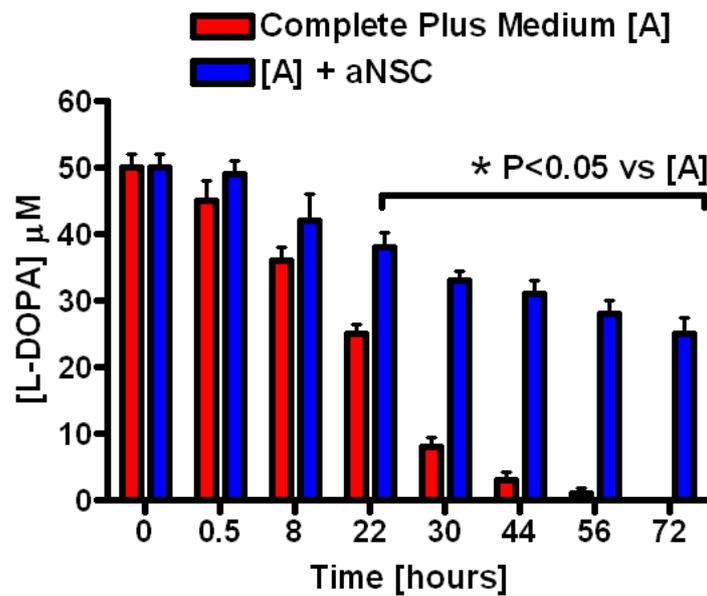


Figura 23

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 ora si può evidenziare un calo drastico nella concentrazione di L-Dopa; dopo 56h di trattamento, la sua concentrazione non è più apprezzabile rispetto al medium contenente anche le cellule staminali.

Osservando il grafico (**fig.23**), 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]).

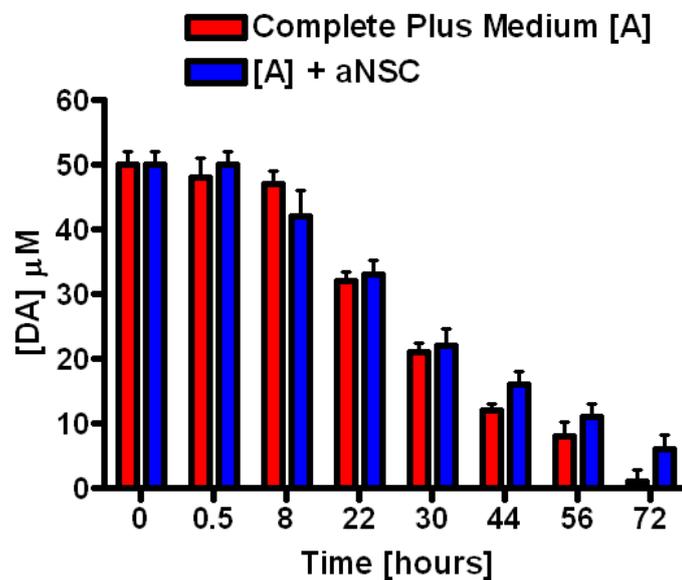


Figura 24

Nella **figura 24** sono riportate le concentrazioni di dopamina per ogni prelievo effettuato in 72h di trattamento. Si osserva un calo lineare della DA, dopo 8h di esperimento, sia nelle *flask* contenenti cellule staminali, sia in quella che ne sono prive. Dopo 72h è comunque apprezzabile, rispetto alle piastre con solo medium [A], la quantità di DA presente nel medium contenente le cellule staminali pari a 6 μM.

5. DISCUSSIONE

Le cellule staminali utilizzate negli esperimenti potrebbero rappresentare un'alternativa o una valida integrazione alla terapia farmacologica della malattia di Parkinson.

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

Le cellule staminali della SVZ possiedono infatti i recettori dopaminergici D1L e D2L: in particolare le cellule di tipo A possiedono quelli di tipo D1L nella membrana plasmatica mentre quelle di tipo C lo nel citoplasma; il recettore D2L si trova invece sia nella membrana plasmatica che nel citoplasma delle cellule di tipo C. Questo recettore viene espresso in misura minore nella membrana plasmatica delle cellule di tipo A (Höglinger G.U et al., 2004). La dopamina proveniente dalla *substantia nigra pars compacta* influirebbe sulla proliferazione delle cellule della SVZ interagendo con il recettore D2L. La formazione di nuovi neuroni sembrerebbe però essere compromessa, nel Parkinson sporadico, dalla drastica riduzione della dopamina (Höglinger G.U et al., 2004). Nei primati, la degenerazione dei neuroni dopaminergici, indotta dalla neurotossina

