

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO-BICOCCA

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Neuroscienze e Tecnologie Biomediche

Dottorato di Ricerca in Neuroscienze

-XXII ciclo-



CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI (MSC) NELLE PATOLOGIE DEMIELINIZZANTI: STUDIO IN VITRO DELLA PROMOZIONE DELLA SOPRAVVIVENZA DI NEURONI E DELLA FORMAZIONE DELLA MIELINA DA PARTE DI MSC

Coordinatore del Dottorato: Chiar.mo Prof. Giovanni TREDICI

Tutor: Chiar.mo Prof. Giovanni TREDICI

Tesi di Dottorato di:

Maddalena Ravasi

Matr. n° 708143

Anno Accademico 2008-2009

INDICE:

RIASSUNTO E SCOPO DEL LAVORO	pag.1
INTRODUZIONE	pag.4
1. Sistema nervoso.....	pag.4
1.1 Mielina	pag.8
1.1 a Struttura della mielina	pag. 11
1.2.Mielinizzazione nel snc.....	pag.17
1.2 a Cellule gliali nel sistema nervoso centrale	pag. 18
1.2 b Il processo di mielinizzazione nel snc	pag. 21
1.3 Mielinizzazione nel sistema nervoso periferico.....	pag. 23
1.3 a Cellule di Schwann	pag. 23
1.3 b Processo di mielinizzazione nel snc	pag. 24
1.4 Malattie demielinizzanti.....	pag. 31
1.5 Morte cellulare nel sistema nervoso.....	pag. 36
1.5 a Apoptosi	pag. 38
1.5 b Caspasi	pag. 40
2. Cellule staminali.....	pag. 42
2.1 a "self-renewal"	pag. 43
2.1 b Potenziale differenziativo	pag. 43
2.2 Fonti di cellule staminali.....	pag. 44
2.3 Cellule staminali embrionali.....	pag. 47
2.4 Cellule staminali adulte.....	pag. 49
2.5 Plasticità delle cellule staminali adulte	pag. 50
3. Cellule staminali mesenchimali (MSC).....	pag. 53
3.1 Isolamento delle MSC	pag. 54
3.2 Ruolo delle MSC nello sviluppo del sistema emopoietico.....	pag. 54
3.3 Proprietà immunomodulatorie delle MSC.....	pag. 55
3.4 Differenziamento delle MSC.....	pag. 57
3.5 Applicazioni terapeutiche delle MSC.....	pag. 59
3.6 MSC nella cura delle malattie neurodegenerative.....	pag. 62
3.7 MSC e malattie demielinizzanti.....	pag. 64

MATERIALI E METODI	pag.68
1. Colture primarie di neuroni sensitivi	pag.68
1.1 Preparazione del collagene	pag.68
1.2 Dissezione	pag.68
2. Estrazione delle cellule staminali mesenchimali di ratto (MSC) da midollo osseo	pag.69
2.1 Congelamento e scongelamento delle MSC	pag.71
3. Coculture dirette di MSC e neuroni sensitivi	pag.71
4. Coculture dirette di MSC fissate e neuroni sensitivi	pag.72
5. Trattamento dei neuroni sensitivi con il medium condizionato delle coculture dirette tra MSC e neuroni sensitivi	pag.72
6. Microscopia ottica ed elettronica	pag.72
7. Citofluorimetria	pag. 73
8. Estratti proteici	pag.74
9. Quantificazione della concentrazione proteica	pag.74
10. Separazione elettroforetica delle proteine	pag.75
11. Trasferimento del gel su filtro di nitrocellulosa	pag.76
12. Immunoblotting	pag.77
12.1 Reazione di chemiluminescenza	pag. 78
12.2 Analisi densitometriche	pag. 78
13. Immunofluorescenza	pag. 79
RISULTATI	pag.81
1. Effetto delle MSC sull'apoptosi neuronale	pag.81
2. Effetto trofico delle MSC: rilascio di fattori neurotrofici	pag. 86
2.1 Neuroni sensitivi trattati con il medium condizionato delle coculture dirette dei neuroni sensitivi ed MSC	pag. 86
3. Effetto trofico delle MSC: molecole di superficie	pag. 87
4. Interazione tra neuroni ed MSC	pag. 89
5. Mielinizzazione nelle coculture	pag. 95
5.1 Valutazione della presenza di cellule gliali nelle colture neuronali	pag. 99
5.2 Valutazione dell'espressione nelle MSC di marcatori specifici delle cellule gliali	pag. 102

6. Analisi delle molecole coinvolte nella mielinizzazione.....pag.106

DISCUSSIONE.....pag.111

BIBLIOGRAFIA.....pag.121

RIASSUNTO E SCOPO DEL LAVORO

Il presente lavoro di dottorato si propone di studiare le proprietà trofiche delle MSC nei confronti dei neuroni sensitivi, e di testare l'eventuale capacità di queste cellule di portare ad una corretta mielinizzazione assonale al fine di utilizzare le MSC nell'ambito di una terapia per le malattie demielinizzanti.

Le MSC sono cellule staminali adulte, multipotenti e indifferenziate che vengono isolate dal midollo osseo e selezionate in base alla capacità di aderire alla plastica. Le colture primarie di neuroni sensitivi sono ottenute dalla dissociazione dei gangli della radice dorsale di embrioni di ratto al 15° giorno di gestazione e piastrati su collagene in medium contenente NGF. In un lavoro pubblicato dal nostro laboratorio è stato già dimostrato che le MSC sono in grado di supportare in vitro la sopravvivenza a lungo termine dei neuroni sensitivi dei gangli della radice dorsale grazie al contatto diretto. Abbiamo per prima cosa caratterizzato il tipo di morte cellulare delle colture neuronali con diverse tecniche, in particolare mediante citofluorimetria, immunofluorescenza e microscopia elettronica, dimostrando che i neuroni in coltura muoiono per apoptosi e che le MSC sono in grado di proteggerli da questo tipo di morte.

In seguito a queste dimostrazioni abbiamo verificato se il ruolo neurotrofico delle MSC fosse dovuto al rilascio di fattori solubili nel medium di coltura spontaneamente o in seguito al contatto con i neuroni sensitivi, coltivando questi ultimi con il medium condizionato delle coculture. In entrambe le colture allestite non è stato osservato un aumento della sopravvivenza neuronale paragonabile a quella delle coculture dirette. Siamo quindi passati a verificare se la neuroprotezione fosse da attribuire alla presenza costitutiva sulla superficie delle MSC di molecole che, interagendo con i recettori neuronali, attivassero in questi ultimi pathways in grado di favorirne la sopravvivenza. I neuroni sensitivi sono stati quindi piastrati su MSC fissate con concentrazioni diverse di paraformaldeide (4%, 0,5%). Anche in questo caso le MSC non sono in grado di supportare la sopravvivenza a lungo termine dei neuroni sensitivi. Da queste dimostrazioni abbiamo dedotto che

il ruolo trofico delle MSC sui neuroni fosse principalmente mediato dal contatto diretto tra neuroni ed MSC. Inoltre sono stati osservati alcuni punti di contatto tra le due popolazioni cellulari in microscopia elettronica, e, mediante esperimenti con un colorante vitale citoplasmatico, la calceina, è stato dimostrato il possibile passaggio di materiale tra le due popolazioni. Quindi abbiamo verificato la presenza di alcune proteine coinvolte nella formazione di quelle giunzioni che consentono lo scambio di piccole molecole e ioni, ovvero le gap junctions, fondamentali nei neuroni per la formazione delle sinapsi elettriche. In particolare abbiamo riscontrato la presenza della connessina 32, 36 e 43 nei soli neuroni in cocoltura con le MSC. Inoltre la connessina 32 è stata ritrovata a livello di membrana in alcuni punti in coincidenza di neuroni ed MSC, suggerendo ancora una volta che possano esserci delle connessioni tra neuroni ed MSC.

Infine è stato dimostrato che le MSC promuovono la maturazione dei neuroni, ed in particolare la mielinizzazione di alcuni processi. La produzione di mielina non è dovuta alle cellule satelliti che sono presenti in origine in coltura perché queste vengono eliminate con l'utilizzo per 5 giorni di un intercalante, l'FUDR. Mediante esperimenti di immunofluorescenza abbiamo confermato che nelle colture neuronali dopo il trattamento con FUDR non sono presenti cellule satelliti. La mielina viene quindi prodotta dalle MSC, l'unica altra popolazione cellulare oltre ai neuroni presente in coltura. La produzione di mielina non è neppure dovuta ad un transdifferenziamento delle MSC in senso gliale, in particolare in cellule di Schwann, le cellule deputate alla formazione di mielina nel sistema nervoso periferico. Infatti le MSC in cocoltura non esprimono i marcatori caratteristici di tali cellule. È stato inoltre dimostrato che nelle cocolture vi sono fattori che possono promuovere la mielinizzazione, come la presenza del recettore delle neurotrofine p75 e la assenza del recettore di NT3, TrkC.

La mielina formata nelle cocolture, pur essendo esigua, è compatta e funzionale, presentando nodi di Ranvier e caratteristiche morfologiche simili a quella delle cocolture tra i neuroni e le cellule di Schwann.

In conclusione in questo lavoro abbiamo dimostrato che le MSC sono in grado di promuovere la mielinizzazione dei prolungamenti dei neuroni in

coltura, senza transdifferenziare in cellule di Schwann. Questo risultato pone le basi per studi più approfonditi condotti con MSC umane, oltre che con altri tipi di neuroni come corticali ed ippocampali per confermarne la validità anche nel sistema nervoso centrale, al fine di identificare una possibile terapia per le malattie demielinizzanti basata sull'utilizzo delle cellule staminali.

INTRODUZIONE

1 IL SISTEMA NERVOSO

Il sistema nervoso rappresenta l'apparato preposto alla ricezione degli stimoli sia esterni che interni all'organismo, e alla generazione delle risposte. Esso compie tre principali funzioni: sensoriale, integrativa (che include: pensiero, memoria, ecc.) e motoria. Si distingue in Sistema Nervoso Centrale (SNC) e Sistema Nervoso Periferico (SNP).

Il SNC è composto dall'encefalo accolto nella cavità cranica e dal midollo spinale localizzato nel canale vertebrale; è deputato al controllo e all'integrazione delle attività delle varie parti del corpo ed è il mezzo tramite cui l'individuo può reagire alle variazioni dell'ambiente esterno. L'encefalo è suddiviso in varie regioni:

- Il cervello, propriamente detto, che comprende il diencefalo (cui appartengono ipotalamo, ipofisi, talamo ed epitalamo) e il telencefalo, (cui appartengono gli emisferi cerebrali, costituiti da corteccia cerebrale e ippocampo e le strutture comuni che appartengono ai due emisferi, ovvero corpo calloso, fornice, la commessura anteriore e il setto pellucido);
- Il mesencefalo, cui appartengono i peduncoli cerebrali e la lamina quadrigemina;
- Il romboencefalo, cui appartengono il cervelletto, il ponte di Varolio e il bulbo;

Il midollo spinale a sua volta si divide in diverse parti: cervicale, toracico, lombare e sacrale.

Il SNP è costituito da fibre nervose che, con le loro guaine connettivali, raggiungono tutte le diverse parti del corpo. I nervi periferici sono costituiti da fasci di fibre nervose, mieliniche e amieliniche, racchiuse da tre foglietti connettivali (epinevrio, perinevrio, endonevrio). Il SNP costituisce le vie attraverso cui l'SNC riceve informazioni sensitive dalla periferia e provoca variazioni dell'attività di muscoli, ghiandole ecc. Il SNP è quindi composto da nervi cranici che emergono dal tronco encefalico e da nervi spinali che originano dal midollo spinale.

Il SNP dal punto di vista funzionale è suddiviso in:

- componente sensitiva, afferente, che riceve gli stimoli e li trasmette al SNC. I neuroni di questa componente sono localizzati nei gangli spinali e cervicali.
- componente motoria, efferente, che origina dalle corna anteriori del midollo ed è costituita dagli assoni dei motoneuroni che innervano i fusi neuromuscolari e il muscolo scheletrico.

Dal midollo spinale originano trentuno paia di nervi spinali che lasciano il canale vertebrale attraverso i forami intravertebrali (Fig. 1). Ogni nervo spinale emerge simmetricamente dal midollo spinale tramite radici, una radice anteriore che contiene fibre efferenti (motrici), e una posteriore che contiene fibre afferenti (sensitive). Sul decorso della radice dorsale è intercalato un ganglio, il ganglio spinale (1).

I gangli spinali sono ingrossamenti tondeggianti costituiti da neuroni sensitivi preposti alla ricezione di afferente sensitive. Ciascuno dei neuroni sensitivi da' origine ad un breve prolungamento che si suddivide in un ramo centripeto, che penetra in una radicola dorsale, ed in un ramo periferico che si porta al nervo spinale. Nei gangli spinali i somi dei neuroni sono generalmente raggruppati attorno o lateralmente alle fibre delle radici. Il tessuto di base del ganglio, ben distinto sia al microscopio elettronico che ottico, comprende oltre ai neuroni sensitivi anche una capsula di cellule satelliti in stretta relazione tra di loro mediante la lamina basale.

Fig. 1: Struttura di origine dei nervi spinali

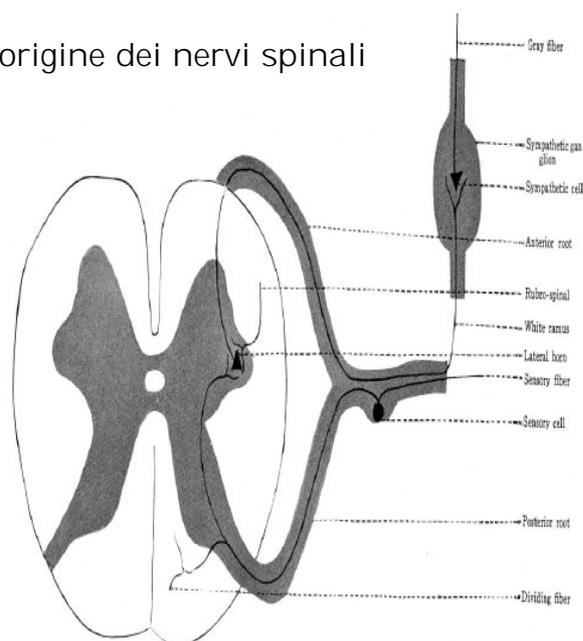


Fig. 40. C3/4-spinal center.

I gangli sono circondati da una membrana multi lamellare perineurale e da un epinevrio, dove sono predominanti le fibrille di collagene. Come componenti del tessuto connettivo sono presenti anche i mastociti (2).

All'interno del ganglio sono presenti due popolazioni cellulari: neuroni sensitivi e cellule satelliti. I neuroni sensitivi del ganglio variano notevolmente per dimensione sia tra diversi gangli sia all'interno dello stesso ganglio. I nuclei di questi neuroni sono molto grossi rispetto al volume totale del soma e occupano generalmente una posizione centrale, anche se si trovano talvolta nuclei eccentrici. I nuclei sono sferici e possono essere multilobati. Nel ganglio vi sono principalmente due tipi di neuroni: grandi cellule chiare (cellule A) e piccole cellule scure (cellule B). Le principali differenze morfologiche tra i due tipi di cellule riguardano principalmente la quantità di reticolo endoplasmatico e di ribosomi (3, 4, Fig. 2). Nel tipo b il reticolo endoplasmatico rugoso e i ribosomi sono altamente concentrati, al contrario del tipo a, che invece contiene una più ampia quantità di neurofilamenti, ovvero filamenti dal diametro di 10 nm fondamentali per la formazione dell'assone.

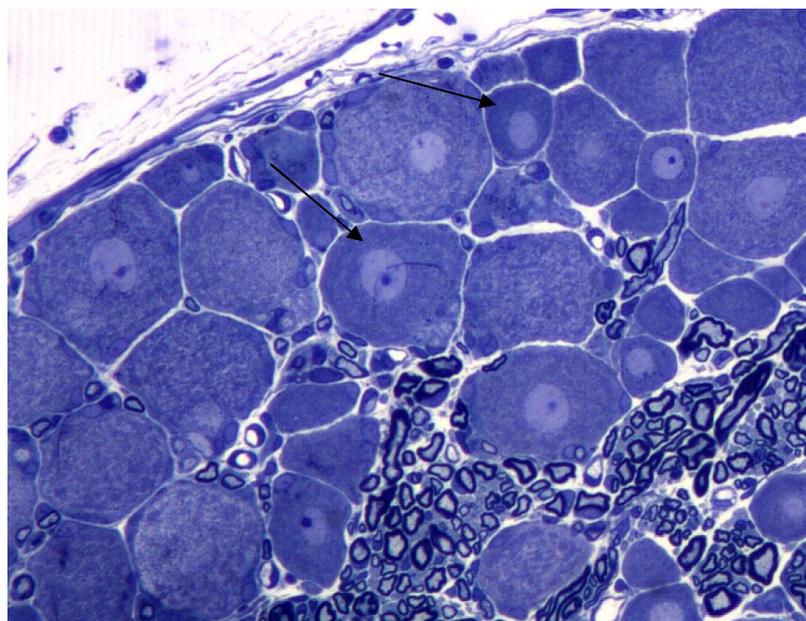


Fig. 2: Neuroni tipo A e neuroni tipo B nel ganglio.

Nel ganglio si trovano anche le cellule satelliti che circondano i pirenofori dei neuroni sensitivi (5). Le cellule satelliti sono altamente polimorfiche: stellate, poligonali e per la maggior parte fusiformi. Hanno nuclei allungati e tra cellule satelliti contigue sono presenti interdigitazioni. Tra di loro sono presenti spazi più piccoli di 20 nm. L'interfaccia tra i neuroni e le cellule satelliti comprende varie invaginazioni ed estroflessioni della membrana del neurone. Il loro principale ruolo è di tipo trofico nei confronti dei neuroni stessi regolando i livelli di O₂, CO₂, nutrienti e neurotrasmettitori (6).

Sia nel SNC che nel SNP la rapida trasmissione dell'impulso nervoso viene garantita dalla presenza della mielina.

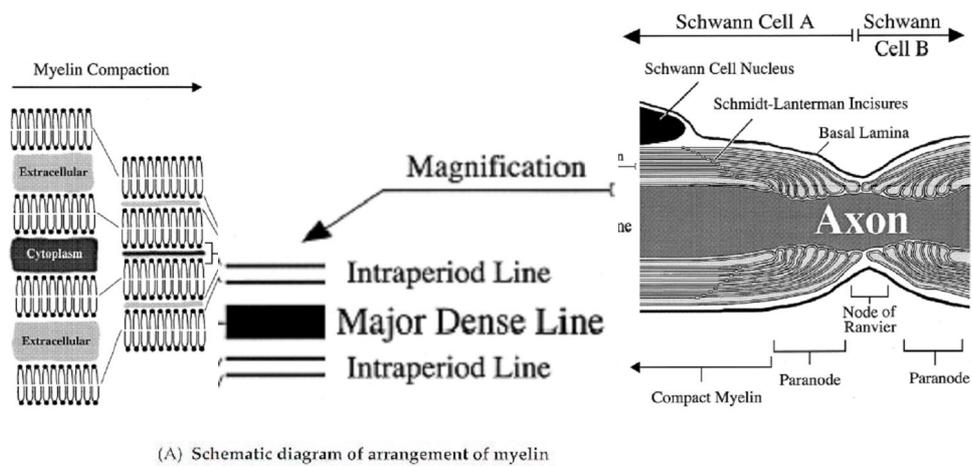
1.1 MIELINA

La mielina esercita una funzione fondamentale nella conduzione del segnale elettrico nel sistema nervoso, in quanto "isola" gli assoni mediante un rivestimento lipidico che garantisce una alta resistenza elettrica e una bassa conduttanza e consente una più rapida trasmissione dell'impulso nervoso a livello dei nodi di Ranvier, dove lo strato di mielina si interrompe.

La formazione di mielina nel sistema nervoso è dovuta all'azione degli oligodendrociti nel SNC e alle cellule di Schwann nel SNP. Questi due tipi cellulari si avvolgono attorno agli assoni secondo due diverse modalità: gli oligodendrociti sono in grado di avvolgere e mielinizzare più segmenti assonali contemporaneamente, mentre ogni cellula di Schwann avvolge e mielinizza un singolo assone. La mielina prodotta da questi due tipi di cellule presenta struttura e composizione molto simile.

Al microscopio elettronico la mielina si presenta come una membrana compatta pluristratificata (fino a 300 avvolgimenti) che circonda e avvolge l'assone. La mielinizzazione inizia con l'invaginazione di un assone nella cellula gliale; ciò porta alla stretta giustapposizione e poi alla fusione di due porzioni della membrana plasmatica, per formare il mesassone. Questo corrisponde quindi alla parte lipidica della mielina ed ha un diametro di 110-130 Å. Dove si fondono le due superfici extracellulari della membrana plasmatica all'interno del mesassone si forma una linea più scura, detta linea intraperiodo, che ha uno spessore di 10 Å. La mielinizzazione procede quindi con la deposizione da parte della cellula gliale, di numerosi strati di mesassone attorno all'assone. Il citoplasma della cellula gliale viene quindi escluso, portando alla stretta apposizione delle superfici citoplasmatiche della membrana plasmatica, che si fondono tra loro e formano un'altra linea elettrondensa molto scura, chiamata linea densa maggiore, di 30 Å di diametro. L'accesso all'intera struttura è garantito da canali citoplasmatici posti lungo le spirali di mielina, le incisure di Schmidt-Lanterman, dove sono presenti giunzioni strette e gap junction (7,8) (Fig. 3, 5). L'isolamento mielinico non è contiguo lungo l'assone, ma si interrompe a livello dei nodi di Ranvier (Fig. 3, 4). I due segmenti mielinici posti tra due nodi di Ranvier

vengono detti segmenti internodali. Il nodo di Ranvier ha un importante ruolo fisiologico nell'aumentare l'efficienza della conduzione nervosa. Infatti a livello del nodo di Ranvier viene trasmesso l'impulso nervoso, in quanto in queste regioni la membrana dell'assone è direttamente esposta ai fluidi extracellulari. Qui sono posti numerosissimi canali al sodio voltaggio dipendenti che sono i responsabili della propagazione del potenziale d'azione. Nei nodi di Ranvier la guaina mielinica al limite del segmento internodale si scolla a formare i segmenti paranodali. I segmenti paranodali sono attaccati alle aree paranodali dell'assone dal complesso CASPR (Contactin-associated protein)/paranodina sull'assone che lega la neurofascina 155 sulla cellula di Schwann (8). Nelle regioni paranodali non si forma la linea densa maggiore e il citoplasma delle cellule non viene espulso. In queste regioni si ritiene che possano avvenire gli scambi tra il citoplasma delle cellule di Schwann e gli strati più profondi della guaina mielinica e dell'assone stesso. Per la presenza degli strati di mielina, chiamati internodi o segmenti internodali, alternati ai nodi di Ranvier la conduzione nervosa si dice di tipo saltatorio (9). Questo tipo di conduzione ha il vantaggio di aumentare la velocità dell'impulso nervoso, in quanto lo strato di mielina funge da isolante ed impedisce quindi la diffusione dell'impulso nervoso nell'ambiente circostante, mentre a livello dei soli nodi di Ranvier avviene la propagazione dell'impulso nervoso. Oltre alle fibre mieliniche appena descritte nel sistema nervoso vi sono le fibre amieliniche. In questo tipo di fibre la cellula gliale può avvolgere diversi assoni, ma senza formare la membrana mielinica, e perciò la loro velocità di conduzione è molto più bassa rispetto alle fibre mieliniche (10).