MPTP, compromette la proliferazione delle aNSC (Freundlieb N. et al., 2006). La proliferazione delle cellule può essere recuperata utilizzando agonisti per il recettore D2. Le nostre ricerche, in accordo con altri studi (Höglinger G.U et al., 2004), indicano che *in vitro* la dopamina induce un aumento della *viability delle* neurosfere adulte mantenute in coltura. Si è osservato che, staminali umane trapiantate in primati affetti da Parkinson chimico indotto con MPTP, determinano un miglioramento comportamentale. E' noto infatti che la neurotossina possa interferire con il complesso I del mitocondrio favorendo la formazione dei ROS e determinando una drastica riduzione di ATP; tutto ciò compromette la funzionalità della *substantia nigra pars compacta* che va incontro a neurodegenerazione. Il meccanismo di morte, proposto nel Parkinson indotto dall'MPTP, dovrebbe essere quello apoptotico. Ciò è stato osservato in colture neuronali (Dipasquale B. et al., 1991), in cellule PC12 (Hartley A., 1994) ed in co-culture dello striato e del mesencefalo ventrale di ratto (Mochizuki H. et al., 1994). In più, la formazione di specie reattive dell'ossigeno determina l'auto-ossidazione della dopamina che, a sua volta, indirizza le cellule neuronali verso la morte cellulare programmata (Ziv I et al., 1994). Anche il Mn potrebbe stimolare l'autossidazione della dopamina nei

neuroni dopaminergici, incrementando la produzione dei ROS e di chinoni (Graham D.G., 1984). Si crede che lo stress ossidativo sia la causa principale della morte neuronale (Desole M.S. et al., 1995; Spina M.B. and Cohen G., 1989; Sun A.Y. et al., 1989) e che il manganese, come d'altronde l'MPTP, orienta le cellule PC12 e le colture neuronali verso l'apoptosi (Desole M.S. et al., 1997).

Sono state proposte molteplici interazioni fra le NSC esogene ed l'ambiente patologico ospite. 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). Inoltre, cellule staminali neurali forniscono neuroprotezione in modelli animali con danno da ischemia/riperfusionazione cambiando le condizioni del microambiente leso (Capone C. et al., 2007). Così uno dei *target* della terapia con cellule staminali potrebbe essere l'omeostasi ossidativa nel compartimento extracellulare nigro-striatale.

Al momento, la L-Dopa rimane il farmaco di elezione nella terapia sintomatica del morbo di Parkinson. La L-Dopa e la dopamina, composti che contengono il gruppo catecolo, spesso vanno incontro ad auto-ossidazione *in vivo* nel compartimento extracellulare (Serra P.A.

et al., 2000) con la conseguente formazione dei derivati chinonici e dell'anione superossido. L' autossidazione della L-Dopa e della Dopamina può essere incrementata, in tali compartimenti, per la presenza dei metalli di transizione come il ferro (Fe) e manganese (Mn) (Serra P.A et al., 2000). Inoltre, la Dopamina e la L-Dopa inducono apoptosi in diverse linee cellulari comprese le cellule staminali (Liu W.G. et al., 2004).

Questi dati potrebbero essere pertinenti con l'omeostasi ossidativa nell'ambiente extracellulare nigrostriatale; infatti, il metabolismo anomalo dei metalli di transizione genera ROS o specie radicaliche avviando il meccanismo patogenetico della morte neuronale nel morbo di Parkinson (Gerlach M. et al., 2006). I nostri dati mostrano l'effetto inibitorio sulla *viability* esercitato dal Mn o dalla sua associazione con la L-Dopa *in vitro*, mentre l'effetto antagonista dell'acido ascorbico ristabilisce le condizioni iniziali della coltura staminale (**fig.12-13**). Anche l'MPTP e l'MPP⁺ riducono drasticamente la vitalità cellulare delle cellule staminali. Il completo recupero delle cellule si ottiene quando al medium di coltura viene addizionata una miscela composta da L-Dopa+DA+AA (**fig.17**); queste tre molecole risultano essere fondamentali nel compartimento extracellulare nigrostriatale. Perciò la DA e l'AA, accoppiate con la

somministrazione esogena di L-Dopa, potrebbero fornire aiuto alle cellule staminali nella terapia del Parkinson.