(A) Schematic diagram of arrangement of myelin

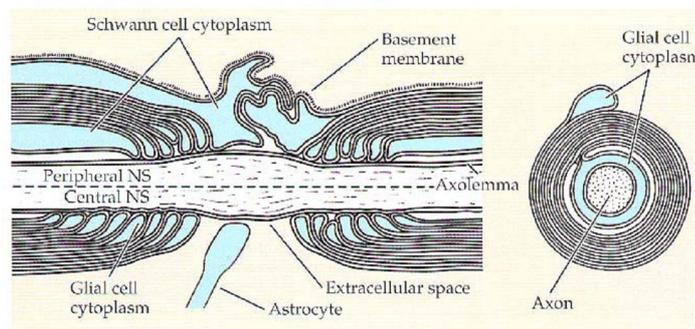


Fig. 3: Struttura microscopica della mielina

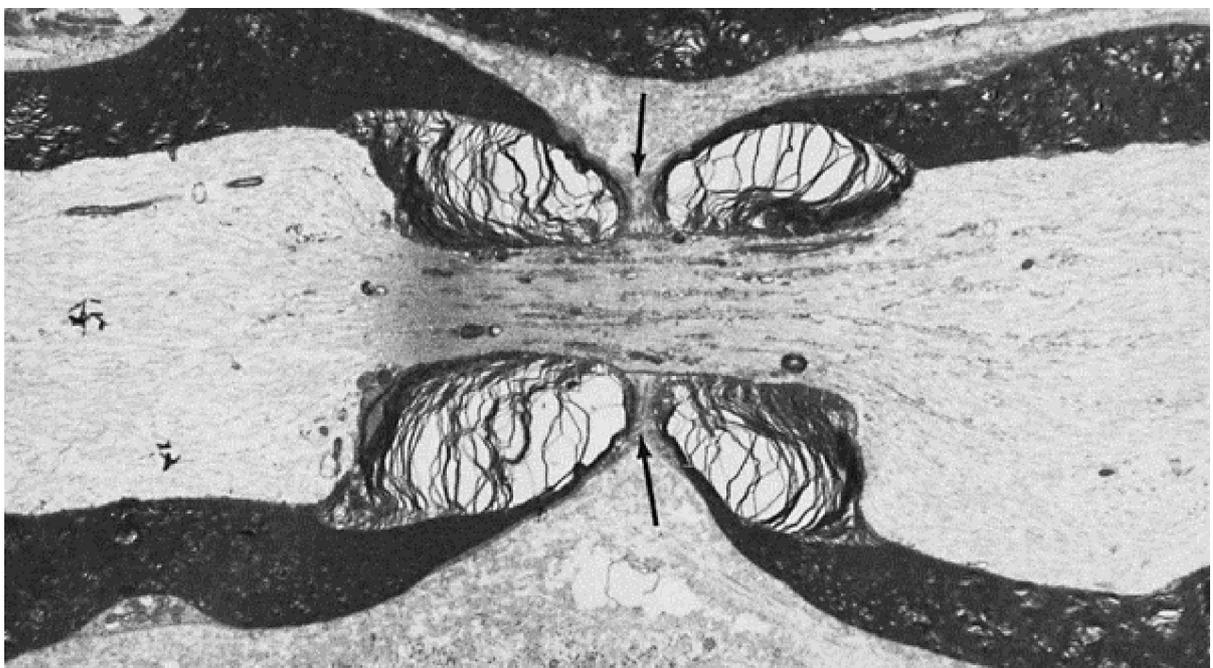


Fig. 4: Nodo di Ranvier in microscopia elettronica

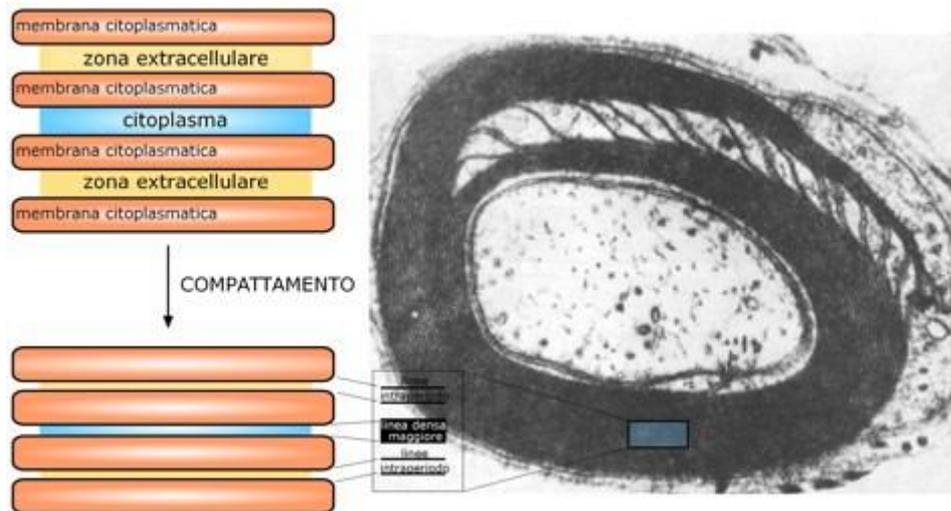


Fig. 5: Struttura microscopica della mielina

1.1 a Struttura della mielina

La guaina di mielina è una entità complessa composta da membrane pluristratificate, caratterizzate da contenere il 70-80% di lipidi e il 20-30% di proteine. L'alto contenuto in lipidi conferisce alla mielina la sua capacità di isolare gli assoni.

a) Componente lipidica della mielina:

Nella guaina mielinica sono presenti tutte le maggiori classi lipidiche (colesterolo, glicolipidi e fosfolipidi). Il colesterolo è il lipide più rappresentato, mentre i fosfolipidi rappresentano il 40% dei lipidi totali della mielina. Particolarmente abbondanti sono i lipidi della famiglia dei glicosfingolipidi tra cui i galattocerebrosidi (GalC), i galattosilceramidi e i loro derivati sulfatidici, i sulfgalattosilceramidi (11, 12, 13, 14).

b) Componente proteica:

La maggiore componente proteica della mielina è composta dalle glicoproteine, seguite poi dalle proteine basiche (15).

Table 3
Characteristics of peripheral nervous system myelin proteins

	Abundance in myelin (% of total myelin proteins)	Molecular mass (mature protein) (kDa)	Transmembrane domain(s)	Protein localization (compact or non-compact myelin)	Gene localization (human)
Glycoproteins					
P0	50-70%	28	1	Compact	1
PMP22	2-5%	22	4	Compact	17
MAG	1%	100	1	Non-compact	19
Periaxin	5%	170	None	Non-compact	7 (mouse)
E-cadherin	< 0.5	130	1	Non-compact	16
Basic proteins					
MBP	5-15%	14-21.5	None	Compact	18
P2	1-10%	14.8	None	Compact	8
Other proteins					
CNP	< 0.5%	46/48	None	Compact	17
PLP/DM20	< 0.5%	30/25	4	Controversial	X
Cx32	< 0.5%	32	4	Non-compact	X

Tabella 1: elenco delle proteine della mielina

Tra le glicoproteine sono presenti (16):

PO: rappresenta il 50-70% delle proteine totali della mielina. E' una proteina integrale di membrana di 28 kDa espressa dalle cellule di Schwann mielinizzanti (17), ma anche dalle cellule di Schwann perisinaptiche non mielinizzanti, probabilmente con funzione di mediare l'adesione tra l'assone e la cellula di Schwann (18). E' altamente conservata tra le specie. PO si presenta nella membrana come tetramero e interagisce con i tetrameri delle membrane adiacenti per permettere il compattamento della mielina. Il dominio extracellulare presenta similarità con le molecole di adesione cellulare correlate alle immunoglobuline, che potrebbero contribuire alla formazione dell'intraperiodo di mielina mediante interazioni idrofobiche ed elettrostatiche. Il dominio citoplasmatico carbossiterminale, insieme alla proteina basica della mielina (MBP), è probabilmente coinvolto nella formazione della linea densa della mielina mediante interazione elettrostatiche con lipidi acidi della membrana (19).

PMP22 (peripheral myelin protein 22): è una piccola glicoproteina di 22 kDa, con quattro domini idrofobici transmembrana (20). Il residuo carboidrato potrebbe essere coinvolto nell'adesività cellulare (20), così come PO.

MAG (myelin associated glycoprotein): rappresenta solo lo 0,01% delle proteine del SNP (21) ed è localizzata nella membrana periassonale della cellula di Schwann, nei paranodi e nelle incisure di Schmidt-Lanterman. MAG partecipa al riconoscimento assonale, all'adesione, al signalling durante il differenziamento delle cellule gliali, alla regolazione della crescita assonale e al mantenimento dell'integrità tra assone e mielina (22). Il suo peso è di 100 kDa e lega specifici gangliosidi presenti sulla membrana assonale. Ci sono 2 isoforme, S-MAG e L-MAG.

MOG (myelin oligodendrocytes glycoprotein): è una glicoproteina transmembrana appartenente alla famiglia delle immunoglobuline ed è specifica del sistema nervoso centrale. È localizzata sulla superficie più esterna della guaina mielinica ed interagisce con i componenti della matrice extracellulare. La sua funzione non è ad oggi nota, ma si ipotizza che sia coinvolta nella trasduzione di segnali extracellulari in considerazione della sua localizzazione. Anticorpi anti-MOG sono presenti in pazienti affetti da Sclerosi multipla, una malattia autoimmune demielinizzante del Sistema Nervoso (23).

Periassina: È una proteina di 170kDa, rappresenta il 5% delle proteine della mielina, ed è specifica per il SNP. È localizzata sulla membrana plasmatica delle cellule di Schwann mielinizzanti (24, 25) e nello spazio periassonale della mielina.

Caderine epiteliali: Le caderine sono una famiglia di proteine intramembrane di adesione calcio dipendenti, che hanno un ruolo nelle interazioni intracellulari e nella regolazione della morfologia cellulare. Sono le

glicoproteine adesive presenti nella regione non compatta della mielina (26). Sono coinvolte nel mantenimento della coesione delle membrane paranodali.

Proteine basiche: Ci sono due tipi di proteine basiche, MBP e P2

MBP (myelin basic protein): E' presente sia nel SNC che nel SNP, ed ha una alta percentuale di residui basici (circa il 25%). Ci sono 4 isoforme di 21.5, 18.5, 17 e 14 kDa (27). La sua forte carica positiva suggerisce che possa contribuire al compattamento della mielina, con la proteina P0. Inoltre rappresenta la maggior parte di proteine citosoliche della mielina compatta (Fig. 6). MBP è di notevole interesse in quanto è il maggiore auto antigene nella sclerosi multipla (23, 28).

P2: Proteina citosolica di 14.8 KDa, localizzata nel lato citoplasmatico delle membrane compatte di mielina. Fa parte delle fatty acid binding protein ed è fondamentale per l'uptake e il trasporto degli acidi grassi agli organuli intracellulari, del targeting di questi a specifici pathways metabolici e al mantenimento del loro pool. La sua funzione di legare gli acidi grassi permette la formazione e il mantenimento della composizione lipidica della guaina mielinica (29)

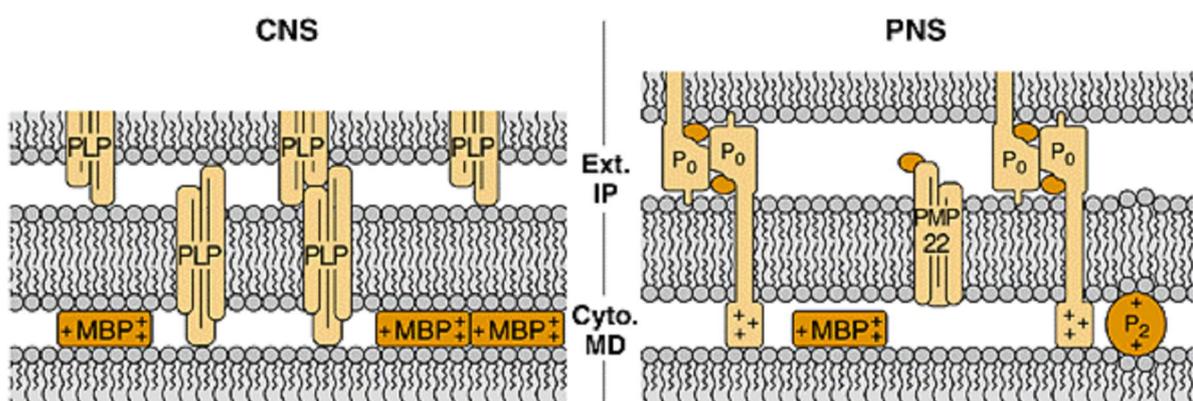


Fig. 6: Ruolo di MBP nel compattamento della mielina

Altre proteine presenti nella mielina:

PLP/DM20 (proteolipid protein): è una proteina integrale di membrana e rappresenta il principale costituente proteico della mielina nel sistema nervoso centrale (30). Si ritiene che PLP abbia principalmente un ruolo strutturale e che sia responsabile della formazione della linea intra-periodo e quindi della mielina compatta. Numerose altre funzioni sono state però proposte per questa proteina, quali: la regolazione dello sviluppo degli oligodendrociti, il coinvolgimento nelle fasi iniziali dell'interazione tra oligodendrociti e assone, un ruolo nel processo di avvolgimento dell'assone da parte della guaina mielinica e nella sopravvivenza assonale e neuronale. Nel SNP la localizzazione e la funzione di questa proteina non è ancora del tutto chiara. DM20 è una proteina che deriva dallo *splicing* alternativo dell'mRNA di PLP. La sequenza proteica di DM20 differisce da quella di PLP per una delezione di trentacinque amminoacidi.

Nonostante PLP e DM20 rivestano importanti funzioni nella mielina non sono però essenziali per la formazione della guaina mielinica. A dimostrazione di ciò in topi *knock-out* per PLP-DM20 la mielina appare morfologicamente normale, anche se gli animali presentano una minor sopravvivenza rispetto ai *wild-type* e difficoltà nel compiere movimenti complessi (30).

CNP (2,3 cyclic nucleotide 3 phosphodiesterase): è un enzima che si è dimostrato capace di idrolizzare substrati artificiali 2', 3'- nucleotidi ciclici nei loro 2'-derivati. CNP è localizzata nel citoplasma nelle cellule gliali che formano la guaina mielinica e nei *loop* para-nodali. Topi Knock out per CNP mostrano difetti di mielinizzazione suggerendo che tale proteina possa agire da regolatore cellulare nelle fasi precoci della mielinizzazione (22).

E' concentrata nella regione periassonale, all'interno dello strato di mielina, nella superficie della cellula di Schwann e nel suo citoplasma.

Fondamentali per la formazione della mielina sono inoltre le connessine (31), presenti nei paranodi e nelle incisore di Schmidt-Lanterman della guaina mielinica. Le connessine costituiscono le gap junction. Queste giunzioni

consentono il passaggio di determinate sostanze (ioni o molecole di basso peso molecolare) tra le cellule, avendo dei canali, i connessioni, che si aprono in risposta a determinati segnali chimici (modificazioni del pH o della concentrazione di ioni calcio), e che permettono la comunicazione tra cellule. Questi canali formano dei ponti citoplasmatici (pori acquosi) tra cellule adiacenti con un lume di circa 2nm. Le gap junction sono anche chiamate placche giunzionali in quanto contengono fino a mille singoli canali giunzionali. Ogni canale consiste di due emicanali (chiamati connessioni), ciascuno dei quali è composto da sei proteine, chiamate connesine. La maggior parte dei neuroni esprimono gap junction, che vengono regolate durante lo sviluppo e il differenziamento nervoso.

All'interno del sistema nervoso, le gap junction permettono la trasmissione sinaptica di tipo elettrico (31). Nelle sinapsi elettriche, a differenza delle sinapsi chimiche, l'onda di depolarizzazione passa direttamente dal neurone presinaptico a quello postsinaptico senza l'intervento di mediatori chimici. In queste sinapsi le superfici sinaptiche delle due membrane sono a tratti fuse insieme, formando le giunzioni strette, oppure sono connesse mediante gap junction che consentono mediante il passaggio di ioni la trasmissione dell'impulso elettrico.

Tra le numerose connesine esistenti, nel sistema nervoso sono maggiormente espresse la connesina 26, la 32, la 36 e la 43 (32, 33). Nella formazione della mielina, la connesina maggiormente presente è la connesina 32.

1.2 MIELINIZZAZIONE NEL SNC

Nel sistema nervoso centrale la mielina è prodotta dagli oligodendrociti che, avvolgono più segmenti assionali e possono mielinizzare diversi assoni (Fig.7, Fig. 8).

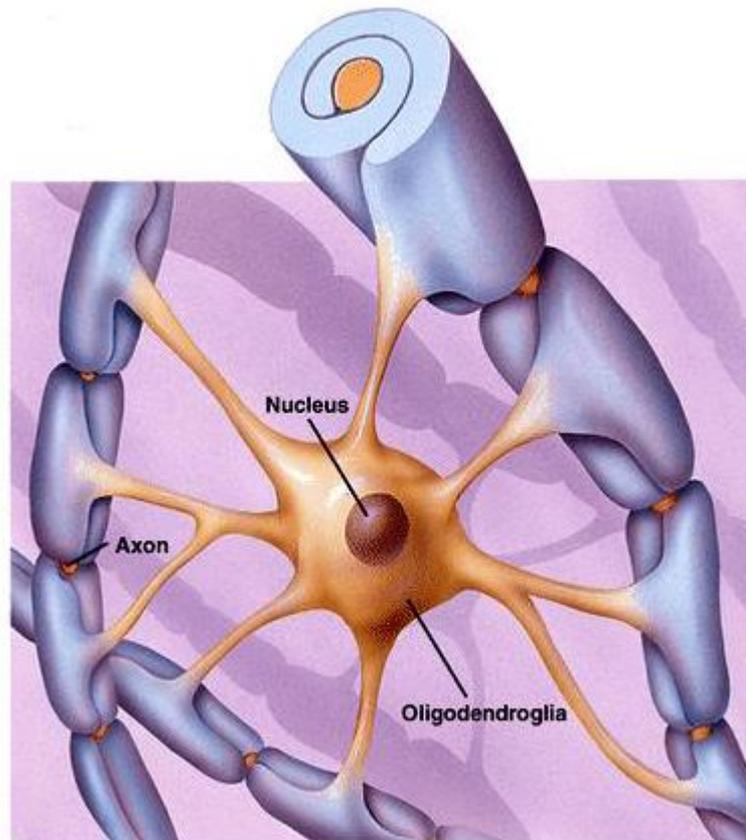


Fig. 7: Rappresentazione schematica della guaina mielinica formata dall'oligodendrocita.

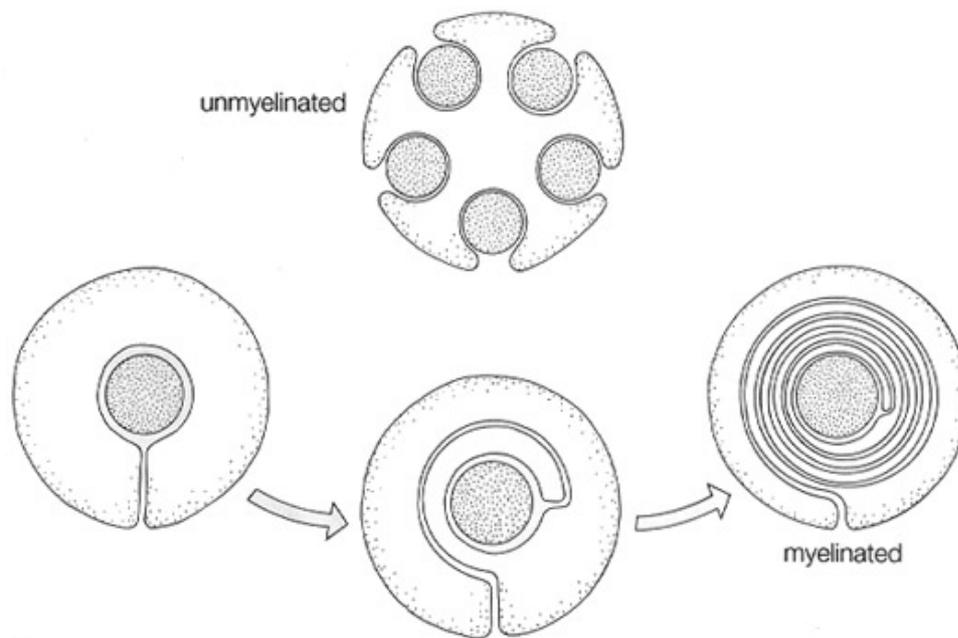


Fig. 8. Rappresentazione schematica di un assone non mielinizzato e di uno mielinizzato.

1.2 a Cellule gliali nel sistema nervoso centrale

Nel sistema nervoso centrale sono presenti 3 tipi principali di cellule gliali: astrociti, cellule microgliali e gli oligodendriociti. Gli astrociti sono i più numerosi e sono disseminati tra i neuroni e i loro prolungamenti. Sono distinti in due tipi: astrociti fibrosi e astrociti protoplasmatici. Gli astrociti fibrosi hanno un piccolo corpo cellulare e sono provvisti di numerosi sottili prolungamenti, e sono maggiormente presenti nella sostanza bianca. Gli astrociti protoplasmatici invece hanno un corpo cellulare più grande e sono maggiormente presenti nella sostanza grigia. Entrambi costituiscono la trama di sostegno per gli scambi nutritivi e gassosi tra le cellule e il sangue, hanno una funzione di riparazione e partecipano a regolare la trasmissione dell'impulso nervoso.

Le cellule della microglia sono un tipo di cellule della glia che si occupano della prima e principale difesa immunitaria attiva nel sistema nervoso centrale (SNC). Le microglia costituiscono il 20% della popolazione totale di

cellule gliali all'interno del cervello. Le microglia si muovono costantemente e analizzano il SNC in cerca di neuroni danneggiati, placche e agenti infettivi.

Gli oligodendrociti sono piccole cellule munite di sottili prolungamenti scarsamente ramificati e spesso con superficie nodosa. La loro funzione principale è quella di formare la mielina. Tuttavia esistono anche oligodendrociti, detti oligodendrociti satelliti, che non formano la guaina mielinica, ma presentano localizzazione perineuronale e regolano il microambiente che circonda i neuroni (34). Sono caratterizzati da piccole dimensioni, citoplasma e nucleo particolarmente addensati, assenza di filamenti intermedi e di glicogeno nel citoplasma e la presenza di numerosi microtubuli nelle ramificazioni cellulari, probabilmente coinvolti nella stabilità di queste ultime (35).

Prima di raggiungere la completa maturazione, gli oligodendrociti attraversano diversi stadi caratterizzati dall'espressione, sia *in vivo* sia *in vitro*, di specifici marcatori antigenici e da capacità proliferative e migratorie differenti. La maturazione degli oligodendrociti è inoltre caratterizzata da numerosi cambiamenti della morfologia cellulare.

I progenitori degli oligodendrociti derivano dalla zona sub-ventricolare (36, 37), da dove migrano diffusamente nelle diverse zone del sistema nervoso centrale in via di sviluppo per poi differenziarsi in cellule mature responsabili della produzione della mielina.

Le cellule progenitrici migrano lungo gli assoni che costituiranno i tratti di fibre della futura sostanza bianca e si differenziano in pre-oligodendrociti, caratterizzati dalla presenza di numerose estroflessioni citoplasmatiche, da alta capacità proliferativa, dalla perdita della capacità di rispondere alla stimolazione mitogenica indotta da PDGF ed dall'espressione del ganglioside O4. Inoltre i pre-oligodendrociti possiedono una minor mobilità rispetto alle cellule progenitrici (38, 39, 40).

I pre-oligodendrociti differenziano poi in oligodendrociti immaturi caratterizzati dalla comparsa del marker Gal-C (41, 42). In questa fase del processo di differenziamento vengono espressi sulla membrana cellulare altri marker, quali l'antigene RIP (Receptor-Interacting Protein), CAII (Carbonic Anhydrase II) e MBP.

L'espressione di DM20 sulla membrana di un oligodendrocita pre-mielinizzante indica l'inizio del processo di mielinizzazione (Fig. 2.3), mentre l'espressione di MBP, PLP, MAG e MOG identifica un oligodendrocita maturo (43).

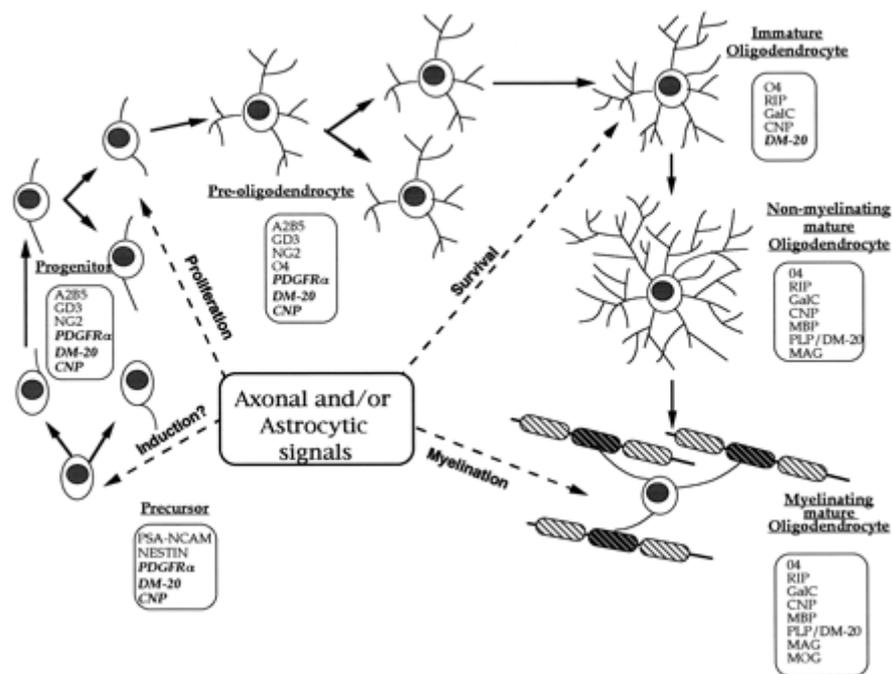


Fig. 9: Rappresentazione degli stadi di sviluppo delle cellule appartenenti al lineage oligodendrocytario.

Al termine del processo di maturazione, la quantità di oligodendrociti maturi con fenotipo mielinizzante è determinato dal bilancio tra la proliferazione e l'apoptosi dei progenitori (44, 45).

1.2 b Il processo di mielinizzazione nel snc

La natura dei segnali che innescano il processo di mielinizzazione, la sua velocità e l'estensione della formazione della mielina sono ancora poco noti.

Si ritiene che in una fase molto precoce dello sviluppo del sistema nervoso, specifici segnali tra l'assone e la cellula gliale mielinizzante determinino se debba essere innescato o meno il programma di mielinizzazione. Nel sistema nervoso centrale il contatto tra assone e oligodendrocita, l'attività elettrica e fattori solubili secreti dal neurone sono segnali essenziali per una corretta mielinizzazione.

Il processo di mielinizzazione prevede diverse fasi:

- 1) il contatto tra l'assone e i prolungamenti della cellula gliale;
- 2) la spiralizzazione dei prolungamenti oligodendrocitari intorno all'assone con la formazione di un numero pre-determinato di strati di mielina e il riconoscimento delle zone che non devono essere mielinizzate (nodi di Ranvier).

Il processo di mielinizzazione è finemente regolato dal momento che la sintesi dei costituenti della mielina e la sua formazione devono avvenire secondo tempistiche e in regioni specifiche del sistema nervoso centrale. Il differenziamento degli oligodendrociti e la mielinizzazione devono quindi essere regolati da meccanismi di trasduzione del segnale estremamente localizzati e specifici.

Ad oggi non si conoscono i segnali che determinano la mielinizzazione di un determinato assone. Alcuni studi dimostrano l'esistenza di un valore soglia del calibro assonale oltre il quale tale processo avrebbe luogo (46). Inoltre è necessario che l'assone abbia attività elettrica perché l'oligodendrocita possa iniziare il processo di mielinizzazione. Un altro elemento fondamentale per l'avvio della mielinizzazione è la formazione dei prolungamenti oligodendrocitari che favoriscono il contatto tra la cellula gliale e l'assone (46).

Anche la presenza degli astrociti sembra essere fondamentale nel processo di mielinizzazione, come dimostrato da Meyer-Franke e collaboratori nel 1999

(46). Essi hanno infatti osservato che gli astrociti favoriscono l'allineamento dei prolungamenti oligodendrocitari e la successiva adesione all'assone.

L'assone non solo è in grado di influenzare il processo di mielinizzazione, ma determina anche lo spessore della guaina mielinica. L'oligodendrocita, infatti, partecipa contemporaneamente alla mielinizzazione di assoni di differente diametro formando uno strato di mielina più sottile intorno agli assoni di calibro maggiore. Questa osservazione suggerisce che l'assone sia in grado di influenzare localmente il numero di lamelle formate da un singolo prolungamento oligodendrocitario (47).

Infine vi sono numerosi fattori solubili che possono influenzare la maturazione delle cellule gliali e il processo di mielinizzazione. Tra questi i principali sono gli ormoni tiroidei, l'ormone della crescita ed i neurosteroidi.

Gli ormoni tiroidei incrementano il differenziamento degli oligodendrociti e la sintesi della mielina, mentre l'ormone della crescita induce la proliferazione e la maturazione degli stessi. I neurosteroidi, in particolare il pregnenolone, il progesterone e i loro derivati solfatati, attivano l'espressione di geni che codificano per proteine mielina specifiche stimolando la formazione della guaina mielinica (48, 49, 50).

1.3 MIELINIZZAZIONE NEL SISTEMA NERVOSO PERIFERICO

Nel sistema nervoso periferico le cellule deputate alla mielinizzazione sono le cellule di Schwann.

1.3 a Cellule di Schwann:

Le cellule di Schwann avvolgono gli assoni nei nervi periferici e si dividono in due tipi: mielinizzanti e non mielinizzanti. Le cellule di Schwann mielinizzanti avvolgono gli assoni e formano le lamelle di mielina. Le cellule non mielinizzanti sono simili agli astrociti del sistema nervoso centrale e hanno funzioni di supporto e meccaniche. E' stato dimostrato che le cellule di Schwann sono indispensabili per la sopravvivenza neuronale durante lo sviluppo, possono avere un ruolo molto importante nella rigenerazione del nervo, anche se una loro iperproliferazione porta anziché ad un recupero funzionale alla formazione di tessuto cicatriziale e quindi alla perdita della funzionalità del nervo (51).

La formazione delle cellule di Schwann è un processo multistep. Dalla cresta neurale hanno origine i precursori delle cellule di Schwann, oltre ai precursori neuronali e ai precursori dei melanociti (Fig. 10). Da questo tipo cellulare si origina poi la cellula di Schwann immatura, che inizia ad assumere un distinto fenotipo simile alla cellula di Schwann matura, ovvero una forma appiattita e un nucleo allungato. Questi step che avvengono prima della nascita dell'individuo sono irreversibili. Un ulteriore differenziamento della cellula di Schwann immatura porta alla formazione delle cellule di Schwann mielinizzanti e non mielinizzanti. La formazione dell'uno o dell'altro tipo di cellula di Schwann è un processo reversibile e dipende innanzitutto dalla presenza di determinati segnali assionali (52).

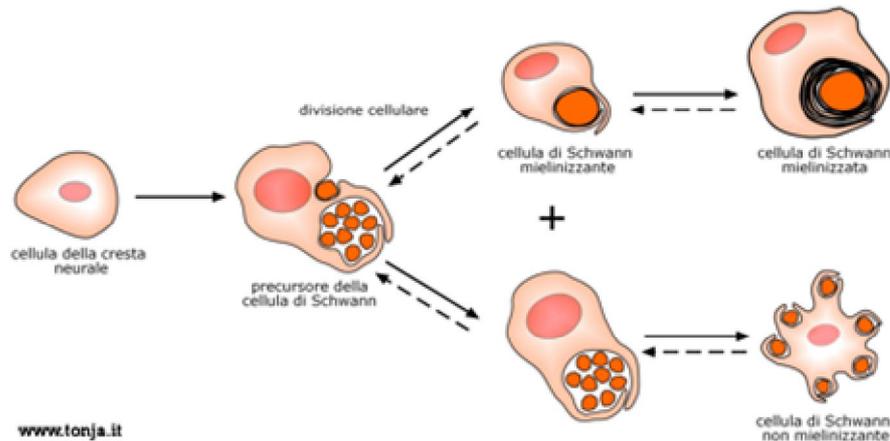


Fig. 10: Derivazione delle cellule di Schwann .

Le funzioni delle cellule di Schwann sono svariate (52):

- 1 Mielinizzazione assonale
- 2 Guida durante lo sviluppo neuronale
- 3 Supporto alla sopravvivenza neuronale
- 4 Controllo della funzionalità sinaptica, in quanto le cellule gliali possiedono recettori per i neurotrasmettitori
- 5 Regolazione omeostatica della concentrazione dei neurotrasmettitori e della concentrazione degli ioni.

1.3 b Processo di mielinizzazione nel snp

Nel sistema nervoso periferico la mielina è formata dal differenziamento della membrana plasmatica delle cellule di Schwann, la quale si arricchisce di galactosfingolipidi e acidi grassi saturati a catena lunga, che avvolgono l'assone in più strati (52). All'inizio del processo di mielinizzazione la cellula di Schwann avvolge l'assone in modo che questo risulti circondato dalla membrana plasmatica di tale cellula; nel punto in cui la porzione di membrana plasmatica che circonda la cellula di Schwann si riflette per avvolgere l'assone si forma una lamina, costituita da due tratti di membrana affrontati tra loro, nota come mesassone. Qui si ha in seguito un accrescimento continuo della membrana seguito dall'allungamento e dall'avvolgimento a spirale del mesassone attorno al assone. Inizialmente tra i giri concentrici del mesassone si interpongono strati di citoplasma della

cellula di Schwann ma in seguito il citoplasma viene escluso, gli avvolgimenti concentrici si fanno più serrati e le superfici citoplasmatiche delle membrane si accollano in modo sempre più stretto fino a formare lo strato di mielina compatta (Fig. 11, Fig. 12).

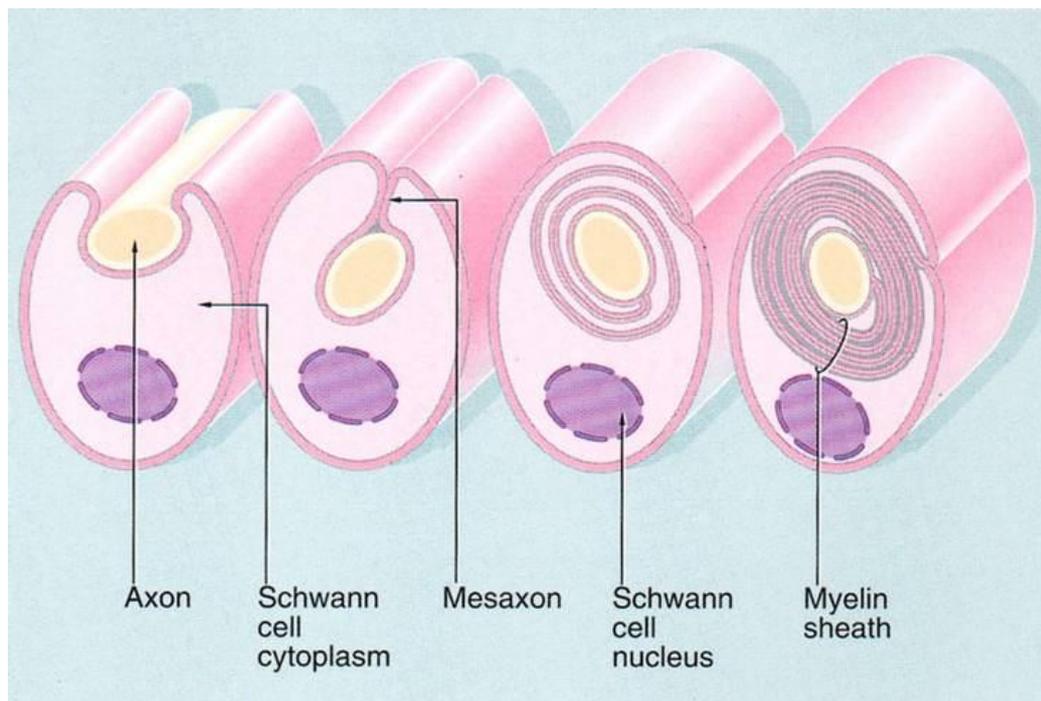


Fig. 11: Modalità di formazione della mielina nel sistema nervoso periferico

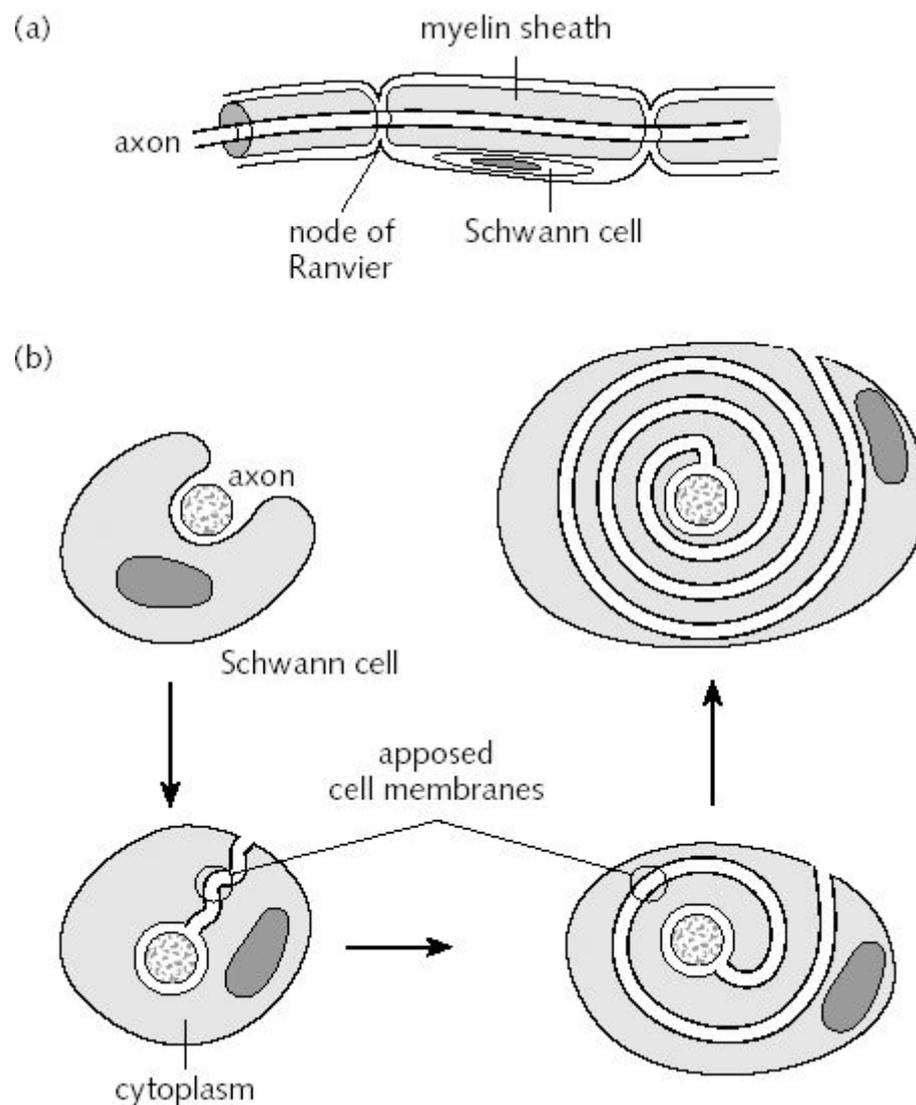


Fig. 12 Processo di mielinizzazione nel snp.

Il processo di mielinizzazione avviene in diverse fasi caratterizzate dall'espressione di specifici fattori di trascrizione, proteine della mielina e fattori di adesione nella cellula di Schwann. Innanzitutto la cellula di Schwann deve ricevere determinati segnali assonali, quali per esempio una dimensione dell'assone superiore a 70 μm e la presenza nell'assone di attività elettrica (53). Questi due segnali portano innanzitutto ad una iperproliferazione delle cellule di Schwann, che poi iniziano ad avvolgere l'assone. Avviene quindi una relazione del tipo 1:1 tra ciascuna cellula di Schwann e il suo segmento assonale. A questo punto la cellula di Schwann si allunga lateralmente lungo l'assone e depone la lamina basale lungo l'assone (54). Questo iniziale attacco della cellula di Schwann è mediato da molecole di adesione cellulari della famiglia della nectina (Nect1 o SynCAM) e delle

integrine. Dopo che la cellula di Schwann si è attaccata all'assone inizia la deposizione di componenti della membrana della mielina nei siti di contatto assone-cellula di Schwann (54).

Per dare inizio al processo di mielinizzazione, la cellula di Schwann deve overesprimere e downesprimere determinati fattori di trascrizione. In particolare ci sono 3 fattori di trascrizione fondamentali che indirizzano la cellula di Schwann verso una fase di mielinizzazione o ne arrestano il processo:

Krox20 è un fattore di trascrizione fondamentale per la trasformazione della cellula di Schwann da non mielinizzante a mielinizzante. Viene infatti attivato nelle cellule di Schwann prima dell'inizio della mielinizzazione. Topi knock out per Kox20 infatti non presentano mielinizzazione da parte delle cellule di Schwann (55).

Oct6: è un POU domain transcription factor anche conosciuto come soppressorecAMP inducibile POU (SCIP) o TST1, la cui espressione nelle cellule di Schwann viene indotta dalla foskolina e dal TGF beta1. E' espresso nei progenitori tardivi delle cellule di Schwann, ma non nelle mielinizzanti, dove è anzi un forte inibitore dei geni per la mielina. (56). Quindi Oct6 presenta due funzioni diverse: un ruolo positivo nello sviluppo precoce delle cellule di Schwann, ma regolatore negativo del processo di mielinogenesi (57).

Sox10 è una DNA binding protein espressa nelle cellule gliali. Agisce sinergicamente ad Oct6 e inibisce parzialmente l'attività di Krox20 nelle cellule di Schwann (55), inibendo quindi la mielinizzazione.

Una volta che è avvenuto il contatto tra cellula di Schwann e assone la cellula di Schwann si orienta verso un processo mielinogenico e viene indotta l'espressione di MAG e del galactosilcerabroside. Queste espressioni precedono l'espressione di P0 e MBP di circa una settimana (58).

Anche GalC e SGaIC sono marcatori precoci di mielinizzazione. Studi di immunofluorescenza hanno dimostrato che questi marcatori sono espressi sulla superficie delle cellule di Schwann un giorno prima dell'inizio della mielinizzazione, e sono importanti per la formazione della mielina compatta (58).

Una volta che è iniziato il processo di mielinizzazione vengono espresse tutte le proteine coinvolte nella formazione della mielina: PO, PMP22, MBP. Inoltre vi è in loco una sintesi di colesterolo, cereborosidi (GalC) e sulfatidi (SGalC).

I complessi meccanismi che danno origine al processo di mielinizzazione non sono stati ancora del tutto chiariti. Sembrano essere importanti nella regolazione del processo gli ormoni steroidei, in particolare il progesterone. Infatti è stato dimostrato che le cellule di Schwann sintetizzano progesterone che stimola la formazione della mielina nelle colture di neuroni sensitivi. Inoltre il progesterone è stato dimostrato attivare il promotore di PO e di PMP22 e accelerare il tempo di iniziale mielinizzazione e il tasso di sintesi della mielina (59).

Anche il TGF β 1 è un mediatore dell'interazione tra neurone e cellula di Schwann. Esso è secreto sia dai neuroni che dalle cellule di Schwann in coltura. Il trattamento con TGF beta aumenta la proliferazione di queste da sole in coltura, e promuove uno stadio premielinizzante, ma non di mielinizzazione attiva, caratterizzato da un aumento dell'espressione di NCAM e una diminuita affinità con NGFR, dall'induzione dell'espressione di Oct6 e l'inibizione di PO. Inoltre il trattamento con TGF β 1 diminuisce l'espressione di MAG, PO, MBP e GFAP nelle coculture di neuroni e cellule di Schwann (60). Da questi risultati si desume che il TGF β 1 è un regolatore negativo della mielinogenesi.

Un altro fattore importante per la promozione della mielinizzazione è il cAMP. Esso infatti è necessario per permettere l'espressione dei geni per le proteine della mielina in cellule di Schwann in coltura (61), oltre ad essere fondamentale come secondo messaggero per l'inizio del processo di mielinizzazione. Infatti agenti come la foskolina, che aumentano i livelli intracellulari di cAMP, aumentano anche l'espressione di numerosi geni correlati alla mielina in colture di cellule di Schwann (61). L'effetto del cAMP sulla mielinizzazione però dipende dal medium di coltura usato: infatti cAMP in presenza di mitogeni nel medium promuove la proliferazione delle cellule di Schwann anziché il loro differenziamento in cellule mielinizzanti, e quindi diminuisce la formazione della mielina (61).

Numerosi studi in vitro hanno dimostrato che le cellule di Schwann rispondono a precisi segnali assonali dati per esempio dalle Neureguline e dalle Neurotrofine (62).

Le neureguline comprendono una famiglia di epidermal growth factor-like ligands (EGFR) che interagiscono con i recettori tirosin chinasi ErbB per controllare numerosi aspetti dello sviluppo neuronale, quali la migrazione, la crescita e la mielinizzazione assonale. Tra le neureguline fondamentale è l'azione del fattore di crescita Neuregulina1 (NRG1) mediante il suo legame con ErbB3 ed ErbB4 ed il co-recettore ErbB2. La famiglia ErbB o epidermal growth factor receptor (EGFR) è una famiglia di 4 recettori tirosinchinasi strutturalmente correlati (63). Questi recettori hanno un dominio Epidermal Growth Factor Like del tipo ErbB che è presente nelle cellule di Schwann (64). La famiglia della Neuregulina 1 comprende più di 15 proteine associate alla membrana e secrete. In particolare ci sono 3 sottotipi di NRG1, il Tipo 1 (Heregulina) e il Tipo 2 (glial growth factor), entrambe secrete dall'assone in seguito ad un processamento proteolitico, e il Tipo 3 (SMDF) che funziona da segnale per la mielinizzazione (65). In particolare NRG1 Tipo1 e 2 associato alla membrana promuove la proliferazione delle cellule di Schwann, agendo quindi da mitogeno e assicurando un appropriato numero di cellule di Schwann (66, 67), senza direttamente promuovere la mielinizzazione. Il Tipo 3 è invece implicato nel differenziamento delle cellule di Schwann mielinizzanti e nel controllo della formazione di mielina. La NRG 1, espressa sulla superficie degli assoni, si lega ai recettori ErbB3-ErbB2 espressi sulle cellule di Schwann e funziona da segnale iniziale per la mielinizzazione (68, 69, 70, 71, 72).

Anche alcune neurotrofine come NGF, BDNF, NT3 e NT4-5 esercitano un ruolo fondamentale nella formazione della mielina in quanto sono coinvolte nel signaling che porta alla mielinizzazione, agendo sia sull'assone che sulle cellule di Schwann (Fig. 13). Esistono due classi di recettori che mediano il signalling delle neurotrofine: i recettori tropomyosin-related receptor (Trk) e il p75 neurotrophin receptor. In particolare tutte queste neurotrofine sia nella loro forma matura che nello stadio di pro-neurotrofine legano il pan-

neurotrophin receptor (NTR) p75, mentre mostrano alta affinità per diverse classi di Trk: NGF lega TrkA, BDNF e NT4-5 legano TrkB e NT3 lega TrkC.

L'NGF è un potente induttore di mielinizzazione nelle coculture di neuroni sensitivi e cellule di Schwann. Infatti mediante il legame con TrkA sugli assoni promuove la mielinizzazione da parte delle cellule di Schwann, probabilmente attraverso una regolazione della NRG1 tipo 3 (73, 74, 75, 76).

Anche il BDNF è coinvolto nel processo di mielinizzazione del SNP: inibisce la proliferazione delle cellule di Schwann e attraverso il legame con p75 sull'assone promuove la formazione della mielina (77). In particolare in questo caso è fondamentale l'espressione di p75 a livello assonale come signalling per la cellula di Schwann di inizio di mielinizzazione (78).

Se l'NGF e il BDNF hanno un'azione positiva sul processo di mielinizzazione, NT3, legandosi a TrkC sulle cellule di Schwann, inibisce la mielinizzazione da parte di queste. NT3 è stata invece dimostrata essere fondamentale per la migrazione e la proliferazione delle cellule di Schwann (79), ma per l'innescarsi del processo di mielinizzazione è necessaria una downpressione di NT3 e del suo recettore TrkC.

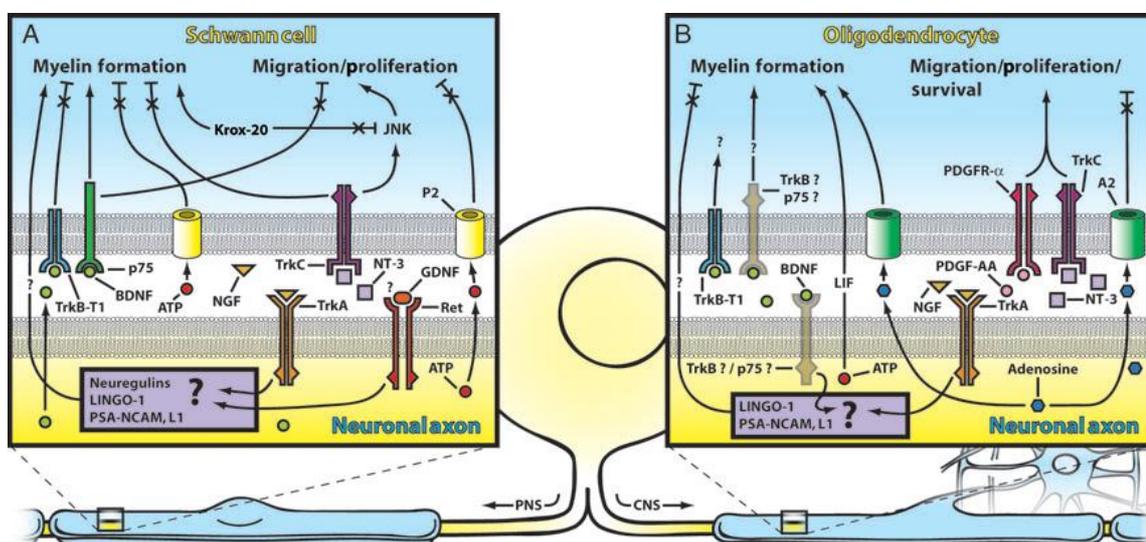


Fig. 13. Neurotrofine che promuovono/inibiscono la mielinizzazione.