Nel cervello i neuroni contengono concentrazioni elevate di vitamina C (10 mM); questa viene immagazzinata dai neuroni attraverso le SVCT2 (Hediger M.A, 2002). Poiché le cellule staminali neurali adulte generano nuovi neuroni è lecito pensare che possano avere il trasportatore per l'acido ascorbico SVCT2 ed accumularlo al loro interno. Nei nostri esperimenti la *viability* delle cellule staminali è stata valutata attraverso il saggio MTT mentre la concentrazione cellulare ed extracellulare di acido ascorbico è stata analizzata con l'HPLC. L'acido ascorbico addizionato nelle piastre di coltura ha determinato un significativo aumento della proliferazione cellulare (**Fig. 11**). Inoltre abbiamo dimostrato che le cellule staminali sono in grado di immagazzinarlo e quando viene utilizzata la *phloretin*, un inibitore specifico per il trasportatore dell'AA, la sua presenza, all'interno delle aNSC, è praticamente nulla (**Fig.19**). All'interno degli astrociti il deidroascorbato viene ridotto ad acido ascorbico e rilasciato per essere immediatamente captato dai neuroni per mezzo delle SVCT2. Tale ciclo spiega la dominante presenza della vitamina C all'interno dei neuroni (Rice M.E., 2000). Abbiamo quindi considerato di aggiungere al medium di coltura “completo plus” il DHAA; il suo effetto è stato

quello di incrementare significativamente la *viability* cellulare (**Fig.18**). Analisi cromatografiche hanno dimostrato una progressiva diminuzione nel tempo della concentrazione di DHAA nel medium di coltura; inoltre, all'interno delle cellule non è stata riscontrata la presenza di DHAA. Al contrario, aspetto importantissimo questo, è stato possibile quantificare in modo progressivo la presenza dell'acido ascorbico sia dentro le cellule che nel medium di coltura (**Fig. 20-21**). Risultato chiave del presente studio, è stato quello di dimostrare che le cellule staminali neurali adulte, utilizzate da noi in laboratorio, sono capaci di ridurre il DHAA ad AA e rilasciarlo negli spazi extracellulari. Tale caratteristica le rende di estremo interesse per il loro potenziale ruolo neuroprotettivo aspecifico se impiantate in modelli animali di Parkinson chimico. Infatti le aNSC possiedono meccanismi di difesa e vigilanza antiossidante superiori ad altri tipi cellulari *in vitro* come già dimostrato in studi preliminari (Madhavan L. et al., 2006). Si è dimostrato che le neurosfere possono neutralizzare i ROS in modo più efficiente rispetto ad una linea immortalizzata (PCN) esprimendo enzimi chiave antiossidanti quali la glutatione perossidasi (GP) e la *uncoupling protein 2* (UCP2). Le cellule PCN in seguito a trattamento con tossine mitocondriali, hanno immediatamente presentato scarsa attività mitocondriale ed un

incremento nella produzione di specie reattive dell'ossigeno. Al contrario cellule aNSC hanno reagito prontamente sintetizzando una serie di enzimi come la GP, la UCP e la SOD 2 impedendo l'azione di deterioramento cellulare che porta all'apoptosi. Inibire o danneggiare, *in vitro*, l'intero apparato enzimatico antiossidante delle cellule staminali comporta la morte dell'intera coltura (Madhavan L. et al., 2006). Anche i risultati *ex vivo* hanno confermato e rinforzato le osservazioni sopra menzionate; infatti, cellule proliferanti della SVZ di topini C57BL/6 hanno biosintetizzato 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 nel morbo di Parkinson, ma anche, in molte altre patologie neurodegenerative (Madhavan L. et al., 2006).

In conclusione si può dire che il principale risultato di questo studio è la probabile presenza dei trasportatori SVCT2 nelle cellule staminali provenienti dalla zona subventricolare dei topi C57BL/6 e della loro capacità di accumulare acido ascorbico preservandolo nella forma ridotta poichè sono capaci di ridurre il DHAA in acido ascorbico. La presenza di tali trasportatori sulle neurosfere, ma anche dei trasportatori per il glucosio GLUT1 e GLUT3, importanti nel ciclo

dell'AA-DHAA (Hediger M.A, 2002), dovrà essere confermata, nel prossimo futuro, mediante immunocitochimica e microscopia confocale. Altro aspetto interessante, emerso in questo studio, è l'abilità di queste cellule nel proteggere non solo l'acido ascorbico dall'auto-ossidazione, ma anche la dopamina e la L-Dopa (**Fig. 22,23 e 24**).