1.4 MALATTIE DEMIELINIZZANTI

Le malattie demielinizzanti sono un gruppo eterogeneo di disordini neurologici che hanno in comune il danno selettivo a carico della mielina. Si parla di demielinizzazione in presenza di un danno acquisito a carico di una mielina di normale struttura, causato da diversi fattori eziopatogenetici, e che può essere primario (autoimmune) o secondario (ischemico, tossico, infettivo, dismetabolico). Inoltre esistono patologie geneticamente determinate in cui vi è una dismielinizzazione dovuta ad un errore metabolico nella costituzione della mielina. In queste patologie non viene costituita la mielina. Nelle patologie demielinizzanti invece si ha la perdita di mielina durante il corso della vita. In seguito della demielinizzazione si ha, a seconda del nervo interessato, perdita di sensibilità o di funzioni motorie e/o cognitive.

Ci sono numerose malattie demielinizzanti a carico sia del SNC che del SNP. Tra le malattie del sistema nervoso centrale la più conosciuta è la sclerosi multipla, ma sono presenti anche altre malattie più rare come la neurite ottica, la mielite traversa, la leucoencefalopatia multifocale progressiva e le leucodistrofie. Tra le malattie del SNP la più comune è la Sindrome di Charcot Marie Tooth, che rappresenta una famiglia di neuropatie demielinizzanti ereditarie.

La sclerosi multipla, chiamata anche sclerosi a placche, è una malattia infiammatoria cronica demielinizzante a patogenesi autoimmune (80, 81, 82). Nel corso della malattia la distruzione delle guaine mieliniche causa il blocco o rallentamento degli impulsi che vanno dal sistema nervoso centrale verso le diverse parti del corpo e viceversa. La sclerosi multipla colpisce circa tre milioni di persone nel mondo, mezzo milione in Europa e più di 50.000 in Italia. Le aree in cui la mielina è stata danneggiata vengono anche dette placche, da cui deriva l'appellativo sclerosi a placche. Le placche sono definite multifocali, in quanto variano sia in senso temporale, alcune placche possono regredire o aumentare con il passare del tempo, che in senso spaziale, in quanto possono comparire in diverse aree del SNC. L'eziologia della sclerosi multipla è di tipo autoimmune (83), quindi si ha una eccessiva risposta immunitaria e infiammatoria contro proteine della mielina come MBP e MOG.

Le cellule microgliali svolgono la funzione di APC ossia di cellule che presentano l'antigene e danno inizio alla reazione infiammatoria contro la mielina sostenuta da numerosi tipi cellulari:

- linfociti T autoreattivi (in particolare CD8+) attivati; giungono al tessuto nervoso dalla periferia attraversando la barriera ematoencefalica. Producono citochine pro infiammatorie come $INF\gamma$ e $TNF\alpha$.
- monociti; giungono al tessuto nervoso dalla periferia attraversando la barriera ematoencefalica; fagocitano i frammenti di mielina.
- linfociti B residenti; producono anticorpi.
- polimorfonucleati liberano sostanze citotossiche e citolitiche.

La mielina si disgrega in frammenti che vengono successivamente fagocitati da macrofagi e cellule della microglia attivata. Si assiste ad una proliferazione e attivazione di precursori oligodendrogliali che tentano senza successo di rigenerare la guaina mielinica (83).

La sclerosi multipla può presentare 3 decorsi clinici:

- 1) recidivante-remittente: È caratterizzata da una serie di attacchi a intervalli sempre più brevi;
- 2) secondaria progressiva: L'andamento è caratterizzato dalla riacutizzazione e recupero (inizialmente totale, poi parziale) dei sintomi ma, col passare del tempo, possono progredire i deficit anche nei periodi che intercorrono tra una ricaduta e l'altra. Riguarda circa il 30% delle persone affette da sclerosi multipla.
- 3) primaria progressiva: Un andamento primariamente progressivo è caratterizzato dal fatto che i segni e i sintomi si accumulano nel tempo in modo graduale senza la comparsa di un vero e proprio attacco e senza remissioni, causando però raramente invalidità permanente in quanto il decorso è molto lento. Questa forma colpisce circa il 10% dei malati.

Non esiste ancora una terapia specifica per la sclerosi multipla. I trattamenti sono mirati agli episodi acuti, alla prevenzione delle ricadute e al miglioramento generale del quadro sintomatologico.

Negli episodi acuti si usano i corticosteroidi che esercitano un potente effetto antiflogistico abbreviando la durata e accelerando la remissione dei sintomi. I corticosteroidi non si sono tuttavia dimostrati in grado di modificare il

decorso a lungo termine della malattia. Per prevenire le ricadute sono utilizzati farmaci immunomodulatori, quali i beta-interferoni con lo scopo di ridurre l'intensità con la quale il sistema immunitario attacca il sistema nervoso, e farmaci immunosoppressori come l'azatioprina, il metotrexate, la ciclofosfamida e il mitoxantrone, che bloccano la replicazione cellulare del sistema immunitario (84). Tra le recenti scoperte risultati interessanti si sono ottenuti con il Tysabri (natalizumab). Si tratta di un anticorpo monoclonale che impedisce la migrazione delle cellule B del sistema immunitario dal torrente circolatorio, nel sistema nervoso centrale. È stato approvato come farmaco terapeutico dalla commissione europea nel 2006. Un'altra possibile terapia viene dal Canada, dove c'è il più alto tasso di persone affette da sclerosi multipla: è un farmaco di nome fingolimod o FTY 720 che attualmente è in fase di sperimentazione (esattamente: terza fase). Il farmaco impedisce il passaggio dei linfociti attraverso la BEE (barriera emato-encefalica) in modo che non possano attaccare la mielina, indirizzandoli verso i linfonodi e la periferia.

Tutti questi farmaci diminuiscono la frequenza delle ricadute e la formazione di nuove placche, ma non sono in grado di contrastare a lungo termine la progressione della malattia (85). Inoltre la cronicità e la multifattorialità della SM pone grandi sfide nel campo delle terapie cellulari remielinizzanti (86). Nel caso delle terapie cellulari per questo tipo di malattie è necessario soddisfare due criteri: quantità illimitata di cellule e possibilità di raggiungere diversi distretti del sistema nervoso danneggiato allo stesso momento. Fin dagli anni settanta sono stati sviluppati numerosi studi al fine di riportare la mielina in aree demielinizzate del sistema nervoso. In particolare sono state trapiantate cellule di Schwann e progenitori di oligodendrociti. Queste cellule però pongono dei limiti quali un basso tasso di crescita in vitro e la possibilità di portare alla mielinizzazione solo in aree ristrette del sistema nervoso (). I progenitori degli oligodendrociti sono in grado, se trapiantati, di rimielinizzare placche demielinizzate croniche ma solo se viene indotta anche una reazione infiammatoria (87, 88, 89). Inoltre risulta difficile individuare i precursori degli oligodendrociti che, oltre a potere produrre mielina, sono anche in grado di migrare in diversi distretti del sistema nervoso (90). Anche

le cellule di Schwann rappresentano una fonte di cellule in grado di promuovere la mielinizzazione. Il principale vantaggio di queste cellule è che possono essere prelevate dalla biopsia del nervo periferico ed espanse, permettendo quindi un trapianto di tipo autologo. Inoltre visto che l'attacco autoimmune della SM è diretto contro antigeni specifici degli oligodendriociti, le cellule di Schwann sono resistenti a questo tipo di reazione. Sono state quindi trapiantate cellule di Schwann che si sono dimostrate essere in grado di riparare la guaina mielinica e di riportare la velocità di conduzione nervosa a livelli normali. Tuttavia la migrazione di queste cellule e la loro capacità di rimielinizzare viene fortemente inibita dalla presenza di astrociti. Visto che le placche demielinizzate sono circondate da astrociti, questa interferenza pone un grave problema per l'utilizzo delle cellule di Schwann come terapia per la SM (91, 92).

La Sindrome di Charcot-Marie Tooth (CMT), nota anche come Neuropatia motorio-sensitiva ereditaria, è una sindrome neurologica ereditaria a carico del sistema nervoso periferico (93). Deve il suo nome ai tre medici che per primi la descrissero: Jean-Martin Charcot, Pierre Marie, e Howard Henry Tooth. È una malattia progressiva che può portare ad esiti completamente differenti: da insignificanti variazioni nelle capacità motorie all'atrofizzazione degli arti (che arrivano ad assumere una caratteristica forma assottigliata) con una serie di effetti correlati, da difficoltà di deambulazione e dolori muscolari fino (in rari casi) alla necessità permanente di sedia a rotelle. La neuropatia può rivelarsi anche in età adulta.

Sulla base di differenze genetiche e sintomatiche si distinguono cinque tipi di patologia (94).

- CMT di tipo 1 (CMT1): tale variante si manifesta nell'80% dei casi di CMT ed è la più frequente. I sottotipi sono caratterizzati da sintomi comuni, come demielinizzazione, rilevabile attraverso la misurazione della velocità di conduzione nervosa. Si tratta di una patologia autosomica dominante. I due sottotipi più comuni sono la CMT1A, causata dalla duplicazione del gene per PMP22 e la CMT1B, causata da mutazioni del gene per P0.
- CMT di tipo 2 (CMT2): questa variante può colpire tra il 20% ed il 40% dei pazienti affetti da CMT. Anche la CMT di tipo 2 è una neuropatia

autosomica dominante, che colpisce in modo preponderante l'assone. La velocità di conduzione nervosa (NCV) risulta lievemente ridotta.

- CMT di tipo 3: malattia severa demielinizzante che inizia dall'infanzia, caratterizzata da mutazioni a carico di P0 e PMP22.
- CMT di tipo 4 (CMT4): molto rara. Comprende differenti sottotipi di neuropatie periferiche demielinizzanti motorie e sensitive, ciascuna delle quali è caratterizzata da un diverso tipo di mutazione.
- CMT legata al cromosoma X (X-linked) (CMTX): colpisce circa il 10-20% dei pazienti con CMT ed è di tipo dominante. Circa il 10% dei pazienti con CMTX presentano anche un'altra forma di CMT concomitante. E' caratterizzata da mutazioni puntiformi a carico del gene per la connessina 32.

Tutti e cinque i tipi sono caratterizzati da ulteriori sottotipi. Allo stato attuale non esistono cure, sebbene la CMT sia la malattia a più vasta trasmissione genetica tra le sindromi neurologiche ereditarie, con 36 casi di insorgenza ogni 100.000 nascite.

Data l'alta incidenza delle patologie demielinizzanti nella popolazione di tutto il mondo, e la scarsità delle terapie oggi disponibili, che, come già detto, non riescono a promuovere la rimielinizzazione in tutti i distretti del sistema nervoso interessati dalla demielinizzazione, lo studio delle cellule staminali nell'ambito dei processi rigenerativi neuronali e di mielinizzazione assonale riveste un ruolo di notevole interesse per migliorare la vita dei pazienti affetti da queste malattie. In particolare, tra il pool di cellule staminali esistenti, le cellule staminali mesenchimali possono essere ottime candidate per la cura di queste malattie, grazie alla loro facile reperibilità e rapida espansione in vitro. Esse sono in grado sia di promuovere la rimielinizzazione che di esercitare un ruolo protettivo e antiapoptotico verso i neuroni. Inoltre, a differenza delle cellule di Schwann e degli oligodendriociti, hanno una elevata capacità di homing nell'area danneggiata dopo somministrazione endovenosa e sono in grado di inibire la risposta infiammatoria (95).

1.5 MORTE CELLULARE NEL SISTEMA NERVOSO

La morte cellulare rappresenta un evento comune nel nostro organismo, in particolare in distretti come la cute e il tratto gastroenterico dove tale fenomeno, in aggiunta ad una continua rigenerazione, assicura l'adeguato ricambio delle popolazioni cellulari. Nel caso del Sistema Nervoso invece la morte neuronale non è accompagnata da sostituzione delle cellule mancanti per proliferazione (96)

La morte cellulare rappresenta uno dei fenomeni osservabili con maggior frequenza tanto nel CNS che nel PNS. Durante l'ontogenesi i neuroni vengono generati per mitosi in numero di gran lunga maggiore rispetto a quello che sarà il corredo neuronale definitivo. I neuroni in esubero, così come le cellule gliali, vengono eliminati attraverso quella che viene definita morte cellulare programmata o apoptosi (96). Nel Sistema Nervoso la morte cellulare da un punto di vista morfologico assume due forme principali:

- Apoptosi, che evoca la caduta delle foglie dagli alberi in autunno, indica una modalità di morte cellulare caratterizzata dalla rottura del DNA in frammenti di circa 180-200 paia di basi (bp) e dal suo addensarsi sul versante interno delle lamina nucleare. La cellula si raggrinzisce e si frammenta in parti circondate da membrana e contenenti organuli citoplasmatici intatti.
- Necrosi, questa modalità è caratterizzata dal rigonfiamento della cellula e degli organuli citoplasmatici con successiva lisi della membrana e fuoriuscita del contenuto cellulare che causa fenomeni infiammatori.

Dal punto di vista biochimico, la differenza fondamentale tra le due modalità risiede nel fatto che l'apoptosi è un fenomeno attivo che richiede sintesi proteica e apporto energetico mentre la necrosi è un evento accidentale subito passivamente dalle cellule, caratterizzato dalla cessazione del metabolismo energetico (96).

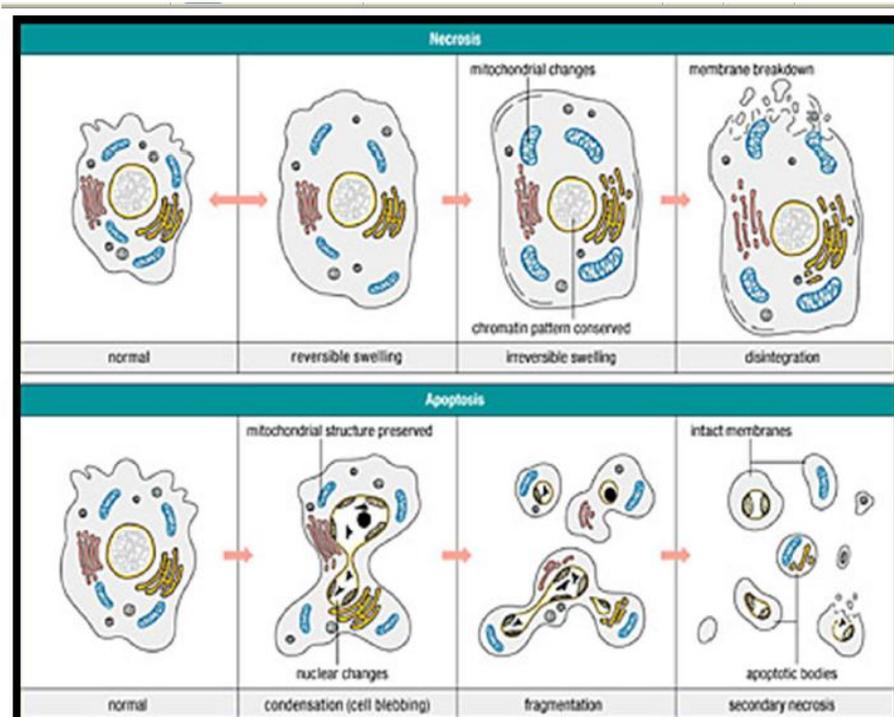


Figura 14: Differenze morfologiche tra necrosi e apoptosi.

Si ritiene che la morte cellulare durante lo sviluppo del Sistema Nervoso avvenga essenzialmente per apoptosi, mentre la necrosi rappresenti una modalità di morte cellulare occasionale in risposta a stimoli lesivi. Questa distinzione non è netta, poiché parte dei fenomeni di eliminazione neuronale durante lo sviluppo possono avvenire per necrosi. D'altra parte stimoli lesivi esterni molto violenti possono condurre a necrosi, ma gli stessi stimoli apportati in dosi inferiori possono innescare il programma di suicidio cellulare apoptotico. Per questo motivo oggi l'apoptosi viene invocata non solo per spiegare fenomeni regressivi programmati durante l'ontogenesi, ma anche come meccanismo mediante cui diverse *noxae* patogene possono agire a livello del Sistema Nervoso (96). L'apoptosi nel Sistema Nervoso in via di sviluppo è legata soprattutto alla mancanza dei fattori di crescita quali l'NGF, il BDNF e l'NT 3 e 4 che normalmente sono disponibili a livello delle strutture bersaglio, cioè di quelle popolazioni neuronali verso le quali i neuroni candidati al suicidio inviano il proprio assone. La mancata disponibilità di questi fattori innescerebbe il processo di autodistruzione delle cellule.

Si deve considerare che la mancanza di fattori neurotrofici non costituisce il solo stimolo adeguato per innescare gli eventi che conducono all'apoptosi (96).

L'apoptosi può essere innescata anche da sostanze tossiche, farmaci, radicali liberi dell'ossigeno e radiazioni ionizzanti che causano danni al DNA o gravi stress al reticolo endoplasmatico o ai mitocondri. Tutte queste condizioni, qualora superino una certa soglia, possono indurre la morte per apoptosi (96).

Alcune tra le più importanti patologie neurodegenerative riconoscono come evento patogenetico un'aumentata suscettibilità di alcuni neuroni di particolari distretti all'apoptosi, come la Sclerosi Laterale Amiotrofica, l'Alzheimer, nel morbo di Parkinson e nella Corea di Huntington (96).

Per alcuni tipi cellulari, tra cui i neuroni, il contatto cellula-cellula e/o cellula-matrice extracellulare costituisce un fattore di sopravvivenza; il segnale, mediato da una chinasi della famiglia FAK (chinasi di adesione focale) si propaga da zone specializzate della superficie cellulare in cui alcune proteine di membrana che mediano il rapporto con il citoscheletro. Qualora si verifichi la mancanza di contatto, queste cellule si auto-percepiscono come "inutili" o potenzialmente metastatiche e il suicidio cellulare (che prende il nome di *anoikis*, dal greco "senza casa") sarebbe la risposta altruista a tale percezione (97). Questo meccanismo è anche quello che consente di eliminare, nel corso dello sviluppo embrionale, le cellule in eccesso che non abbiano stabilito le giuste connessioni (97).

1.5 a APOPTOSI:

Il processo apoptotico fu identificato per la prima volta da John Kerr nel 1965 il quale studiando i diversi quadri di morte cellulare che si verificavano negli epatociti, descrisse un nuovo tipo di morte con caratteristiche diverse da quelle della necrosi. L'apoptosi, o morte cellulare programmata, è un processo attivo ed evolutivamente conservato che, a partire da stimoli di diversa natura, conduce all'autodigestione della cellula con tipiche alterazioni morfologiche e biochimiche (97).

A livello morfologico una cellula che ha attivato il pathway apoptotico va incontro ad una riduzione progressiva del volume cellulare e alla perdita di contatto con le cellule adiacenti. Sono inoltre evidenti la progressiva condensazione della cromatina e la frammentazione della cellula in globuli acidofili, i cosiddetti corpi apoptotici, che contengono frammenti di DNA (98). A livello molecolare la cellula apoptotica è caratterizzata dal processamento del DNA in frammenti discreti, poi estrusi sotto forma di corpi apoptotici, ad opera di endonucleasi $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ dipendenti (99). La frammentazione del DNA procede attraverso più stadi. In una prima fase il DNA genomico viene processato in frammenti di circa 300 paia di basi, successivamente degradati durante la seconda fase in frammenti di 50 paia di basi (90). Durante la fase finale si verificano invece tagli a livello delle regioni "linker" tra nucleosomi, che portano alla comparsa di multimeri di 180-200 paia di basi. Questa particolare frammentazione è responsabile del tipico aspetto del DNA genomico (DNA laddering). Anche gli organelli subiscono delle importanti modificazioni. Ad esempio nei mitocondri si osserva il danneggiamento delle membrane con dissipazione del gradiente elettrochimico e rilascio di attivatori mitocondriali di proteasi. Vi è quindi il disaccoppiamento della catena respiratoria dal sistema di produzione di ATP e deplezione dei cofattori ridotti GSH e NADPH_2 . Il processo continua con la generazione di ROS (Reactive Oxygen Species) e rilascio di Ca^{2+} e proteine mitocondriali, come il citocromo c. Il DNA mitocondriale, a differenza del DNA nucleare, non appare processato dalle endonucleasi $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ dipendenti (99, 100). La membrana plasmatica, pur rimanendo integra nelle fasi iniziali del processo, subisce alcune modificazioni. Una delle alterazioni più importanti è la traslocazione dei residui di fosfatidilserina (PS) dal lato interno della membrana, dove sono normalmente presenti, al lato esterno. I macrofagi sono poi in grado di riconoscere e legare in modo specifico i residui PS esposti e di fagocitare successivamente sia le cellule in apoptosi che i corpi apoptotici ormai formati (101, 102). Al contrario di quanto avviene nella necrosi infatti, durante l'apoptosi la distruzione della cellula non è accompagnata da un processo infiammatorio e il tutto si esaurisce con l'ordinata rimozione dei corpi apoptotici da parte del sistema macrofagico. Con il procedere del fenomeno

apoptotico la membrana, ancora intatta, forma delle estroflessioni, i “blebbing” e nelle fasi finali si ha la sua rottura, nota come necrosi secondaria. A questo punto il processo degradativo è ormai irreversibile e la cellula va incontro a morte (103).

Esistono due meccanismi attraverso i quali viene attivato il pathway apoptotico:

- Estrinseco o mediato da recettori ad esempio Fas e TNRF1.
- Intrinseco o mitocondriale

Entrambe i pathways convergono nell’attivazione delle caspasi.

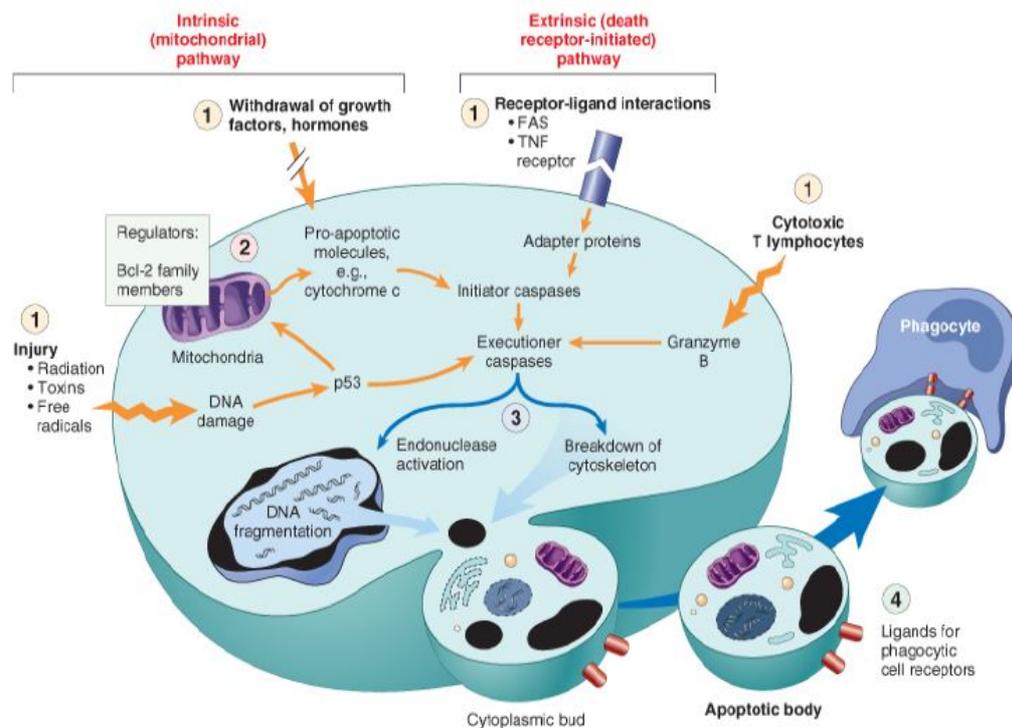


Figura 15: Attivazione dell’apoptosi per via intrinseca ed estrinseca.

1.5 b CASPASI

Le caspasi sono una famiglia di cistein-proteasi che contengono nel sito attivo un residuo di cisteina e agiscono a livello di un residuo di acido aspartico

(Cysteine-Aspartate Specific Protease). Sono sintetizzate dalla cellula sotto forma di zimogeni e rappresentano i principali effettori del processo apoptotico. L'inibizione delle caspasi abolisce infatti l'apoptosi indotta da qualsiasi stimolo (104). Dall'analisi della sequenza e da studi cristallografici è emerso che tutte le caspasi, con peso molecolare compreso tra 30 e 50 kDa, condividono la stessa struttura. Ogni zimogeno è infatti costituito da 4 diversi domini:

- un dominio N-terminale di lunghezza variabile tra le diverse caspasi;
- una subunità grande che contiene il sito attivo con il residuo di cisteina all'interno di una sequenza conservata QACXG ed è separata dal dominio N-terminale da un residuo di aspartato;
- una subunità piccola C-terminale;
- una regione linker contenente uno o due residui di aspartato che unisce le subunità grande e piccola.

L'attivazione delle caspasi avviene attraverso un taglio proteolitico a livello dei residui di aspartato, vengono così eliminati il dominio variabile N-terminale e la regione linker. L'assemblaggio di due subunità grandi e di due subunità piccole forma un tetramero che costituisce l'enzima attivo. Ciascun dimero contiene un sito attivo formato da amminoacidi di entrambe le subunità che lo compongono (105). Nonostante l'alto grado di omologia strutturale, le caspasi sono estremamente selettive e riescono a riconoscere il proprio substrato grazie alla presenza di un tetrapeptide, specifico per ciascuna caspasi (105).

Le caspasi possono essere distinte in due diversi tipi: le caspasi iniziatrici, poste a monte della cascata apoptotica, e le caspasi effettrici. Le caspasi iniziatrici (caspasi 8, 9, 10) sono caratterizzate da un dominio N-terminale molto lungo che contiene diversi motivi che permettono l'interazione con le molecole attivatrici attraverso degli adattatori, come Apaf-1. Le caspasi effettrici (caspasi 3, 4, 5, 6, 7, 11, 12, 13) hanno invece un dominio N-terminale corto e, grazie alla presenza di un tetrapeptide specifico, sono riconosciute ed attivate dalle caspasi iniziatrici. Anche le caspasi iniziatrici contengono il tetrapeptide che poi riconoscono nei loro substrati, e questo dato suggerisce la possibilità di un'autoinduzione (105).

2 CELLULE STAMINALI:

Le cellule staminali sono cellule indifferenziate in grado sia di autorigenerarsi, mantenendo quindi stabile il pool di cellule staminali nell'organismo, sia di differenziare in cellule mature con funzioni altamente specifiche (106, 107). Il differenziamento è definito come il processo attraverso cui una cellula indifferenziata acquisisce le caratteristiche di una cellula specializzata. Durante il differenziamento, attraverso un meccanismo complesso e finemente regolato, alcuni geni vengono attivati e altri inattivati, dando come risultato lo sviluppo di strutture che permettono alla cellula di assolvere a determinate e specifiche funzioni.

La cellula staminale si può dividere secondo tre diverse modalità (Fig. 16), che si differenziano in base alla progenie che viene originata (107):

1. con una divisione simmetrica che dà origine a due cellule progenitrici figlie;
2. con una divisione asimmetrica che dà origine ad una cellula staminale figlia ed ad una progenitrice;
3. con una divisione simmetrica che dà origine a due cellule staminali figlie.

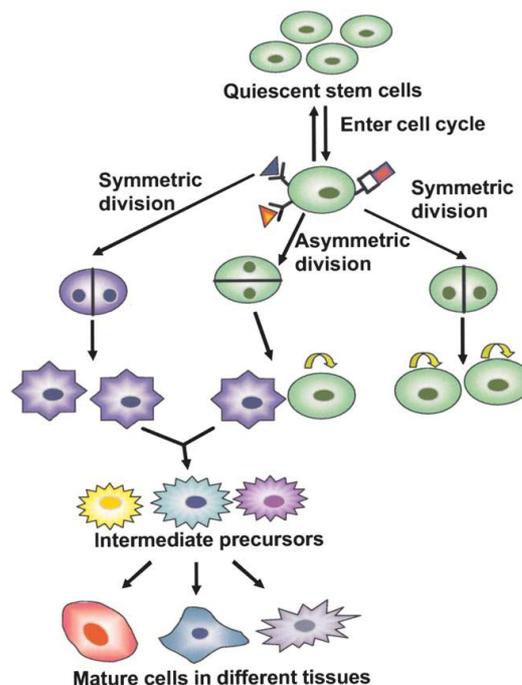


Fig 16: Modalità di divisione di una cellula staminale.

Per una definizione più completa di cellula staminale è necessario prendere in esame alcune caratteristiche fondamentali della cellula quali self-renewal e potenziale differenziativo (107).

2.1 a "Self-renewal"

Il self-renewal è la capacità delle cellule staminali di espandersi indefinitivamente in vitro sotto opportune condizioni, mantenendo uno stato indifferenziato e di pluripotenzialità (capacità di generare tutti i tipi cellulari derivati dai tre foglietti embrionali). Queste caratteristiche sono proprie delle cellule staminali embrionali prelevate dalla *inner cell mass* di blastocisti preimpianto. Le cellule staminali adulte al contrario vanno incontro, dopo un certo numero di passaggi in coltura, ad un processo di arresto della crescita noto come "senescenza replicativa", probabilmente legato ad un progressivo accorciamento dei telomeri durante continue subcolture in vitro (108) o comunque all'assenza di attività telomerasica (109).

2.1 b Potenziale differenziativo

Vi sono 4 misure di base del potenziale differenziativo di una cellula staminale (110) (Fig. 17):

- 1.** Totipotente: può formare tutte le cellule/tessuti che contribuiscono alla formazione di un organismo, ne sono un esempio l'uovo fertilizzato o zigote, compreso il trofoblasto.
- 2.** Pluripotente: può formare quasi tutte le cellule e i tessuti di un organismo (ad esempio le cellule staminali embrionali e le cellule germinali embrionali), escluso il trofoblasto.
- 3.** Multipotente: può formare un piccolo numero di cellule o tessuti, che sono in genere ristretti ad un particolare foglietto germinale circa la loro origine.
- 4.** Unipotente: cellula di un unico lineage differenziativo che può formare un solo tipo cellulare.

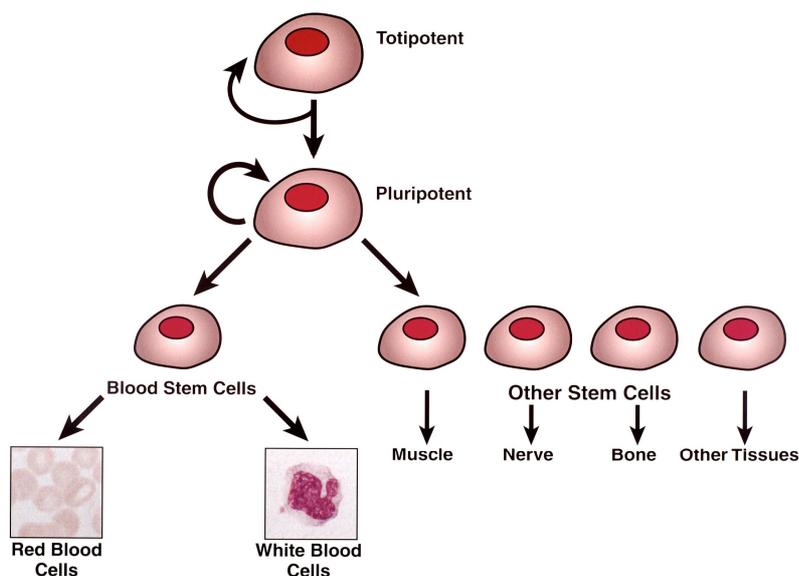


Figura 17: Rappresentazione gerarchica dei diversi subsets di cellule staminali.

2.2 FONTI DI CELLULE STAMINALI

Le cellule staminali possono essere sostanzialmente suddivise in due categorie (111): le cellule staminali embrionali, derivate dalla inner cell mass di blastocisti, e le cellule staminali adulte derivate da tessuti fetali o adulti.

Per meglio comprendere le differenze tra i diversi tipi di cellule staminali, occorre far riferimento alle fasi precoci dell'embriogenesi (112) (Figura 18).

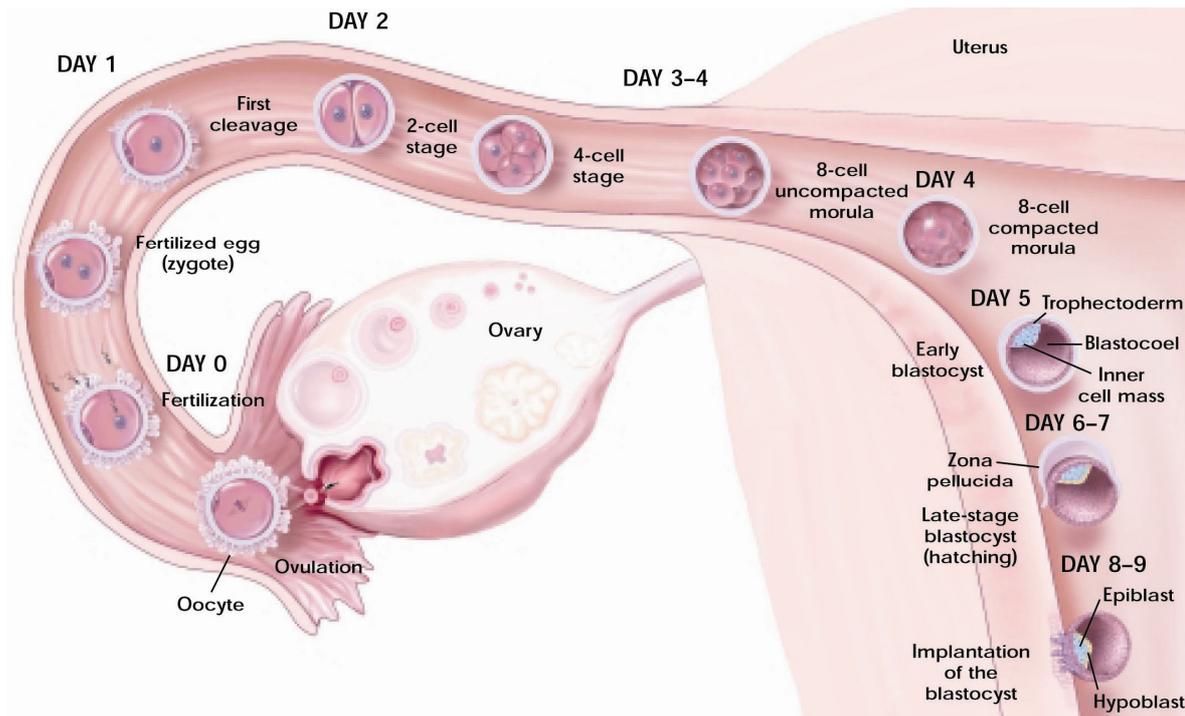


Fig. 18 Fasi precoci dell'embriogenesi nell'uomo.

Dopo la fecondazione, i nuclei aploidi della cellula uovo e dello spermatozoo si fondono a formare un singolo nucleo con un numero diploide di cromosomi. Lo zigote va incontro al fenomeno della segmentazione che conduce alla formazione di una struttura compatta a grappolo di cellule nota come morula. Ognuna delle 32-128 cellule della morula è totipotente in quanto può dar vita a tutti i tipi di cellule dell'embrione e a tutti i tessuti extraembrionali necessari per l'impianto dell'embrione stesso nella parete uterina. Durante il percorso della morula lungo l'ovidotto, le cellule continuano a proliferare dando vita ad una struttura sferica cavitaria nota come blastocisti o blastula. Durante gli ultimi giorni nell'ovidotto e i primi giorni in utero, un certo numero di cellule delaminano dallo strato superficiale della blastula. Lo strato esterno di cellule (circa 70) forma il trofoblasto che darà origine alle strutture extra-embriinarie, ovvero placenta. Nella cavità è presente un cluster di cellule (circa 30 cellule) che viene chiamato inner cell mass da cui origineranno i tre foglietti embrionali. Questo cluster di cellule è la fonte delle cellule staminali embrionali. Le

cellule dissociate dalla inner cell mass sono pluripotenti dal momento che possono dar vita a centinaia di tipi cellulari presenti nell'organismo adulto, ma non alle membrane extraembrionali o alla placenta.

Nell'uomo il periodo che intercorre dalla fecondazione dell'uovo all'impianto nella parete uterina è di circa 8-9 giorni. Presto, dopo l'impianto, la blastocisti si invagina. Un fenomeno noto come gastrulazione determina la formazione dei tre foglietti germinali embrionali: l'ectoderma, l'endoderma e il mesoderma. Le cellule staminali sono presenti in ognuno dei tre foglietti germinali, ma lo spettro di progenie derivata da queste cellule staminali è più limitata rispetto alle cellule derivate dalla inner cell mass, e pertanto vengono descritte come multipotenti più che pluripotenti. Le cellule di un certo foglietto non transdifferenziano durante l'embriogenesi, come invece è stato osservato per alcune cellule staminali adulte, la cui plasticità ha suscitato un notevole interesse.

2.3 CELLULE STAMINALI EMBRIONALI

Le cellule staminali embrionali (Embryonic Stem cells, ES cells) sono state isolate da blastocisti preimpianto di topi, primati umani e non umani (113, 114). Sono cellule pluripotenti, cioè capaci di generare tutti i tipi cellulari fetali e adulti in vivo e in vitro (Figura 19), ma non il trofoblasto.

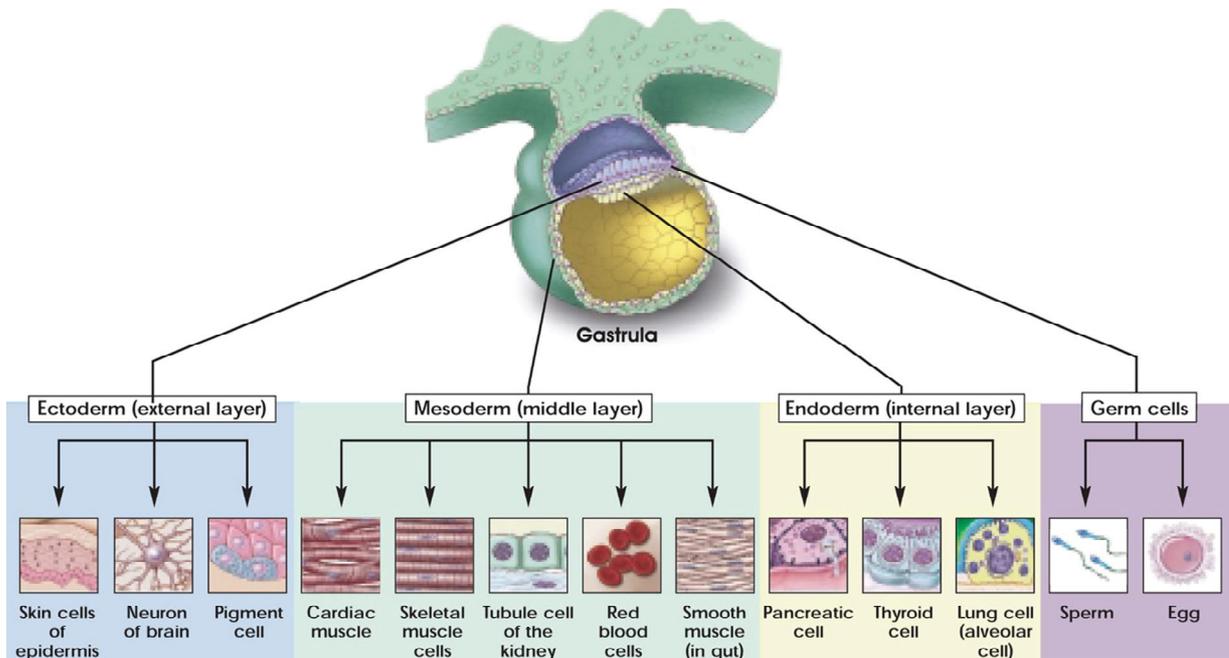


Figura 19: Sviluppo dei tessuti umani: derivazione embrionale.

In presenza del Leukaemia Inhibitory Factor (LIF) o di un feeder layer costituito da fibroblasti di topo irradiati, queste cellule possono essere mantenute in coltura in uno stato indifferenziato ed espanse in maniera indefinita. Ciò consente di avere una fonte potenzialmente illimitata di cellule staminali pluripotenti (115).

Sottraendo il LIF, le cellule ES differenziano spontaneamente a formare distinti aggregati cellulari detti corpi embrioidi, contenenti cellule differenziate della linea ectodermica, endodermica e mesodermica (116).

Manipolando le condizioni di coltura sotto le quali le cellule ES differenziano, è stato possibile controllare i pathways differenziativi e perciò generare colture arricchite di un precursore specifico per una certa linea cellulare. Utilizzando questo approccio, le cellule staminali embrionali di

topo sono state usate per generare una serie di fenotipi distinti tra cui precursori ematopoietici (117) cellule neuronali (118) adipociti (119), cellule muscolari (120) miociti (121) condrociti (122) isole del pancreas (123) osteoblasti (124).

Embryonic Germ Layer	Differentiated Tissue
Endoderm	Thymus Thyroid, parathyroid glands Larynx, trachea, lung Urinary bladder, vagina, urethra Gastrointestinal (GI) organs (liver, pancreas) Lining of the GI tract Lining of the respiratory tract
Mesoderm	Bone marrow (blood) Adrenal cortex Lymphatic tissue Skeletal, smooth, and cardiac muscle Connective tissues (including bone, cartilage) Urogenital system Heart and blood vessels (vascular system)
Ectoderm	Skin Neural tissue (neuroectoderm) Adrenal medulla Pituitary gland Connective tissue of the head and face Eyes, ears

Tabella 2: Progenie derivata dai diversi foglietti germinali.

Il possibile utilizzo delle cellule staminali nell'ambito della terapia medica è finalizzato alla riparazione di tessuti danneggiati e/o alla loro ricostituzione (125) Le cellule ES tuttavia sollevano problemi etici e morali riguardo all'identità e la distruzione dell'embrione stesso. Inoltre in esperimenti in vivo hanno mostrato di possedere un certo grado di tumorigenicità e il loro utilizzo eterologo comporta un elevato rischio di risposta immunitaria. Le cellule staminali adulte al contrario non hanno manifestato tendenza a trasformazioni maligne e possono essere trapiantate autologamente, caratteristiche che le rendono più idonee ad applicazioni terapeutiche (126).

2.4 CELLULE STAMINALI ADULTE

Le cellule staminali adulte sono cellule staminali multipotenti residenti in specifiche nicchie o compartimenti tissutali, importanti nel mantenimento dell'omeostasi del tessuto di appartenenza e nel garantire un certo grado di rigenerazione spontanea (127, 128). In genere, le cellule staminali generano uno o più tipi cellulari intermedi prima di raggiungere il loro stato differenziativo completo (129). Le cellule intermedie sono dette precursori o progenitori e sono presenti nei tessuti fetali o adulti. Sono cellule parzialmente differenziate, dette anche committed in quanto differenziano verso un determinato tipo cellulare (Fig. 20).

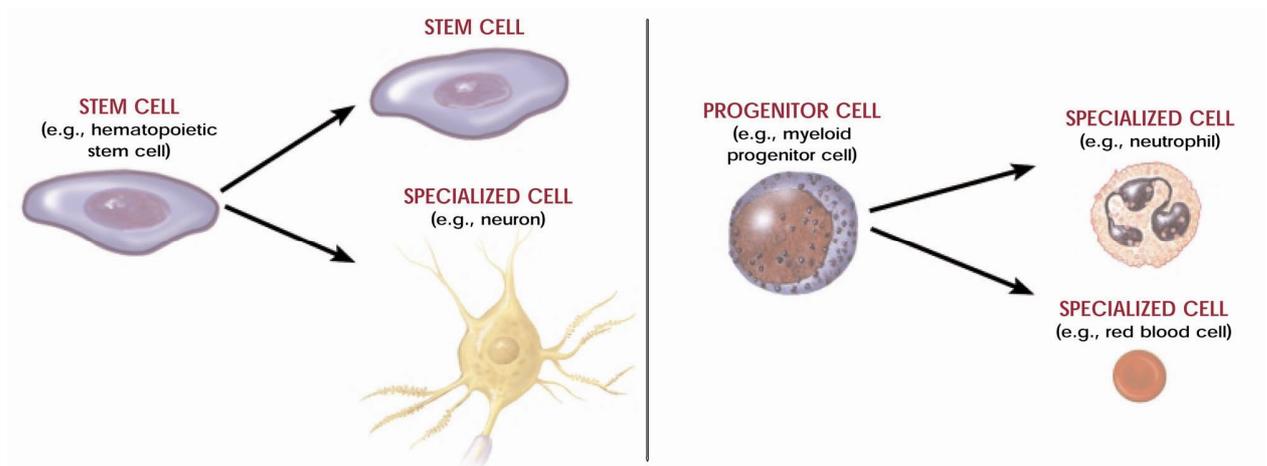


Fig. 20: Cellule staminali e cellule progenitrici.

Tuttavia è stato dimostrato che alcune cellule staminali adulte presentano un'elevata plasticità ossia una capacità differenziativa limitata non solo al tessuto d'origine, ma anche a cellule e tessuti di diversa derivazione embrionale (130).

Le cellule staminali adulte sono state individuate in molti organi e tessuti di derivazione ectodermica, mesodermica o endodermica: area sub-ventricolare dell'ippocampo (131), midollo osseo (132), sangue periferico (133), polpa dentale (134), midollo spinale (135), vasi sanguigni (136), muscolo scheletrico (137), epitelio della cute (138) e del sistema digerente (139),

cornea (140), fegato (141) e pancreas (142). I metodi attuali per la loro caratterizzazione si basano sulla determinazione dei markers di superficie e sulle osservazioni circa i loro patterns differenziativi. Le cellule meglio caratterizzate sono le cellule staminali derivanti dal midollo osseo, che si classificano essenzialmente in due categorie: le cellule staminali ematopoietiche che danno origine a tutte le linee cellulari del sangue, e le cellule staminali stromali non ematopoietiche (cellule mesenchimali) che danno origine a vari tessuti connettivi, quali il tessuto osseo, cartilagineo e adiposo.

2.5 PLASTICITA' DELLE CELLULE STAMINALI ADULTE

È stato dimostrato che alcune cellule staminali adulte hanno un'elevata plasticità (Fig. 21), ovvero che non siano solo multipotenti ma possano differenziare anche in cellule e tessuti di diversa derivazione embrionale (143).

I possibili meccanismi di differenziamento verso lineages differenti da quello di origine sono i seguenti (143):

- a) Transdifferenziamento: cellule staminali tessuto-specifiche possono riprogrammarsi in cellule staminali di altri tessuti.
- b) Dedifferenziamento: cellule staminali tessuto-specifiche possono tornare ad uno stadio più immaturo e cambiare lineage di differenziamento.
- c) Fusione cellulare: cellule staminali tessuto-specifiche possono fondersi con altri tipi cellulari a formare degli eterocarion e determinando una conversione del profilo di espressione genica della cellula staminale d'origine a quello della cellula "partner" di fusione.