Dati neurochimici, riguardanti topini C57BL trattati con MPTP, hanno rivelato che il contenuto di AA+DHAA nel *brainstem* (ed in particolare all'interno della *substantia nigra*) si riduce progressivamente alla fine di un trattamento sub-acuto; 21 giorni dopo il trattamento si ha una riduzione drammatica nel contenuto di vitamina C pari al -20% rispetto ai controlli (dati non riportati). Tale perdita è da attribuire prevalentemente alla mancata riconversione del DHAA a AA e successivo accumulo di quest'ultimo nel compartimento intraneuronale. I neuroni della SNpc sono prevalentemente dopaminergici e, dopo trattamento con MPTP, vanno incontro ad apoptosi (Serra P.A. et al., 2002); quindi, questa regione del cervello presenterà un deficit di cellule neuronali con conseguente deplezione di AA (manca, fisicamente, un compartimento-riserva che lo possa accumulare dentro le cellule). Tale deficit aggrava ulteriormente lo *status* ossidativo nigrale, compromettendo altri neuroni dopaminergici per “*impairment*” del sistema antiossidante

nigrale, in seguito all'aumentata produzione di specie reattive dell'ossigeno.

Le cellule staminali possono essere impiantate direttamente nel *brainstem* oppure, mediante incolo, raggiungere la regione lesa tramite chemiotassi per differenziarsi in cellule dopaminergiche; 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 ruolo di *scavenging* aspecifico ben si assocerebbe a strategie terapeutiche alternative in cui un primo impianto di cellule staminali avrebbe la funzione di ripristinare lo stato ossidativo del microambiente nigrale, mentre un secondo trapianto (magari con cellule dopaminergiche) avrebbe come obiettivo la ricostituzione della via nigrostriatale, offrendo alle cellule trapiantate maggiori possibilità di sopravvivenza. I dubbi maggiori, pur tuttavia, riguardano 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 (striato o SNpc?) finalizzato principalmente alla clinica della malattia di Parkinson.

6. BIBLIOGRAFIA

- 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 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.
- Bankiewicz K., Mandel R.J., Sofroniew M.V. (1993). Trophism, transplantation, and animal models of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* **124** (1), 140-149.
- Barnham K.J., Masters C.L., Bush A.I.(2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 205-214.
- Björklund A, Stenevi U. (1979). Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplants. *Brain Res.* **177** (3), 555-560.

- 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.
- Brundin P., Strecker R.E., Widner H., Clarke D.J., Nilsson O.G., Astedt B., Lindvall O., Björklund A. (1988). Human fetal dopamine neurons grafted in a rat model of Parkinson's disease: immunological aspects, spontaneous and drug-induced behaviour, and dopamine release. *Exp Brain Res* **70**(1), 192-208.
- Cameron H. A. and McKay R. (1998). Stem cells and neurogenesis in the adult brain. *Curr. Opin. Neurobiol.* **8**, 677–680.
- Capone C., Frigerio S., Fumagalli S., Gelati M., Principato M.C., Storini C., Montinaro M., Kraftsik R., De Curtis M., Parati E., De Simoni M.G. (2007). Neurosphere-derived cells exert a neuroprotective action by changing the ischemic microenvironment. *PLoS. ONE* **303**, 1-15.
- Castro M., Caprile T., Astuya A., Millán C., Reinicke K., Vera J.C., Vásquez O., Aguayo L.G., Nualart F. (2001). High-affinity sodium-vitamin C co-transporters (SVCT) expression in embryonic mouse neurons. *J. Neurochem.* **78**, 815–823.

- Clayton D.F. and George J.M. (1999). Synucleins in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders. *J. Neurosci. Res.* **58**(1), 120-129.
- Conover J. C. and Allen R. L. (2002). The subventricular zone: new molecular and cellular developments. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 2128–2135.
- Corbin J.G., Gaiano N., Machold R.P., Langston A., Fishell G. (2000). The Gsh 2 homeodomain gene controls multiple aspects of telencephalic development. *Development* **127**, 5007-5020.
- Daadi M.M. and Weiss S. (1999). Generation of tyrosine hydroxylase producing neurons from precursors of the embryonic and adult forebrain. *J. Neurosci.* **19**, 4484–4497.
- Desole M.S., Esposito G., Migheli R., Fresu L., Sircana S., Miele M., De Natale G., Miele. E. (1995). Allopurinol protects against manganese-induced oxidative stress in the striatum and in the brainstem of the rat. *Neurosci. Lett.* **182**, 73-76.
- 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-induces apoptosis in PC12 cells. *Neurochem. Int.* **20** (1), 58-65.

- Dipasquale B., Marini M., Toule R.J. (1991). Apoptosis and DNA degradation by I-methyl-4-phenylpyridinium in neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**, 1442-1448.
- 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., Caille I., Lim D. A., Garcia-Verdugo J. M. and Alvarez-Buylla A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* **97**, 703–716.
- Faust C. and Magnuson T. (1993). Genetic control of gastrulation in the mouse. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **3**, 491–498.
- Freundlieb N., Francois C., Tande D., Oertel W.H., Hirsch E.C., Höglinger G.U. (2006). Dopaminergic substantia nigra neurons project topographically organized to the subventricular zone and stimulate precursor cell proliferation in aged primates. *J. Neurosci.* **26**, 2321-2325.
- Fuchs E. and Segre J. A. (2000). Stem cells: a new lease on life. *Cell* **100**, 143–155.

- Gabbita S.P., Lovell M.A., Markesbery W.R. (1998). Increased nuclear DNA oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* **71**, 2034-2040.
- Gage F. H. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science* **287**, 1433–1438.
- Gage F.H., Coates P.W., Palmer T.D., Kuhn H.G., Fisher L.J., Suhonen J.O., Peterson D.A., Suhr S.T., Ray J. (1995). Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **92**, 11879-11883.
- Garcia A.D., Doan N.B., Imura T., Bush T.G., Sofroniew M.V. (2004). GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat. Neurosci.* **7**, 1233–1241.
- George J.M. (2002). The synucleins. *Genome Biol.* **3**(1), reviews 3002.1-reviews 3002.6.
- Gerlach M, Double KL, Youdim MB, Riederer P. (2006). Potential sources of increased iron in the substantia nigra of parkinsonian patients. *J. Neural Transm. Suppl.* **70**, 133-142.
- Globus J.H. and Kunlenbeck H. (1944). The subependymal cell plate (matrix) and its relationship to brain tumors of the

- ependymal type. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **3**, 1–35.
- 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.
- Graham, D.G. (1984). Catecholamine toxicity: a proposal for the molecular pathogenesis of manganese neurotoxicity and Parkinson's disease. *Neurotoxicology* **5**, 113-118.
- 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.
- Gritti A., Parati E.A., Cova L., Frolichsthal P., Galli R., Wanke E., Faravelli L., Morassutti D.J., Roisen F., Nickel D.D., Vescovi A.L. (1996). Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *J. Neurosci.* **16**, 1091-1100.
- Halliwell B. and Gutteridge J.M.C. (1990). Free Radicals in Biology and Medicine. *Clarendon Oxford* 2nd Ed.

- Harman D. (1981). The aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 7124-7128.
- Hartley A., Stone J.M., Heron C., Cooper J.M., Schapira A.H.V. (1994). Complex 1 inhibitors induce dose-dependent apoptosis in PCI2 cells: relevance to Parkinson's disease. *J. Neurochem*, **63**, 1987-1990.
- Hediger M.A. (2002). New view at C. *Nature medicine* **8** (5), 514–517.
- 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. *Nature Neuroscience* **7**, 726-735.
- Hunot S. and Hirsch E.C. (2003). Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **53**, S49-S60.
- Jenner P. (2003). Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **53**, S26-S38.
- Johe K.K., Hazel T.G., Muller T., Dugich-Djordjevic M.M., McKay R.D. (1996). Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Dev.* **10**, 3129-3140.