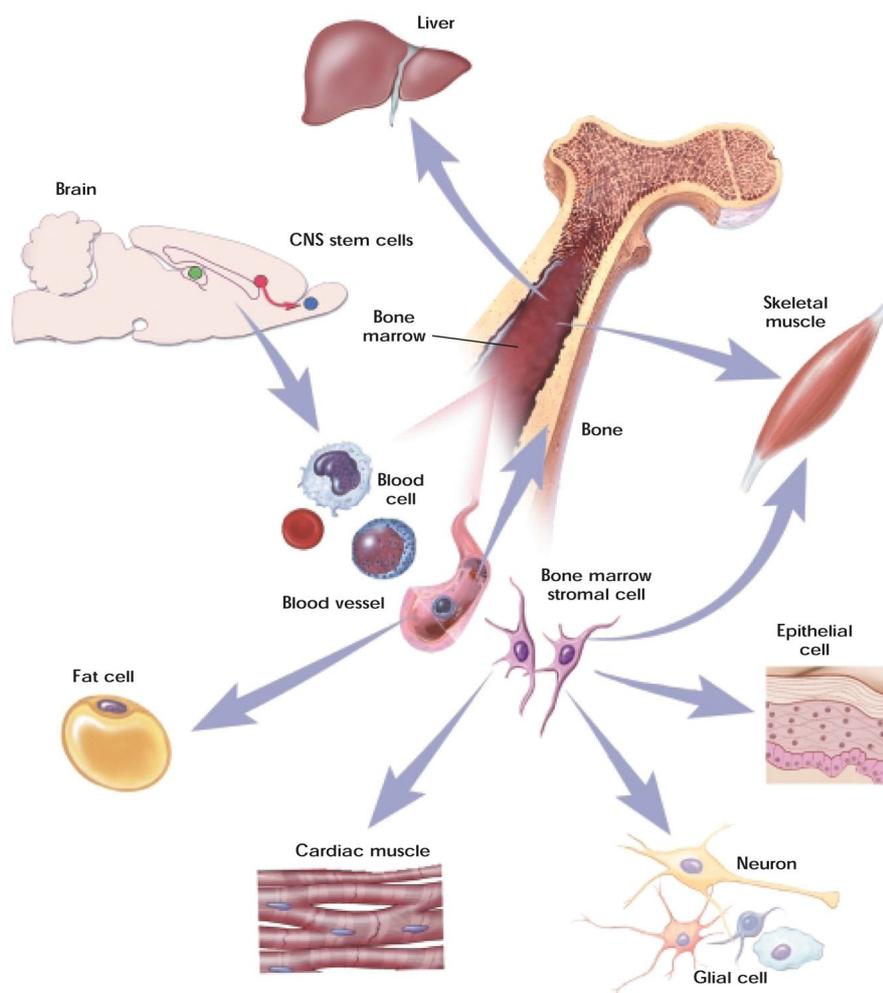


Figura 21: Plasticità delle cellule staminali adulte.

La cellula staminale adulta, una volta differenziata in un determinato lineage, assume la morfologia e i markers di superficie propri di quella linea cellulare. Se vengono trapiantate in vivo dimostrano di integrarsi nel tessuto maturo dell'ospite e di assumere tutte le sue caratteristiche (143). Gran parte degli studi in vivo che dimostrano la plasticità delle cellule staminali adulte coinvolgono cellule derivanti dal midollo osseo (144, 145), dal cervello (146) e in minor misura dal muscolo scheletrico (147). Per esempio è stato dimostrato che cellule derivate dal midollo osseo (mesoderma) possono differenziare in altri tessuti di derivazione mesodermica come il muscolo scheletrico, il muscolo cardiaco o il fegato, ma anche in tessuto nervoso che invece è di derivazione ectodermica (148).

Per le cellule staminali neuronali (ectoderma) isolate da tessuto cerebrale adulto è stato dimostrato il loro differenziamento in cellule ematopoietiche (mesoderma) (149).

In generale, gli studi sulla plasticità suggeriscono che le popolazioni di cellule staminali nei mammiferi adulti non siano entità fisse e che, in seguito all'esposizione ad un nuovo microambiente, siano in grado di popolare altri tessuti e di differenziare in altri tipi cellulari.

Tra i numerosi tipi di cellule staminali adulte oggi individuate, le cellule staminali mesenchimali sono di notevole interesse per la loro elevata plasticità e la facile reperibilità, che le propongono come possibile fonte di cellule per la terapia di numerose malattie.

3.CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI (MSC)

Il midollo osseo contiene due categorie di cellule staminali: le cellule staminali ematopoietiche (HSC, Hemopoietic Stem Cell), che danno origine alle cellule ematiche, e le cellule staminali mesenchimali (MSC, Mesenchymal Stem Cell), che regolano l'emopoiesi attraverso interazioni cellula-cellula e rilasciando fattori di crescita (150, 151). La funzione delle MSC è di supportare l'attività ematopoietica del midollo osseo ma anche quella di fornire nuove cellule per la riparazione, il rinnovo e l'accrescimento dei tessuti di origine mesengena.

Le MSC sono state isolate e purificate dal midollo osseo umano per la prima volta dal gruppo di Caplan a metà degli anni '80 (152). Tale scoperta deriva da studi condotti negli anni '70 su cellule indifferenziate di embrioni di pollo: esse erano in grado, sotto opportune condizioni, di differenziare in diversi tessuti quali quello muscolare, cartilagineo e osseo (153, 154). Da altri studi su ossa bovine demineralizzate (155) è emersa l'esistenza di proteine con attività osteoinduttiva ovvero le Bone Morphogenetic Protein (BMP). La somministrazione di tali molecole induceva la formazione di osso o cartilagine negli animali da esperimento, suggerendo la possibilità che anche nel tessuto adulto potessero esistere progenitori multipotenti. Queste cellule furono chiamate "cellule staminali mesenchimali" data la loro capacità di differenziare nel lineage mesengeno (156) (osteociti (157), condrociti (158), adipociti (159). Grazie all'analisi delle MSC durante l'ontogenesi, è emerso che le regioni Aorto-Gonado-Mesonefriche (AGM), il fegato fetale e il midollo osseo neonatale e adulto possiedono cellule staminali progenitrici per linee cellulari mesenchimali (160).

Le MSC sono presenti a livello del tessuto adiposo, muscolare, sinoviale (161), nel sangue periferico (162) e nel cordone ombelicale (163), ma la fonte di MSC più accessibile è il midollo osseo, in cui rappresentano lo 0,01-0,0001% delle cellule nucleate nell'adulto. Le MSC sono state isolate anche da sangue fetale, milza, polmone fetale, villi corionici della placenta e dal liquido amniotico. Ciò suggerisce l'esistenza di un esteso network di MSC, rifornito dalle MSC mobilizzate dal midollo osseo in base alle necessità.

Esse sono presenti nel sangue circolante, il che suggerisce la capacità dei progenitori di muoversi attraverso i tessuti (164).

3.1 ISOLAMENTO DELLE MSC

Le MSC vengono isolate dal midollo osseo grazie alla loro capacità di aderire al substrato di plastica, a differenza delle cellule staminali ematopoietiche, con lo svantaggio di ottenere eterogeneità cellulare nei primi passaggi in coltura (165). Un metodo alternativo per isolare le MSC è l'utilizzo dell'anticorpo monoclonale Stro1 (166).

Le MSC formano colonie aderenti fibroblast-like quando vengono coltivate in siero fetale di vitello e possono essere espanse in presenza di vari fattori di crescita. Studi dettagliati hanno mostrato che la coltura in vitro delle MSC è un processo che consiste di tre fasi: una fase lag di adattamento iniziale (3-4 giorni) seguita da una rapida espansione (fase log) e quindi una successiva fase stazionaria (167, 168).

Dal punto di vista immunofenotipico le MSC sono state caratterizzate e definite dall'International Society for Cell Therapy come cellule negative per i markers di superficie ematopoietici quali CD34, CD45, CD14, CD31, CD33 e HLA-DR e positive per CD105, CD73 e CD90 (169, 170).

3.2 RUOLO DELLE MSC NELLO SVILUPPO DEL SISTEMA EMOPOIETICO

L'emopoiesi, ossia la formazione e la maturazione di tutte le cellule del sangue, ha inizio nell'AGM (Aorto-Gonado-Mesonefro) a partire dal decimo giorno di gestazione nel topo e dal trentacinquesimo giorno nell'uomo. Altri siti ematopoietici sono il sacco vitellino, la placenta e il fegato fetale. Studi recenti hanno dimostrato un aumento delle MSC circolanti nel primo trimestre di vita e un loro declino nel secondo trimestre per la loro successiva localizzazione a livello del fegato fetale. E' quindi probabile, data la loro colocalizzazione con le HSC, che le MSC abbiano il compito di favorire l'homing delle HSC verso il sito ematopoietico (171). Durante lo

sviluppo si verifica uno spostamento della sede dell'emopoiesi che nell'individuo adulto si localizza nel midollo osseo.

Le prime evidenze dell'importanza del ruolo delle MSC nel supportare l'emopoiesi arrivarono dalle osservazioni di Friedenstein il quale dimostrò che la somministrazione contemporanea di MSC e HSC in topi dopo total body irradiation accelerava il recupero del sistema emopoietico rispetto al trapianto delle sole HSC (172). Lavori più recenti hanno dimostrato che le MSC cotrapiantate con le HSC erano in grado di migliorare il recupero delle HSC (173, 174).

Le MSC sono in grado di regolare la sopravvivenza, il self-renewal, la migrazione e il differenziamento delle HSC attraverso diversi meccanismi quali l'interazione tra cellule o la produzione di fattori di crescita e chemochine (175).

3.3 PROPRIETA' IMMUNOMODULATORIE DELLE MSC

Un'altra caratteristica delle MSC, oltre alle capacità di rinnovamento e riparazione dei tessuti, è la loro proprietà immunomodulatoria che, secondo studi condotti negli ultimi anni, può costituire una possibile strategia di cura per malattie su base autoimmune quali la Sclerosi Multipla (SM)(176). Gli studi condotti in vitro sulle caratteristiche immunologiche delle MSC indicano che esse sono ipoimmunogeniche in quanto esprimono solo l'MHC I e non l'MHC II; inoltre sono in grado di indurre anergia nei linfociti T anche in condizioni di non compatibilità immunologica (176).

Le MSC sono in grado di inibire la maggior parte delle cellule coinvolte nella risposta immunitaria. Esse infatti hanno un'azione immunosoppressiva sulle diverse classi di cellule T, sulle cellule B, ma anche sul differenziamento e sulle funzioni delle cellule dendritiche. Non sono ancora stati ben chiariti i meccanismi alla base dell'attività immunosoppressiva delle MSC. Per tale funzione sembrano essere importanti sia il contatto diretto tra MSC e cellule del sistema immunitario, sia il rilascio da parte delle MSC di fattori solubili come il transforming growth factor (TGF β 1), hepatocyte growth factor (HGF), prostaglandina E₂ (PGE 2) e indoleamina 2,3 diossigenasi

(IDO) (176). Inoltre anche l'interferone gamma (IFN γ) prodotto dai linfociti T attivati sembra essere importante per l'attività immunosoppressiva delle MSC (177).

Sono stati anche effettuati studi su animali con EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis), ovvero immunizzati contro specifici componenti degli oligodendrociti e della mielina. Questo è un modello molto usato per lo studio della sclerosi multipla e per quanto riguarda la terapia con le MSC ha dato interessanti risultati. Nel lavoro di Zappia et al 2005 (176) su animali EAE è stato dimostrato che le MSC migliorano il decorso della malattia se somministrate prima dell'immunizzazione o all'inizio della malattia, non hanno effetto se invece vengono somministrate a malattia avanzata. Il miglioramento del decorso della malattia è dovuto ad una interferenza di queste nella risposta immunitaria degli animali malati. Infatti come già detto le MSC inibiscono la proliferazione dei linfociti T inducendone anergia e inattivazione e diminuiscono l'infiltrazione e la proliferazione dei macrofagi. Nel lavoro di Gerdoni 2007 (178) è inoltre stato dimostrato che le MSC somministrate a ratti EAE diminuiscono gli infiltrati infiammatori, la demielinizzazione e la perdita assonale, ma non transdifferenziano le cellule nervose o gliali, dimostrando anche in questo caso il miglioramento della malattia a causa dell'interferenza delle MSC con il sistema immunitario piuttosto che ad un intervento diretto delle MSC sul processo di rimielinizzazione.

3.4 DIFFERENZIAMENTO DELLE MSC

Il differenziamento delle MSC in cellule del lineage mesengenic (Fig. 22), oltre ad essere un evento fisiologico nell'organismo adulto, può essere indotto in vitro mediante l'applicazione di specifici protocolli.

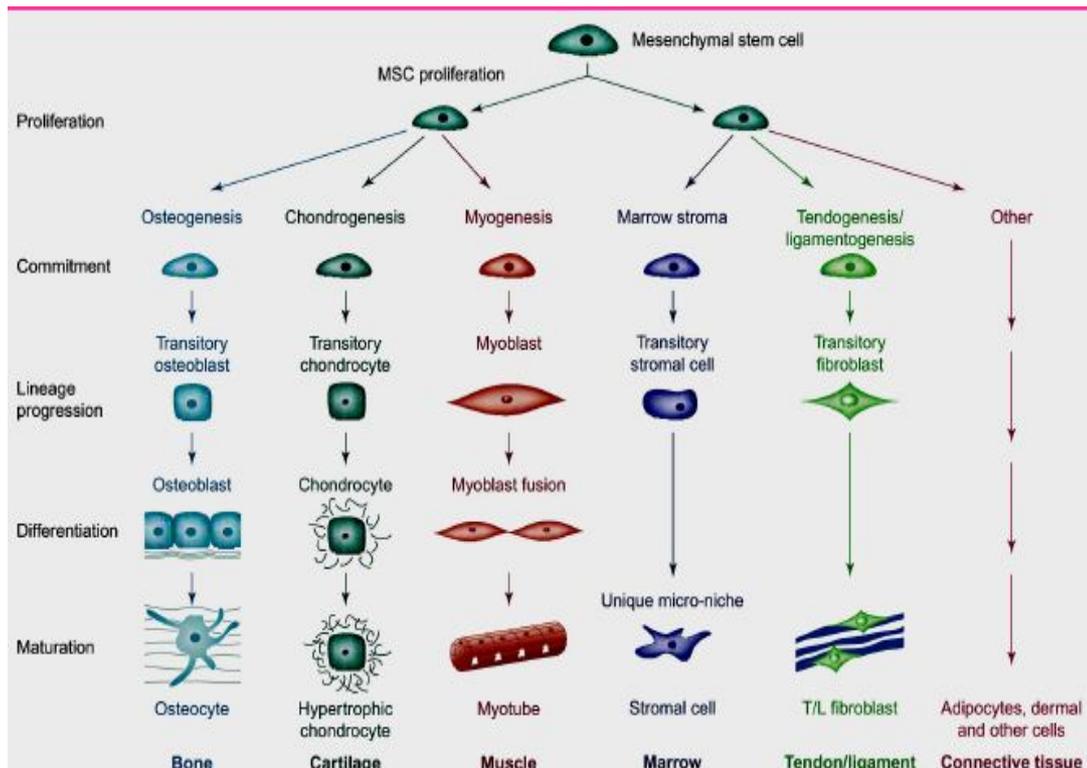


Figura 22: Differenziamento mesengenic delle MSC.

Per quanto riguarda il differenziamento osteoblastico, dalle MSC originano gli osteoblasti e gli osteociti ossia la componente cellulare dell'osso.

In letteratura sono riportati diversi protocolli per il differenziamento in vitro delle MSC in senso osteoblastico e la maggior parte prevede l'utilizzo del desametasone (glucocorticoide), della vitamina C (antiossidante) e del β glicerolfosfato (donatore di gruppi fosfato) in terreno di coltura addizionato con siero fetale bovino (179, 180).

Per quanto riguarda il differenziamento in senso condrocitico, le MSC differenziano inizialmente in condroblasti i quali in seguito a successive

divisioni mitotiche formano aggregati di condroblasti strettamente addossati che crescono e iniziano la sintesi della sostanza fondamentale e di materiale extracellulare fibroso. Il differenziamento delle MSC è stato ottenuto coltivando le cellule in presenza di fattori condrogenici, principalmente l'acido ascorbico e il TGF β_1 (181) o TGF β_3 (182).

In ultimo il differenziamento delle MSC in vitro in senso adipocitico è ottenuto mediante l'applicazione di diversi protocolli che prevedono l'utilizzo di un terreno ad alto contenuto di glucosio e di un mix di sostanze quali il desametasone, l'isobutilmetilxantina (IBMX), l'indometacina e l'insulina, in combinazioni e dosi variabili (180, 181, 183, 184).

Negli ultimi anni è stato tuttavia dimostrato il potenziale differenziativo multi-lineage di molti tipi di cellule staminali, incluse le MSC. Esse possono non solo differenziare in tessuti mesodermici, ma anche acquisire caratteristiche di altri lineage cellulari come delle cellule endoteliali, neuronali e dell'endoderma (185). Questa capacità può dipendere dalla riprogrammazione dell'espressione genica nelle MSC e, in altre situazioni, da meccanismi indipendenti attivati da fattori solubili.

Particolarmente interessanti risultano i lavori in cui si riporta la capacità delle MSC di differenziare in vitro in cellule del tessuto nervoso, mediante l'utilizzo di diversi agenti differenziativi. Questi lavori indicano che l'esposizione delle MSC a specifici agenti denaturanti, antiossidanti o a fattori di crescita sia in grado di alterare la loro morfologia e il profilo trascrizionale, inducendo l'espressione di specifiche proteine del lineage neurale (185, 186, 187, 188, 189, 190, 191). Tuttavia alcuni autori ritengono che questo tipo di differenziamento possa essere semplicemente un artefatto o il frutto di una fusione cellulare e non di trans-differenziamento (192); infatti i cambiamenti osservati non portano le MSC a diventare neuroni funzionanti dotati di potenziale elettrochimico e i markers che vengono definiti specifici dei precursori neurali come la nestina in realtà sono espressi anche durante lo sviluppo del muscolo scheletrico.

3.5 APPLICAZIONI TERAPEUTICHE DELLE MSC

Le cellule staminali mesenchimali, date le loro caratteristiche, rappresentano uno dei tipi di cellule staminali più adatti all'utilizzo nel trattamento di molte patologie degenerative. La facile isolabilità, coltura e stabilità fenotipica, nonché la loro multipotenzialità e ipoimmunogenicità conferiscono a queste cellule un enorme potenziale terapeutico.

Le MSC possono essere utilizzate in generale in tutti gli ambiti di applicazione della medicina rigenerativa, secondo diversi protocolli e vie di somministrazione. La medicina rigenerativa è quella branca della medicina che si occupa di ricostituire cellule e tessuti danneggiati, sia in situ che in vitro.

Una prima possibile applicazione delle MSC nell'ambito della medicina rigenerativa è l'ingegneria tissutale, che consente una ricostruzione ex vivo di tessuti danneggiati in seguito a traumi o patologie grazie alla disponibilità di scaffold tridimensionali, biocompatibili e biodegradabili. Su tali scaffold vengono adagiate le cellule mature o staminali del paziente e coltivate in bioreattori che guidano la formazione di tessuti o organi come il fegato, il cuore, la cartilagine, il tessuto osseo e adiposo (193). Un esempio dell'utilizzo delle MSC nell'ambito dell'ingegneria tissutale è riportato in un lavoro di Kon e colleghi pubblicato nel 2000 (194) dove si dimostra che il trapianto di cellule stromali del midollo osseo autologhe poste su uno scaffold poroso di idrossiapatite accelera il riparo di un difetto osseo in un modello animale. Anche per il trattamento delle tendinopatie sono in studio nuovi scaffold e materiali biocompatibili che possano supportare in vitro una rigenerazione del tendine da parte delle MSC (195).

L'ingegneria tissutale rappresenta una via alternativa per l'ottenimento di tessuti ed organi per i trapianti in mancanza di un numero sufficiente di donatori e per le limitazioni attribuibili al rigetto immunologico.

Le MSC inoltre possono essere trapiantate nei pazienti con diversi tipi di deficit in due modi: impianto focale per malattie localizzate e trapianto sistemico.

Per quanto riguarda il primo metodo di somministrazione, alcuni trial clinici mostrano il successo dell'iniezione locale di cellule staminali mesenchimali autologhe espanse ex-vivo per il trattamento di grandi difetti ossei e per il riparo di difetti cartilaginei (193,195).

Recentemente sono state utilizzate le MSC anche in un piccolo numero di pazienti affetti da malattie coronariche (196, 197). Le cellule iniettate sono state ben tollerate e hanno promosso un recupero funzionale dei pazienti. Tuttavia tali risultati necessitano di essere confermati da trials clinici randomizzati con un adeguato numero di pazienti. Sono anche state trapiantate le MSC in animali con insufficienza renale acuta dopo essere state co-coltivate con le cellule renali danneggiate dell'animale. In questo caso si è osservato un differenziamento delle MSC in cellule tubulari e il loro trapianto dopo differenziamento ha promosso un recupero della funzionalità renale (198).

La seconda via di somministrazione delle MSC è il trapianto sistemico. E' stato compiuto uno studio sull'uomo in cui sono stati esaminati gli effetti del trapianto sistemico di MSC allogeniche in un paziente affetto da osteogenesi imperfetta. I risultati hanno mostrato la capacità di homing delle cellule iniettate verso il tessuto osseo e la conseguente produzione di collagene normale da parte delle stesse (164). Sono stati riportati anche casi di trapianto ben tollerato di MSC allogeniche e di miglioramenti del quadro clinico in pazienti affetti dalla sindrome di Hurler e da anemia anaplastica idiopatica severa (164). Altri studi promettenti sono ancora a livello di modello animale. Lo studio di Nagaya et al. riporta che, in seguito ad infarto miocardio (199), le MSC iniettate per via endovenosa migrano alla verso la zona danneggiata e mostrano una marcatura positiva per marker cardiomiocitici. Importante è anche la dimostrazione che le MSC migrano solo nella regione di infarto e non nella regioni sane adiacenti, migliorando il recupero funzionale dell'animale. Un altro studio compiuto su ratti a cui è stato indotto il diabete di tipo 1 e sono state trapiantate a livello sistemico le MSC ha dimostrato che queste sono in grado di rigenerare le cellule delle isole pancreatiche e di diminuire il danno renale causato dal diabete (200).

Infine le MSC possono essere utilizzate come target cellulare per la terapia genica, ovvero l'ingegnerizzazione delle MSC per fare in modo che producano determinate proteine e fattori (201). In particolare è stata dimostrata l'efficacia delle MSC umane trasfettate con il gene codificante per il BDNF nel ridurre il danno ischemico in un modello murino di occlusione transiente dell'arteria cerebrale media (201).

Un altro lavoro ha dimostrato che il trapianto di MSC trasfettate con il gene delle tirosina idrossilasi porta ad un aumento dei livelli di dopamina a livello dello striato in un modello animale di malattia di Parkinson (202).

Infine un altro lavoro scientifico dimostra che la somministrazione intracerebrale di MSC di ratto geneticamente modificate per produrre l'interleuchina 2 (IL 2) umana in ratti 3 giorni dopo l'inoculazione di un glioma, prolunga notevolmente la vita di questi animali rispetto ai controlli grazie all'inibizione della crescita tumorale effettuata dalle MSC (203).

L'utilizzo delle MSC in terapia ha mostrato quindi risultati promettenti in trial clinici di fase I, oltre che in molti modelli animali (198, 199, 202, 203, 204). Risultano comunque indispensabili ulteriori informazioni riguardo all'efficacia terapeutica delle cellule trapiantate, alla sicurezza e tollerabilità a lungo termine. Sono necessari inoltre nuovi studi che permettano di migliorare l'homing di queste cellule in specifici siti e di limitare il loro potenziale differenziativo verso uno specifico lineage cellulare.

3.6 MSC NELLA CURA DELLE MALATTIE NEURODEGENERATIVE

L'elevata plasticità delle MSC rende queste cellule molto interessanti per il trattamento di numerose malattie, in particolare per la cura delle malattie neurodegenerative e in pazienti con danno a livello cerebrale.

Per queste patologie sembra indispensabile o il trapianto eterologo delle MSC o una aumentata mobilitazione di queste dal midollo osseo del paziente stesso mediante specifici protocolli clinici. Numerosi studi hanno dimostrato l'elevata capacità di homing delle MSC somministrate e il loro successivo differenziamento nei siti specifici di danno cellulare, o comunque il loro ruolo trofico e di promozione della rigenerazione nervosa. Questi studi accompagnati a studi in vitro in cui si dimostra l'elevata capacità differenziativa e di supporto delle MSC le rendono estremamente interessanti per la cura di numerose patologie.