- Kershman J. (1938). The medulloblast and the medulloblastoma. *Arch. Neurol. Psychiatry* **40**, 937–967.
- 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. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **366**, 8–14.
- Kirschenbaun B., 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. USA* **92**, 210-214.
- Kuhn H.G. and Svendsen C.N. (1999). Origin, functions, and potential of adult neural stem cells. *BioEssays* **21**, 625–630.
- Lang A.E. and Lozano A.M. (1998). Parkinson's disease. First of two parts. *N. England J. Med.* **339**, 1044-1053.
- Laywell E.D., Rakic P., Kukekov V.G., Holland E.C., Steindler D.A. (2000). Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **97** (25), 13883–13888.
- Leroy E., Boyer R., Auburger G., Leube B., Ulm G., Mezey E., Harta G., Brownstein M.J., Jonnalagada S., Chernova T., Dehejia A., Lavedan C., Gasser T., Steinbach P.J., Wilkinson K.D.,

- Polymeropoulos M.H. (1998). The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* **39**, 451-452.
- Leung H. W., Vang M.L., Mavis R.D. (1981). The cooperative interaction between vitamin E and vitamin C in suppression of peroxidation of membrane phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta* **664**, 266-272.
- Levison S.W. and Goldman J.E. (1993). Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat forebrain. *Neuron* **10**, 201–212.
- 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.
- Liu W.G., Chen Y., Li B., Lu G.O., Chen S.D. (2004). Neuroprotection by pergolide against levodopa-induced cytotoxicity of neural stem cells. *Neurochem. Res.* **29**, 2207-2214.
- Loeffler M. and Potten C.S. (1997). Stem cells and cellular pedigrees a conceptual introduction. *Stem Cells (Potten, C. S., ed.), Academic, 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.
- 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.C., Ourednik J. (2006). Increased “Vigilance” of antioxidant mechanisms in neural stem cells potentiates their capability to resist oxidative stress. *Stem cells* **24**, 2110–2119.
- Martino G. and Pluchino S. (2006). The therapeutic potential of neural stem cells. *Nature Reviews Neuroscience* **7**, 395-406.
- McCay P.B. (1985). Vitamin E: Interactions with free radicals and ascorbate. *Ann. Rev. Nutr.* **5**, 323–340.
- 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., Olanow C.W. (2003). Proteolytic stress: a unifying concept for the etiopathogenesis of Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **53**(3), S73-S86.
- 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. *Neuroscience* **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). Novel integrated microdialysis–amperometric system for in vitro detection of dopamine secreted from PC12 cells: Design, construction, and validation. *Analytical Biochemistry* **380**, 323–330.
- Mi H. and Barres B. A. (1999). Purification and characterization of astrocyte precursor cells in the developing rat optic nerve. *J. Neurosci.* **19**(3), 1049–1061.

- Mochizuki H., Nakamura N., Nish K., Mizuno Y. (1994). Apoptosis is induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺) in ventral mesencephalic-striatal co-culture in rat. *Neurosci. Lett.* **170**, 191-194.
- 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.
- Niki E., Saito T., Kawakami A., Kamiya Y. (1984). Inhibition of oxidation of methyl linoleate in solution by vitamin E and vitamin C. *J. Biol. Chem.* **259**, 4177-4182.
- 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.
- Palmer T.D., Takahashi J., Gage F.H. (1997). The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol. Cell. Neurosci.* **8**, 389-404.

- Panganiban G., Rubenstein J.L. (2002). Developmental functions of the Distal-less/Dlx homeobox genes. *Development* **129**, 4371-4386.
- 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.
- Paterson J. A., Privat A., Ling E. A. and Leblond C. P. (1973). Investigation of glial cells in semithin sections. 3. Transformation of subependymal cells into glial cells, as shown by radioautography after 3 H-thymidine injection into the lateral ventricle of the brain of young rats. *J. Comp. Neurol.* **149**, 83–102.
- Perlow M.J., Freed W.J., Hoffer B.J., Seiger A., Olson L., Wyatt R.J. (1979). Brain grafts reduce motor abnormalities produced by destruction of nigrostriatal dopamine system. *Science* **204** (4393), 643-647.
- Picard-Riera N., Decker L., Delarasse C., Goude K., Nait-Oumesmar B., Liblau R., Pham-Dinh D., Evercooren A.B. (2002). Experimental autoimmune encephalomyelitis mobilizes neural progenitors from the subventricular zone to undergo

oligodendrogenesis in adult mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 13211–13216.

Pluchino S., Quattrini A., Brambilla E., Gritti A., Salani G., Dina G., Galli R., Del Carro U., Amadio S., Bergami A., Furlan R., Comi G., Vescovi A.L. e Martino G. (2003). Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis. *Nature* **422**, 688-694.

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

Prasad K.N., Cole W.C., Kumar B. (1999). Multiple antioxidants in the prevention and treatment of Parkinson's disease. *Journal of the American College of Nutrition* **5**, 413-423.

Redmond D.E. Jr., Bjugstad K.B., Teng Y.D., Ourednik V., Ourednik J., Wakeman D.R., Parsons X.H., Gonzalez R., Blanchard B.C., Kim S.U., Gu Z., Lipton S.A., Markakis E.A. , Roth R.H., Elsworth J.D., Sladek J.R. Jr., Sidman R.L., Snyder E.Y. (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.

- Redmond D.E., Sladek J.R. Jr, Roth R.H., Collier T.J., Elsworth J.D., Deutch A.Y., Haber S. (1986). Fetal neuronal grafts in monkeys given methylphenyltetrahydropyridine. *Lancet* **1** (8490), 1125-1127.
- 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.
- Rice, M.E. (2000). Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neurosci.* **23**, 209–216.
- Richards K.J., Kilpatrick T.J. and Bartlett P.F. (1992). De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **9**, 8591–8595.
- Rydberg E. (1932). Cerebral injury in newborn children consequent on birth trauma. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Suppl.* **10**, 1–247.
- Sanai N., Tramontin A.D., Quinones-Hinojosa A., Barbaro N.M., Gupta N., Kunwar S., Lawton M.T., McDermott M.W., Parsa A.T., Garcia-Verdugo M.J., Alvarez-Buylla A. (2004). Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* **427**, 740–744.

- Schober A. (2004). Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res.* **318**, 215-224.
- 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 P.A., 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 and Related Disorders* **14**, S189-S193.
- Serra P.A., Sciola L., Delogu M.R., Spano A., Monaco G., Miele E., Rocchitta G., Miele M., Migheli R. e Desole M.S (2002). The neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine induces apoptosis in mouse nigrostriatal glia. Relevance to nigral neuronal death and striatal neurochemical changes. *J. Biol. Chem.* **277** (37), 34451-34461.

- 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.
- Schober A.(2004). Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res.* **318**, 215-224.
- Smart I. (1961). The subependymal layer of the mouse brain and its cell production as shown by radioautography after thymidine-H3 injection. *J. Comp. Neurol.* **116**, 325–347.
- Spector, R. (1977). Vitamin homeostasis in the central nervous system. *N. Engl. J. Med.* **296**, 1393–1398.
- Spina M.B., Cohen G. (1989). Dopamine turnover and glutathione oxidation: implication for Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 1398-1400.
- Steece-Collier K., Maries E., Kordower J.H. (2002). Etiology of Parkinson's disease: Genetics and environment revisited. *Proc. Natl. Sci. U.S.A.* **99**(22), 13972-13974.
- Sturrock R.R. and Smart I.H. (1980). A morphological study of the mouse subependymal layer from embryonic life to old age. *J. Anat.* **130**, 391–415.

- 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.
- Sun A.Y., Yang W.L., Kim H.D. (1993). Free radical and lipid peroxidation in manganese-induced neuronal cell injury. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **679**, 353-358.
- Tatton W.G., Chalmers-Redman R., Brown D., Tatton N. (2003). Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation. *Ann Neurol.* **53**, S61-S72.
- Taupin P., Gage F.H. (2002). Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *J. Neurosci. Res.* **69**, 745-749.
- Taylor J.R., Elsworth J.D., Roth R.H., Sladek J.R. Jr, Collier T.J., Redmond D.E. Jr. (1991). Grafting of fetal substantia nigra to striatum reverses behavioral deficits induced by MPTP in primates: a comparison with other types of grafts as controls. *Exp Brain Res* **85** (2), 335-348.
- Temple S. and Alvarez-Buylla A. (1999). Stem cells in the adult mammalian central nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* **9**, 135-141.
- Tolbert B.M. (1985). Metabolism and function of ascorbic acid and its metabolites. *Int. J. vitam. Nutr. Res.* **27**, 122-138.