Per quanto riguarda il danno cerebrale, molti studi hanno dimostrato un miglioramento funzionale dopo somministrazione di MSC sia a livello sistemico che locale a seguito di danno cerebrale traumatico (205, 206, 207). Per quanto riguarda il trapianto sistemico, nel lavoro di Mahamod et al (208) le MSC iniettate per via endovenosa dopo danno cerebrale di tipo traumatico migrano a livello cerebrale, differenziano in cellule gliali e neuroni, come dimostrato dalla marcatura con GFAP e Tuj1, e promuovono la proliferazione cellulare endogena, determinando in parte il recupero funzionale. In un altro lavoro dello stesso gruppo le MSC iniettate sempre per via endovenosa dopo danno cerebrale di origine traumatica migliorano la funzionalità cerebrale, localizzandosi attorno alla lesione e promuovendo anche un aumento della densità vascolare (208)

Per quanto riguarda il trapianto intracerebrale nel lavoro di Zhao et al 2001 (209) è stato dimostrato che le MSC trapiantate nella zona cerebrale infartuata migliorano la funzionalità cerebrale ma solo poche di queste cellule esprimono marcatori gliali e neurali. Questo lavoro dimostra che più che il differenziamento in senso neurale sembra essere importante la secrezione di fattori neurotrofici, come BDNF ed NGF, per il miglioramento

della funzionalità cerebrale. Anche Chopp e colleghi (210) utilizzando un modello sperimentale murino di ictus hanno dimostrato l'azione terapeutica delle MSC nel CNS. I ratti sono stati sottoposti ad occlusione transiente dell'arteria medio-cerebrale (MCAO) per 2 ore e in seguito sono state iniettate le MSC a livello della zona ischemica dello striato. Il trattamento ha mostrato un miglioramento statisticamente significativo delle funzioni neurologiche (sوماتосensoriali e motorie) 14 giorni dopo il MCAO negli animali ischemici trattati con le MSC rispetto ai controlli (210).

In un lavoro è stata anche dimostrata la fusione delle MSC iniettate a livello cerebrale con cellule del Purkinjje in topi con Niemann Pick disease tipo 3 (211). Dopo la fusione le MSC-neuroni possiedono attività elettrica e presiedono alla promozione del network neuronale con trasmissione sinaptica funzionale.

Le MSC sono anche state utilizzate per trattare i danni al livello del midollo spinale. Nello studio di Hofstetter et al (212) MSC trapiantate in un modello di danno del midollo spinale differenziano in senso neuronale a livello dei marcatori espressi, ma tuttavia non mostrano potenziale elettrofisiologico, anche se dopo somministrazione delle MSC si ha un certo recupero funzionale. Questo risultato suggerisce che le MSC possono determinare un miglioramento della patologia senza necessariamente differenziare in neuroni e/o cellule gliali, ma supportando la sopravvivenza di questi mediante per esempio secrezione di fattori trofici. In un altro studio di danno al midollo spinale con somministrazione delle MSC a livello del liquido cerebrospinale è stato dimostrato un miglioramento funzionale senza differenziamento in senso neuronale o gliale (213), suggerendo che le MSC possano produrre dei fattori trofici che stimolano il riparo della lesione. Questi risultati sottolineano la capacità delle MSC di promuovere un miglioramento funzionale indipendentemente dall'espressione dei marcatori indici di differenziamento

Sempre analizzando il possibile utilizzo delle MSC nelle patologie neurodegenerative, sono stati condotti degli studi su animali in seguito a danno al nervo sciatico. Nel lavoro di Coronel et al è stato dimostrato che le MSC trapiantate dopo avere indotto un danno a livello del nervo sciatico

migrano a livello dei gangli della radice dorsale (214) e che diminuiscono l'allodinia termica e meccanica (215). Nel lavoro di Cuevas et al 2002 (216) le MSC trapiantate in sede di nervo sciatico sezionato miglioravano la funzionalità nervosa, come dimostrato dal miglioramento nel punteggio del walking trak test. Nel lavoro di Liu X 2009 (217) è stato dimostrato che le MSC indotte al fenotipo neurale perdono questo fenotipo se iniettate in siti di danno al midollo spinale, anche se sono in grado di promuovere la crescita assonale. Questo lavoro dimostra ancora una volta che il recupero funzionale promosso dalle MSC può essere indipendente da un loro differenziamento neurale. Anche nel lavoro di Pan Hung Chuan 2006 (218) è stato dimostrato il ruolo fondamentale dei fattori neurotrofici secreti dalle MSC derivate dal liquido amniotico per il recupero del nervo sciatico danneggiato, anche se con il trapianto di MSC overesprimenti BDNF si è osservato che queste promuovono la crescita assonale e la crescita e lo sviluppo di neuroni serotoninergici e sensitivi, ma non si è ottenuto un recupero funzionale. Questo risultato suggerisce che il meccanismo attraverso cui le MSC promuovono un miglioramento funzionale non è solo la secrezione di BDNF, ma probabilmente oltre al BDNF sono necessari altri fattori trofici.

3.7 MSC E MALATTIE DEMIELINIZZANTI

La demielinizzazione è un fenomeno caratteristico di numerose malattie come la Sclerosi Multipla e la Charcot Marie Tooth, a seguito di traumi al midollo spinale ed infarti, oltre ad essere recentemente stata associato ad altre malattie neurodegenerative come l'Alzheimer, l'invecchiamento e disordini psichiatrici come la schizofrenia (219, 220, 221). Processi di rimielinizzazione promuovono la ricostituzione della conduzione saltatoria degli assoni, e migliorano deficit neuromotori. Il trattamento della demielinizzazione è particolarmente auspicabile mediante tecniche di replacement cellulari di cellule mielinogeniche, in quanto queste cellule trapiantate hanno un compito molto più semplice rispetto al trapianto dei

neuroni: non necessitano di estendere processi e ripristinare le connessioni neurali, o rilasciare specifiche dosi di neurotrasmettitori (222).

La principale e più comune e conosciuta malattia demielinizzante è la sclerosi multipla, la cui intrinseca complessa natura, in particolare la sua multifattorialità e la sua cronicità, pone grandi sfide per terapie cellulari. Per l'utilizzo delle terapie cellulari devono essere soddisfatti 2 criteri fondamentali: ottenere un illimitato numero di cellule e la possibilità di raggiungere diverse aree del sistema nervoso centrale e periferico contemporaneamente. Sin dagli anni settanta sono state utilizzate varie cellule per la ricostituzione del processo di mielinizzazione, come oligodendriociti e cellule di Schwann. Tuttavia questo tipo di cellule pone dei problemi: un basso tasso di crescita ed espansione in vitro e la capacità di mielinizzare solo ristrette aree del cervello (223, 89). Le proprietà funzionali e morfologiche delle cellule staminali potrebbero superare queste difficoltà rappresentando in futuro una terapia alternativa di approccio alla sclerosi multipla. All'interno del panorama delle cellule staminali, le MSC per le loro proprietà ipoimmunogene, di plasticità, di facile reperibilità e di rapida espansione, offrono interessanti prospettive di cura per patologie demielinizzanti (89).

A questo riguardo numerosi studi, sia in vivo (224, 225, 226), che in vitro (227, 228, 229), correlano le cellule staminali mesenchimali a processi di mielinizzazione.

In vivo sono stati effettuati studi sia con MSC indifferenziate che con MSC pre-differenziate in vitro. In particolare il lavoro di Akiama Y 2002 (225) et al ha dimostrato che trapiantando MSC indifferenziate esprimenti GFP in ratti Wistar con una lesione focale demielinizzante, queste esprimono p0, una delle proteine costituenti la mielina, si dispongono lungo l'area demielinizzata e ne promuovono la rimielinizzazione. Inoltre le MSC, aumentando la velocità di conduzione nervosa, migliorano lo stato della lesione. Questo miglioramento, così come la rimielinizzazione, è caratteristico solo delle MSC e non si ottiene con il trapianto di cellule di Schwann, indicando le MSC come possibile fonte di cellule per favorire i processi di rimielinizzazione.

Nel lavoro di Keilhoff (228) invece è stato dimostrato che le MSC transdifferenziate in vitro mediante un cocktail di citochine in cellule di Schwann, e verificato il differenziamento mediante espressione di marcatori di queste cellule, sono in grado di mielinizzare il nervo sciatico di ratto sottoposto ad una lesione. Diversamente dal lavoro di Akiama (225) precedentemente citato in questo caso non è stato osservato nessun segno di mielinizzazione con il trapianto di MSC non precedentemente transdifferenziate. Anche nel lavoro di Mimura T et al (229) le MSC vengono differenziate in cellule di Schwann mediante un cocktail di citochine e in seguito vengono trapiantate a livello del nervo sciatico danneggiato. In questo caso le MSC differenziate migliorano la velocità di conduzione nervosa rispetto al gruppo di controllo, e inoltre sono positive per i marcatori della mielina P0 e MAG, ricostruiscono i nodi di Ranvier e rimielinizzano gli assoni rigenerati. In questo caso è stato anche dimostrato la non tumorigenicità delle MSC, in quanto dopo 6 mesi dal trapianto non erano presenti formazioni tumorali.

Nel lavoro di Dezawa M 2002 et al (224) sono state trapiantate MSC sia pre-differenziate in cellule di Schwann in vitro che indifferenziate, in due tipi diversi di lesioni: a livello del nervo sciatico e del nervo ottico. In entrambi i casi di lesione le MSC vengono poste all'interno di un matrigel che quindi viene inserito e anastomizzato su lato prossimale della lesione. Si è osservata la rigenerazione del nervo sia nelle MSC differenziate in cellule di Schwann che nelle indifferenziate. Nel trapianto di cellule differenziate inoltre oltre ad essere presenti neuriti più numerosi e lunghi rispetto al trapianto di cellule indifferenziate si è osservata anche la produzione di mielina e la rigenerazione dei nodi di Ranvier, assente nelle indifferenziate. Questi lavori in vivo hanno evidenziato la capacità delle MSC di produrre mielina, anche se non è stato chiarito il meccanismo attraverso cui le MSC siano in grado di farlo, in particolare se è necessario che siano pre-differenziate o se spontaneamente in caso di demielinizzazione esse diventino mielinogeniche.

Anche per quanto riguarda gli esperimenti in vitro, i lavori presenti in letteratura dimostrano che le MSC transdifferenziate in cellule di Schwann

sono in grado di mielinizzare neuriti in coltura. Nel lavoro di Keilhoff 2006 (228) è stato dimostrato che le MSC transdifferenziate in cellule di Schwann sono in grado di mielinizzare i neuriti di cellule PC12 poste in co-coltura con esse, mentre in quello di Yang J et al 2008 (227) si è osservato che MSC poste in co-coltura con i neuroni sensitivi dei gangli della radice dorsale transdifferenziano spontaneamente in cellule di Schwann e mielinizzano i neuriti. Se nel lavoro di Keilhoff la mielina formata dalle MSC transdifferenziate è compatta e molto simile alla mielina fisiologica, nel lavoro di Yang invece la mielina formata dalle MSC spontaneamente differenziate in cellule di Schwann non è mielina matura, in quanto si tratta di mielina non compatta.

In tutti i lavori riportati non è stato ancora chiarito se è necessario un differenziamento delle MSC in cellule di Schwann o se in caso di demielinizzazione vengono attivati dei pathways specifici che rendono le MSC cellule mielinogeniche. Visto le interessanti prospettive che offrono le MSC per il riparo delle lesioni demielinizzanti è necessario uno studio approfondito su diversi modelli neuronali per comprendere le potenzialità mielinogeniche di queste cellule.

MATERIALI E METODI

1 COLTURE PRIMARIE DI NEURONI SENSITIVI

1.1 PREPARAZIONE DEL COLLAGENE

Il collagene utilizzato per il pre-trattamento delle piastre viene estratto direttamente dai tendini della coda di ratto. La coda viene rimossa e conservata in una piastra Petri da 150mm per 16h a -80°C. Dopo averla fatta scongelare, la coda viene disinfettata con un agente antibatterico e posta per circa 1h in etanolo 80% in una nuova Petri da 150mm sterile. La coda viene poi spostata in una nuova piastra Petri per far evaporare l'etanolo. Dalla coda vengono quindi estratti i tendini con l'ausilio di un'ossivora e di una pinza emostatica, con le quali si fa scivolare via la muscolatura della coda per ottenere soli i tendini. A questo punto i tendini vengono posti in una piastra Petri da 60mm contenente 3 ml di acqua sterile precedentemente pesata. La Petri contenente i tendini viene nuovamente pesata per ricavare il peso dei tendini, che vengono quindi incubati per 4-5 giorni a 4°C in 250ml di acido acetico 0.1% filtrato con filtro da 0.22µm per ogni grammo di tendini. La sospensione viene poi centrifugata per 1h a 21.500g a 4°C e il sovrantante viene dializzato a 4°C overnight per rimuovere l'acido acetico. La membrana da dialisi (Spectra/Por 4) è poi tagliata e si ottiene il collagene purificato, che verrà poi aliquotato in frazioni da 10ml e conservato a 4°C per almeno un mese. Il collagene così preparato viene utilizzato per pre-trattare le piastre, che prima di essere utilizzate dovranno essere reidratate con terreno di coltura.

1.2 DISSEZIONE

Ratte al 15° giorno di gestazione (Sprague-Dawley) sono anestetizzate con etere e sono sacrificate con un'iniezione intracardiaca di Pentobarbital. È

praticata un'incisione lungo l'addome, l'utero viene aperto e sono prelevati gli embrioni, separati in ambiente sterile dalla placenta e isolati. Gli embrioni così prelevati sono posti in piastre Petri contenenti terreno di coltura L-15. Utilizzando uno stereomicroscopio, si effettua un'incisione del rachide per esporre il midollo spinale, dal quale vengono poi prelevati i gangli.

I gangli estratti sotto cappa sterile sono depositati in falcon da 15ml in polipropilene contenente terreno L15 e centrifugati per 10 minuti a 1500 rpm a 4°C. Il terreno viene eliminato mediante pasteur ed al pellet viene aggiunta la tripsina 0,25% in Hank's Ballans Salt Solution (disgregazione chimica) che deve agire per 30 minuti a 37°C. A questo punto si ricentrifuga nelle medesime condizioni descritte in precedenza, si aspira la tripsina e si aggiunge il terreno di coltura AN₂ (MEM (GIBCO) addizionato con il 15% di Calf Bovine Serum (CBS), 50mg/ml di acido ascorbico, 1,4 mM di glutammina, 0,6% di glucosio) con l'aggiunta di NGF 5ng/ml (250µl di terreno per dish per estratti e una goccia per dish con vetrino).

Il contenuto delle falcon viene spipettato con una pasteur con il foro leggermente occluso al calore (disgregazione meccanica) dopodiché si aggiungono 250µl di sospensione cellulare per ogni dish per estratti proteici e una goccia per ogni dish con vetrino. Dopo 2h si aggiunge 1ml di terreno AN₂ 15% CBS con NGF 5ng/ml per dish e nei 5 giorni successivi il terreno viene sostituito con lo stesso terreno addizionato con FUDR (10⁻⁵ µM) per eliminare le cellule di supporto. Il quinto giorno si aggiunge di nuovo 1 ml di terreno AN₂ con NGF 5ng/ml per dish. Dopo 24h i neuroni sono pronti per essere trattati.

2 ESTRAZIONE DELLE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI DI RATTO (MSC) DA MIDOLLO OSSEO

Le cellule staminali mesenchimali sono state ottenute dal midollo osseo di ratti Sprague Dawley di 10 settimane. Tutte le procedure sugli animali sono state condotte in accordo alle direttive europee 86/609/EEC.

Dopo il sacrificio dell'animale vengono staccati gli arti posteriori e da essi si ricavano femore e tibia. Sotto cappa sterile questi segmenti ossei vengono accuratamente ripuliti da tessuto muscolare e connettivo circostante, privati delle capsule delle articolazioni e delle estremità, il tutto mediante garza sterile. Il midollo osseo, a causa della presenza dello stroma, non è sufficientemente liquido da fluire al di fuori dal canale midollare. Quindi per recuperare le cellule nella dish è necessario iniettare mediante siringa 1 ml di terreno Eagle's alpha minimum essential medium (α -MEM) completo cioè addizionato con L-glutamina 2mM, penicillina 100 U/ml, streptomina 100 μ g/ml e fungizone 250 μ g/ml nel canale midollare. Quindi si trasferisce il contenuto della dish in una falcon di polipropilene da 15 ml. Il polipropilene evita l'adesione delle cellule.

Si centrifuga per 10 minuti a 500 g a 4°C, si elimina il surnatante e si risospende il pellet in 2 ml di lysis buffer NH_4Cl 0,84% per 5 minuti a temperatura ambiente agitando periodicamente. Questo buffer genera uno shock osmotico tale da rompere solo le membrane dei globuli rossi. A questo punto si aggiungono 5 ml di terreno per bloccare l'azione del buffer, si ricentrifuga la sospensione nelle medesime condizioni descritte in precedenza.

Si rielimina il surnatante e si risospende il pellet in terreno α -MEM completo addizionato con 20% di siero fetale bovino ES cell screened Fetal Bovine Serum (ES FBS); il tutto viene messo in una piastra per colture cellulari da 75cm² (T75). Le cellule appena estratte dall'animale costituiscono una coltura cellulare al passaggio P0.

Il terreno di coltura viene cambiato dopo due giorni in modo tale che le cellule emopoietiche vengano separate dalle mesenchimali perché le prime rimangono in sospensione al contrario delle mesenchimali che aderiscono alla piastra. Le cellule sono poste in incubatore a 37°C e 5% di CO_2 . Ogni 4 giorni il terreno viene sostituito. Quando raggiungono circa l'80% di confluenza devono essere passate ossia divise in altre flasche (T75) per permetterne di nuovo la crescita poiché subiscono inibizione da contatto.

2.1 CONGELAMENTO E SCONGELAMENTO DI CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI

Le MSC vengono congelate in medium di congelamento costituito da medium addizionato con DiMetilSulfOssido 10% come agente crioprotettivo. Quando la coltura cellulare raggiunge l'80/90% di confluenza, le cellule vengono tripsinizzate, raccolte in terreno di coltura e centrifugate. In seguito il terreno viene eliminato e le cellule vengono risospese nel medium di congelamento e trasferite in una vial da congelamento. Quest'ultima viene posta in un contenitore contenente isopropanolo e subito messa a -80°C per una notte. La presenza di isopropanolo consente una discesa controllata della temperatura (circa 1°C/min). Il giorno seguente le cellule vengono trasferite in azoto liquido.

Per lo scongelamento la vial viene prelevata dall'azoto liquido e posta in bagnetto termostato a 37°C. Non appena il contenuto della vial si è scongelato, viene trasferito sotto cappa sterile in una provetta contenente il medium di coltura α MEM completo addizionato con 20% di FBS. La provetta viene centrifugata per 10 minuti a 500 rcf a 4°C. Dopo centrifugazione il surnatante viene eliminato e le cellule risospese in terreno α -MEM completo addizionato con 20% di FBS. Le cellule vengono infine piastrate in T75 e riposte in incubatore a 37°C 5% CO₂.

3 COCOLTURE DIRETTE DI MSC E NEURONI SENSITIVI

Le MSC sono addizionate alle colture di neuroni sensitivi, trattati come descritto in precedenza, a una densità di 100000 cellule per dish da 35 mm di diametro. Le cocoltture vengono trattate con terreno AN₂ + NGF 5ng/ml e fotografate una volta alla settimana. Il terreno viene cambiato a tutte le dishes una volta alla settimana.

4 COCOLTURE DIRETTE DI MSC FISSATE E NEURONI SENSITIVI

Le MSC sono piastrate su dishes da 35 mm di diametro, precedentemente collagenate, (100000 MSC per dish) in terreno AN₂ con NGF 5ng/ml.

Dopo qualche giorno dal piastramento il terreno viene eliminato dalle dishes che vengono successivamente lavate con PBS per 2 volte. A questo punto si procede con il fissaggio delle MSC con Paraformaldeide 4% o con Paraformaldeide 0,5% per 15 minuti seguito da un accurato lavaggio in PBS. Le dishes vengono conservate a 4°C ON. Il giorno seguente si procede con il piastramento dei neuroni sensitivi sopra le MSC fissate (si veda estrazione dei gangli dal midollo spinale).

Il terreno AN₂ con NGF 5ng/ml viene cambiato a tutte le dishes una volta alla settimana.

5 TRATTAMENTO DEI NEURONI SENSITIVI CON IL MEDIUM CONDIZIONATO DELLE COCOLTURE DIRETTE TRA MSC E NEURONI SENSITIVI

Dopo una settimana dal piastramento dei neuroni sensitivi ottenuti dalla disgregazione di 50 gangli per dish (si veda estrazione dei gangli dal midollo spinale) questi vengono trattati con il medium condizionato di cocolture di neuroni sensitivi ed MSC di 30 giorni.

Ogni tre giorni il terreno presente nelle dishes delle cocolture (1ml per dish) viene prelevato e aggiunto nelle dish di soli neuroni e alle cocoltura si aggiunge terreno AN₂ con NGF 5ng/ml, sempre 1ml per dish.

6 MICROSCOPIA OTTICA E ELETTRONICA:

Ai tempi prestabiliti (2-4 e 6 settimane) i neuroni, le cocolture e le MSC vengono preparate per gli studi di microscopia ottica ed elettronica. Si

eseguono due lavaggi PBS e si incubano le colture per 1 h in una soluzione a tampone fosfato 0.12M con glutaraldeide 2% e paraformaldeide 4%. Le colture vengono poi incubate per 1h con una soluzione di tetrossido di osmio 1% in tampone cacodilato. I campioni vengono quindi disidratati con passaggi in etanolo a concentrazioni crescenti. Infine si procede alla fissazione definitiva in resina epossidica. Per la microscopia ottica i campioni vengono tagliati al microtomo in sezioni semifini, con spessore minore di 1 μm , posti su un vetrino e colorati con Blu di Metilene. Per la microscopia elettronica i campioni vengono tagliati al microtomo in sezioni ultrafini (80-90 nm), contrastati con citrato di piombo e acetato d'uranile ed osservati al microscopio elettronico a trasmissione.

7 CITOFUORIMETRIA

Per la preparazione dei campioni per la citofluorimetria (FACSanto BD) vengono effettuati 2 lavaggi veloci in PBS freddo e viene aggiunto 1 ml di tripsina. I campioni vengono quindi incubati per 5 minuti a 37°C, si aggiunge del terreno per inattivare la tripsina, si raccoglie il contenuto della dish nei tubi per il citofluorimetro e si centrifuga a 1500g per 5 minuti a 4°C. Quindi si lasciano decantare i campioni e si aggiunge 500 μl di PBS freddo, si risospende e si centrifuga nuovamente. Alla fine della centrifugazione si decantano di nuovo i campioni e si aggiunge 100 μl di Binding Buffer 1X + 5 μl di annessina 5 per tubo.

E' necessario preparare anche dei tubi da usare come bianco per acquisire i parametri al citofluorimetro. Nei tubi da utilizzare come bianco per settare il citofluorimetro si aggiunge solo 100 μl di binding buffer 1x per tubo. Si incubano i campioni per 15 minuti al buio a temperatura ambiente, e si aggiunge 400 μl di binding buffer 1x per tubo. Si aspettano circa 30 minuti e quindi si può leggere al citofluorimetro.

Al citofluorimetro vengono quindi letti: acqua per calcolare il rumore elettronico da sottrarre poi dai risultati della lettura dei campioni; i bianchi, senza annessina 5, per settare l'autofluorescenza della FITC; i campioni incubati con annessina 5.

8 ESTRATTI PROTEICI

Sono stati effettuati estratti proteici dei seguenti campioni cellulari: neuroni sensitivi (ottenuti dalla disgregazione di 50 gangli per dish), coculture di neuroni sensitivi ed MSC (ottenuti dalla disgregazione di 50 gangli più 100000 MSC) ed MSC (ottenute piastrando 100000 MSC per dish).

Si aspira il terreno dalle dishes, tenendole in ghiaccio, si effettuano due lavaggi veloci con PBS freddo e si aggiunge a ciascuna dish 100 μ l di lysis buffer (Hepes pH 7.5, NaCl 3M, Glicerolo, Triton, MgCl₂, EGTA, H₂O bidistillata e gli inibitori da aggiungere al massimo 30 min prima dell'utilizzo del lysis buffer: PMSF, Aprotinina, Na₂VO₄, Na₂Pyr-P).

A questo punto continuando a tenere le dishes in ghiaccio oltre ad una lisi chimica se ne opera una meccanica mediante l'utilizzo di cell lifter con il quale si staccano energeticamente le cellule. Si raccoglie il lisato e con esso si sciacqua di nuovo la dish. Si ripreleva il lisato e lo si trasferisce in una eppendorf, dove l'estratto proteico viene sonicato e conservato a -80°C.

9 QUANTIFICAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE PROTEICA

La determinazione della quantità di proteine contenute in un campione viene effettuata secondo il metodo Bradford. Un'aliquota del campione viene risospesa in acqua bidistillata più 1 ml di Comassie Reagent. Si incuba il campione con il Comassie Reagent per 5 minuti e si valuta l'assorbanza della soluzione utilizzando lo spettrofotometro alla λ di 595 nm, il Comassie infatti quando si lega alle proteine in ambiente acido determina una variazione dell'assorbimento delle proteine da 465 nm a 595 nm.