- 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.
- Tsukaguchi, Tokui H.T., Mackenzie B., Berger U.V., Chen X.Z., Wang Y., Brubaker R.F., Hediger M.A. (1999). A family of mammalian Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporters. *Nature* **399**, 70–75.
- Von Coelln R., Dawson V.L., Dawson T.M. (2004). Parkin-associated Parkinson's disease. *Cell Tissue Res.* **318**(1):175-184.
- Wagner J., Akerud P., Castro D. S., Holm P. C., Canals J. M., Snyder E. Y., Perlmann T., Arenas E.(1999). Induction of a midbrain dopaminergic phenotype in Nurr1 overexpressing neural stem cells by type 1 astrocytes. *Nat. Biotechnol.* **17**, 653–659.
- Warner T.T. and Schapira A.H. (2003). Genetic and environmental factors in the cause of Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **53**, S16-S25.
- 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.

- Weissmann I.L. (2000). Stem cells: units of regeneration and units in evolution. *Cell* **100**, 157–168.
- Wilson J.X. (1997). Antioxidant defense of the brain: A role for astrocytes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **75**, 1149–1163.
- Wilson J.X., Peters C.E., Sitar S.M., Daoust, P., Gelb A.W. (2000). Glutamate stimulates ascorbate transport by astrocytes. *Brain Res.* **858**, 61–66.
- Wilson P.A. and Hemmati-Brivanlou A. (1995). Induction of epidermis and inhibition of neural fate by Bmp-4. *Nature* **376**, 331–333.
- Yan J., Studer L. and McKay R.D. (2001). Ascorbic acid increases the yield of dopaminergic neurons derived from basic fibroblast growth factor expanded mesencephalic precursors. *J. Neurochem.* **76**, 307–311.
- Zemlan F.P., Thienhaus O.J., Bosmann H.B. (1989). Superoxide dismutase activity in Alzheimer's disease: possible mechanism for paired helical filament formation. *Brain Res.* **476**, 160-162.
- Ziv I., Melamed E., Nardi N., Luria D., Achiron A., Ofen D., Barzilai A. (1994). Dopamine induces apoptosis-like cell death in cultured chick sympathetic neurons: a possible novel

pathogenetic mechanism in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.*

170, 136-140.

7. RIASSUNTO

Il trapianto di cellule staminali potrebbe rappresentare una prospettiva terapeutica per numerose patologie neurodegenerative come il morbo di Parkinson. Sono state proposte molteplici interazioni fra le NSC esogene e l'ambiente patologico ospite. Infatti tali cellule, probabilmente, possiedono gli attributi per fornire protezione sia anatomica che funzionale nelle patologie neurodegenerative ma anche la capacità di ristabilire la funzionalità neuronale compromessa.

I nostri risultati mostrano l'effetto tossico sulla *viability* delle cellule staminali esercitato dal Mn o dalla sua associazione con la L-Dopa *in vitro*. Si è, quindi, dimostrato l'effetto antagonista dell'acido ascorbico nei confronti di tali alterazioni.

Anche le neurotossine, MPTP e MPP⁺, riducono drasticamente la *viability* delle aNSC in coltura. Tali effetti sulla *viability* cellulare sono contrastati dall'associazione di L-Dopa+DA+AA che sembrano avere un ruolo neuroprotettivo *in vitro*; queste tre molecole risultano essere fondamentali nel compartimento extracellulare nigrostriatale. Perciò DA e AA, accoppiate con la somministrazione esogena di L-Dopa, potrebbero fornire un supporto neurochimico alle aNSC nella terapia combinata (farmacologica-staminale) della malattia di Parkinson.

L'aggiunta al terreno di coltura di DHAA ha indotto un incremento significativo della *viability* cellulare. L'analisi cromatografica ci ha permesso inoltre di dimostrare una progressiva diminuzione, nel tempo, della concentrazione di DHAA nel medium di coltura. All'interno delle aNSC non è stata riscontrata la presenza di DHAA. Al contrario è stato possibile quantificare in modo progressivo la presenza dell'acido ascorbico sia dentro le cellule che nel medium di coltura. Risultato chiave del presente studio, è stato quello di dimostrare che le cellule staminali neurali adulte sono capaci di ridurre il DHAA ad AA e rilasciarlo negli spazi extracellulari. Tale caratteristica le rende di estremo interesse per il loro potenziale ruolo neuroprotettivo aspecifico se impiantate in modelli animali di Parkinson chimico.

Abbiamo dimostrato che le staminali neurali adulte proteggono *in vitro* non solo l'acido ascorbico, ma anche, la L-Dopa e la dopamina dall'autossidazione. Infine, nel nostro studio è anche emerso, in accordo con altri lavori (Höglinger G.U et al., 2004) che la DA induce, *in vitro*, un aumento della *viability* delle neurosfere.