La curva di risposta colorimetrica del Comassie Reagent non è lineare all'incremento della concentrazione proteica quindi è necessario preparare una curva standard utilizzando quantità note di una proteina di riferimento (Bovin Serum Albumin) e valutarne l'assorbanza allo spettrofotometro. La quantità di proteine contenute nell'aliquota viene quindi estrapolata dalla

curva di taratura dopo aver misurato il valore di assorbanza ottenuto allo spettrofotometro.

10 SEPARAZIONE ELETTROFORETICA DELLE PROTEINE

Le proteine vengono separate in base al peso molecolare, in condizioni di corsa denaturanti, mediante l'utilizzo di un gel di poliacrilammide (SDS-PAGE PoliAcrilammide Gel Electrophoresis).

Il gel utilizzato per la separazione delle proteine si compone di due parti una inferiore, chiamata running buffer e una superiore, denominata stacking buffer.

Il running buffer crea una sorta di setaccio molecolare che permette la separazione delle proteine in base alle loro dimensioni. Esso è costituito da:

-13 % v/v di una soluzione di acrilamide (acrilamide 137: bisacrilamide 1) la quale polimerizza e in presenza di piccole quantità di bisacrilamide crea legami crociati mediante reazioni di catalisi radicalica

-Tris HCl pH 8.8 1.5M tampone;

-SDS 10% che mantiene le proteine in forma denaturata;

-Acqua bidistillata per portare a volume;

-Ammonio persolfato 1% e TEMED 0,1% rispettivamente catalizzatore e iniziatore del processo di polimerizzazione dell'acrilamide.

Lo stacking gel contiene :

- 5% v/v di una soluzione di acrilammide 30%;

- Tris HCl pH 6.8;

- SDS 10%;

- Acqua bidistillata;

-Ammonio Persolfato e TEMED.

Una volta che il gel è polimerizzato è pronto per il caricamento dei campioni preparati aggiungendo la quantità di estratto proteico calcolato mediante quantizzazione con metodo Bradford in modo da caricare la medesima

concentrazione proteica per ogni campione diluita in Laemmli buffer 5x (β -Mercaptoetanolo 5%, Tris- HCl pH 6.8 400 Mm, SDS 10%, Glicerolo 50%, Blu di bromofenolo 0.5%). Il rapporto campione/Laemmli buffer è di 5:1. Infine si porta a volume con una soluzione Laemmli buffer 1x. Accanto ai campioni viene caricata in un pozzetto una miscela di markers, ossia proteine con peso molecolare noto che permettono di visualizzare l'andamento della corsa dei nostri campioni.

Prima di essere caricati i campioni e i markers vengono denaturati rispettivamente per 5 e 3 minuti a 95°C.

La corsa elettroforetica avviene all'interno di un supporto di plastica a cui si aggiunge il tampone di corsa diluito 1x con acqua demineralizzata da running buffer 10x costituito da Trisma base 30g/L, Glicina 144g/L, SDS 10g/L e acqua.

Si imposta l'amperaggio che permette alle proteine di migrare nel gel dal polo negativo a quello positivo dell'apparato elettroforetico.

La corsa è ottimale nei pozzetti centrali quindi se il numero dei campioni è inferiore a quello dei pozzetti i campioni verranno caricati nei pozzetti centrali, tutti gli altri saranno caricati con un egual volume della soluzione 1x utilizzata per la preparazione dei campioni.

11 TRASFERIMENTO DEL GEL SU FILTRO DI NITROCELLULOSA

Questa tecnica consiste nel trasferimento delle proteine separate mediante SDS-PAGE su un filtro di nitrocellulosa, la quale presenta elevate capacità leganti mediate da interazioni elettrostatiche .

Le proteine vengono trasferite dal gel alla membrana mantenendo la forma e il livello di migrazione acquisiti alla fine della corsa elettroforetica.

Per il trasferimento si allestisce una sorta di sandwich formato da due supporti di plastica contenenti, nell' ordine, una spugnetta, un foglio di carta, il foglio di nitrocellulosa, il gel con le proteine, un secondo foglio di carta e in ultimo una seconda spugnetta, tutti imbevuti di tampone (Transfer

buffer). Il tutto viene posto in una camera di trasferimento contenente 6 litri circa di buffer di trasferimento costituito da Trisma Base 3.025g/L , Glicina 14.4g/L, Metanolo 200ml/L e acqua fino a volume. Le proteine saranno trasferite dal gel alla nitrocellulosa grazie alla presenza di un campo elettrico ad amperaggio costante (500mA) applicato per 4ore. Il sandwich deve essere sistemato in modo tale che il mezzo immobilizzante (foglio di nitrocellulosa) rimanga tra il gel e l'anodo poiché tutte le proteine denaturate con SDS avranno carica negativa.

La conduzione della corrente è assicurata dal buffer posto nella camera di trasferimento. Il trasferimento avviene in camera fredda.

12 IMMUNOBLOTTING

I siti di ibridazione aspecifici sono saturati mediante incubazione del filtro di nitrocellulosa per 1 ora a temperatura ambiente con una soluzione bloccante costituita da Tris-HCl pH 7.5 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,10% e 5% latte magro. In seguito si elimina la soluzione bloccante e si effettuano 3 lavaggi da 5 minuti l'uno con washing buffer preparato come la soluzione di bloccaggio meno il latte al 5%.

Si incuba il filtro con anticorpo primario diluito nella soluzione bloccante a 4°C ON, dopodiché si effettuano 6 lavaggi da 5 minuti l'uno a temperatura ambiente con whashing buffer. Come anticorpi primari sono stati usati anti-MBP (in goat, 1:200, Santa Cruz Biotech.) e anti-actina (in goat, 1:500, Santa Cruz Biotech.)

Si incuba quindi il filtro con anticorpo secondario sempre diluito nella soluzione bloccante (1:1000) per 1 ora a temperatura ambiente. L'anticorpo secondario utilizzato riconosce gli anticorpi prodotti in goat ed è coniugato con perossidasi di rafano (Chemicon international).

Al termine dell'incubazione si effettuano 6 lavaggi da 5 minuti l'uno con washing buffer a temperatura ambiente. Infine si procede alla rilevazione del legame antigene-anticorpo con una reazione di chemiluminescenza.

12.1 REAZIONE DI CHEMIOLUMINESCENZA

Il kit di chemiluminescenza utilizzato fornisce tutti i componenti necessari per rilevare la presenza del complesso antigene/anticorpo-primario/anticorpo- secondario.

Una volta eseguito l'immunoblotting si incuba il filtro con una soluzione contenente perossido di idrogeno, luminolo (substrato chemiluminescente della perossidasi) e intensificatori chimici di luminescenza.

La perossidasi con cui sono coniugati gli anticorpi catalizza il rilascio degli ioni superossido dalle molecole di perossido di idrogeno. Tali anioni ossidano il luminolo, con la concomitante emissione di luce la cui intensità aumenta in presenza di intensificatori luminosi. Il filtro viene infine asciugato e collocato in una cassetta per lo sviluppo fotografico dal momento che la luce prodotta dal luminolo è in grado di impressionare una lastra autoradiografica.

In questo modo si rilevano le proteine immunoreattive sul filtro.

Il tempo di esposizione della lastra può variare da pochi secondi a qualche minuto a seconda della combinazione anticorpo primario-secondario utilizzata.

12.2 ANALISI DENSITOMETRICHE

Le lastre autoradiografiche vengono poste su un transilluminatore a luce visibile e fotografate con una macchina fotografica digitale collegata ad un computer che possiede uno specifico programma d'analisi (Kodak). L'analisi densitometrica delle bande viene condotta delimitando l'area della banda che deve essere analizzata dal software. In seguito sono state effettuate delle normalizzazioni interne ad ogni campione facendo il rapporto tra il valore ottenuto dall'analisi della banda d'interesse e il valore dell'actina corrispondente.

13 IMMUNOFLUORESCENZA

Sono state effettuate immunofluorescenze sui seguenti campioni cellulari: neuroni sensitivi (ottenuti dalla disgregazione di 12 gangli che vengono piastrati a goccia su ogni dish con vetrino), coculture di neuroni sensitivi ed MSC (ottenuti dalla disgregazione sempre di 12 gangli piastrati a goccia sul vetrino più 100000 MSC) ed MSC (ottenute piastrando 100000 MSC per dish con vetrino).

Per prima cosa si elimina il terreno delle dish contenenti le cellule piastrate su vetrino e si effettuano 2 lavaggi veloci in PBS.

Le cellule vengono fissate in paraformaldeide 4% per 15 minuti sotto cappa chimica e poi lavate per 3 volte con PBS (ogni lavaggio con PBS dura 5min).

Si aggiunge alle cellule glicina 0.1M pH 7.4 per 5 minuti dopodiché si effettuano di nuovo due lavaggi con PBS.

A questo punto le cellule vengono incubate a temperatura ambiente per 1h in blocking buffer costituito da: PBS, Triton 0.5% e BSA 5%.

In seguito le cellule vengono incubate ON a 4°C con anticorpo primario diluito in blocking buffer. Gli anticorpi (Ab) primari utilizzati sono i seguenti:

Anti Map2, 1:100, rabbit, Chemicon;

Anti Map2, 1:50, mouse, Chemicon;

Anti NeuN, 1:50, mouse, Millipore;

Anti Caspasi 3 attiva, 1:500, rabbit, Cell Signaling;

Anti MBP, 1:50, goat, Santa Cruz Biotech.;

Anti GFAP, 1:200, rabbit, Dako;

Anti S-100, 1:50, mouse, Chemicon;

Anti p75, 1:50, rabbit, Upstate;

Anti TrkA, 1:50, rabbit, Calbiochem;

Anti TrkC, 1:50, rabbit, Santa Cruz Biotechnology;

Anti Connessina 36, 1:50, goat, Santa Cruz;

Anti Connessina 43, 1:50, rabbit, Abcam;

Anti Connessina 32, 1:50, rabbit, Invitrogen.

Il giorno seguente si effettuano 6 lavaggi da 5 minuti l'uno con PBS per eliminare l'anticorpo in eccesso che non si è legato e si incuba per un'ora con

anticorpo secondario diluito in blocking buffer a 4°C (1:200). L'anticorpo secondario è specie specifico per l'anticorpo primario creato in un determinato animale ed è coniugato con un fluorocromo.

Si effettuano di nuovo 6 lavaggi da 5 min con PBS e si montano i vetrini con montante definitivo (Polyvinyl alcohol mounting medium with DABCO, antifading (Fluka)) ribaltando il vetrino dalla dish su un vetrino portaoggetti sul quale viene posta in precedenza una goccia di montante.

A questo punto i vetrini sono pronti per essere osservati al microscopio confocale (Biorad Laboratories Hercules, CA). I vetrini vengono conservati al buio a 4°C.

Per quanto riguarda la marcatura con la calceina, i neuroni sono stati marcati con la calceina 4 μ M per 30 minuti, dopodichè si effettuano 2 lavaggi con PBS e si aggiunge il terreno. A questo punto si effettuano le coculture con le MSC. Al contrario, negli esperimenti in cui vengono marcate le MSC, viene sempre diluita la calceina a una concentrazione di 4 μ m in terreno di coltura. Quindi si effettuano 2 lavaggi con PBS, e si staccano le MSC con la tripsina. A questo punto si piastrano le MSC marcate sui neuroni.

RISULTATI

1 EFFETTO DELLE MSC SULL'APOPTOSI NEURONALE

Nel precedente lavoro di Scuteri e colleghi 2006 (230) è stato dimostrato mediante metodiche morfologiche e molecolari che le MSC poste in cocoltura diretta con i neuroni ne promuovono la sopravvivenza e la maturazione. Questo effetto si verifica esclusivamente se i neuroni e le MSC sono in contatto tra di loro, mentre nelle coculture indirette, ovvero dove il contatto diretto tra neuroni ed MSC è precluso, non si osserva il prolungamento della sopravvivenza neuronale (Fig.1). In questo lavoro abbiamo approfondito i risultati ottenuti, caratterizzando il tipo di morte cellulare delle colture neuronali e indagando i possibili meccanismi attraverso i quali le MSC prolungano la sopravvivenza neuronale.

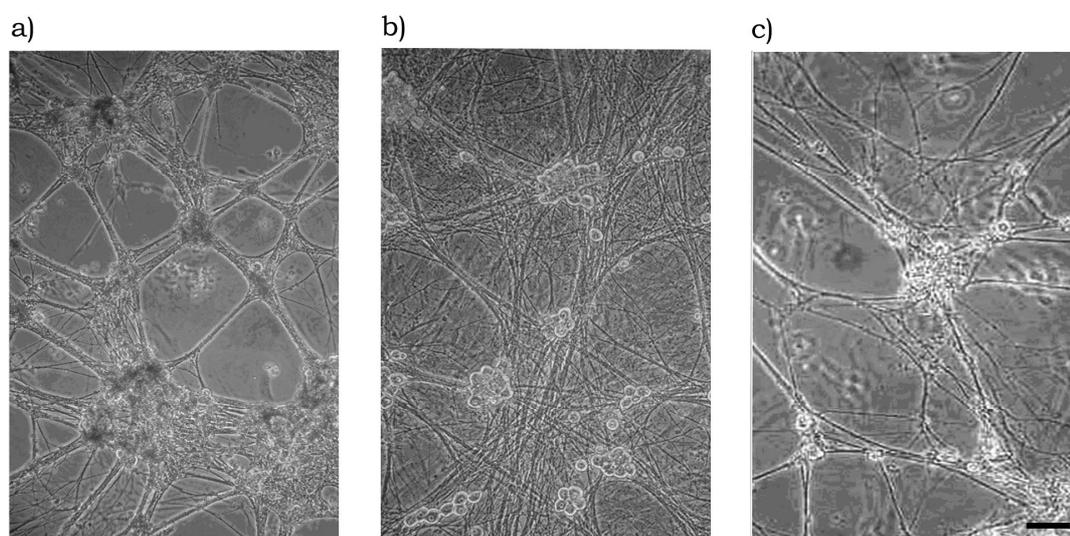


Figura 1: a) Neuroni sensitivi in coltura da 1 mese; b) Cocoltura diretta di neuroni sensitivi ed MSC di 1 mese; c) Cocoltura indiretta di neuroni sensitivi ed MSC di 1 mese. (Barra 50 μm).

Abbiamo quindi valutato mediante citofluorimetria la presenza di apoptosi nei tre tipi di colture mediante il test dell'Annexina V. Con questo test si

valuta lo spostamento della fosfatidilserina dal versante intracellulare al versante extracellulare della membrana plasmatica (103). Questo spostamento avviene infatti solo in presenza di apoptosi. In Fig. 2 a sono rappresentati i parametri fisici ed è evidenziata la regione corrispondente alla popolazione degli eventi analizzati. Come si può osservare dai grafici in Fig. 2 b, c e d la percentuale di eventi positivi per l'annexina V è maggiore nelle colture neuronali (Fig. 2 a), rispetto alle coculture (Fig. 2 b) e alle sole MSC (Fig. 2 c). Infatti nelle colture di soli neuroni gli eventi positivi per l'Annexina V sono il 61%, mentre nelle coculture sono il 9% e nelle MSC il 19%.

Inoltre dagli esperimenti di immunofluorescenza mostrati in Fig. 3 effettuati dopo un mese di cocoltura si osserva la presenza di una delle proteine esecutrici dell'apoptosi, la caspasi 3 attiva, solo nelle colture neuronali (Fig. 3 a), mentre nei neuroni in cocoltura con le MSC e nelle sole MSC la caspasi 3 attiva è assente (Fig. 3 b, c).

Queste analisi con due tipi diversi di tecniche dimostrano che le MSC sono in grado di prolungare la sopravvivenza neuronale inibendo l'apoptosi che si verifica nei neuroni in coltura.

Abbiamo anche voluto verificare con la microscopia ottica tramite sezioni semifini e con la microscopia elettronica mediante sezioni ultrafini la morfologia delle sole colture neuronali e delle coculture tra neuroni ed MSC dopo 30 giorni di coltura. In microscopia ottica si osserva la degenerazione dei neuroni in coltura da soli, come dimostrato dalla frammentazione neuritica e dalla presenza della membrana danneggiata, mentre i neuroni in cocoltura con le MSC sono privi di segni di sofferenza cellulare e hanno numerosi prolungamenti neuritici (Fig. 4 a, b).

In microscopia elettronica i neuroni in coltura da soli dopo 1 mese di coltura presentano numerosi segni di sofferenza cellulare, come il frazionamento vescicolare derivato da degenerazione apoptotica (Fig. 5 a). In generale nella coltura sono presenti neuroni a diversi livelli di degenerazione, che spesso presentano un elevato grado di dispersione di frammenti citoplasmatici fortemente elettrondensi (Fig. 5 b). Al contrario i neuroni in cocoltura con le MSC non presentano segni di sofferenza cellulare (Fig. 5 c). Infatti sia il

nucleo che il citoplasma di tali cellule non presentano segni di degenerazione.

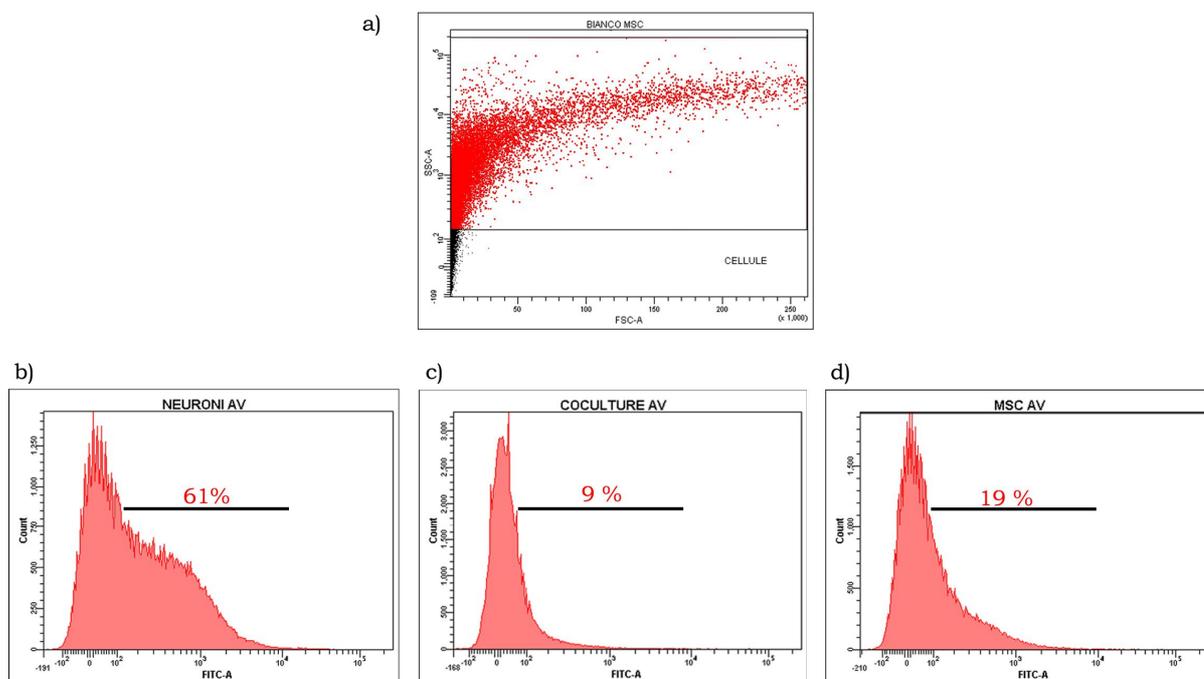
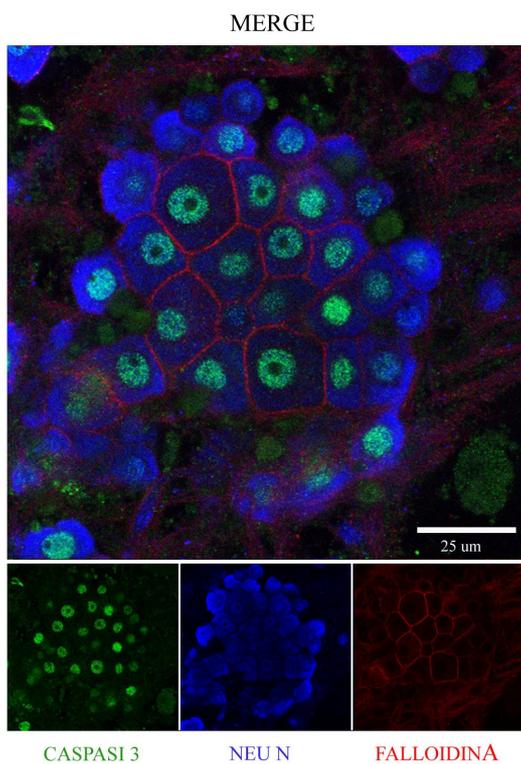
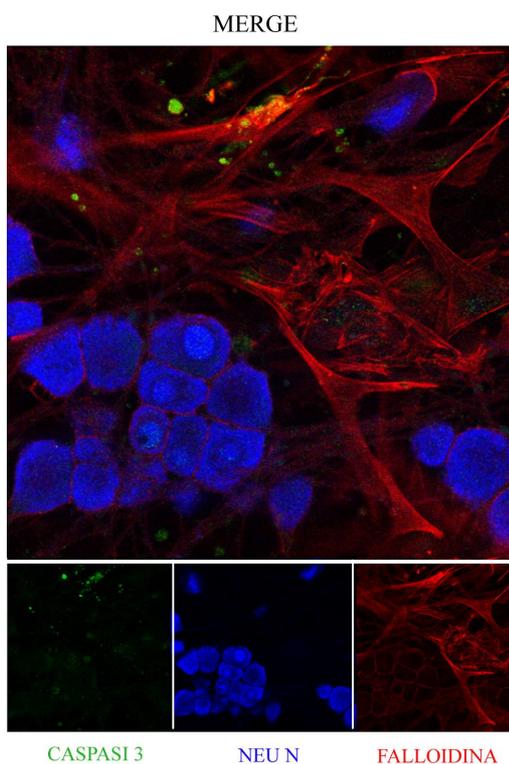


Fig. 2: a) Analisi dei parametri fisici delle popolazioni analizzate (SSC= side scatter, FSC= forward scatter). b,c,d) Analisi al citofluorimetro di neuroni (b), coculture (c) ed MSC (d) dopo un mese di coltura mediante il test dell'annexina V.

a) Neuroni in coltura da 1 mese



b) Neuroni e MSC in coltura da 1 mese



c) MSC in coltura da 1 mese

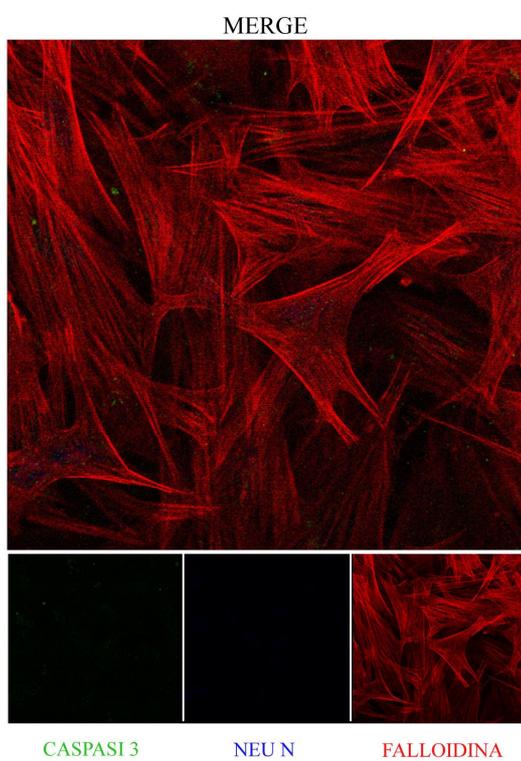
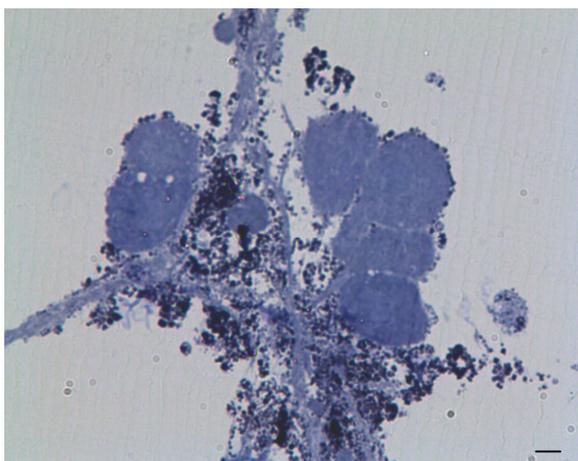


Fig. 3: Neuroni (a), Cocolture (b) ed MSC (c) in coltura da un mese. Immunofluorescenza per caspasi 3 attiva (verde), NeuN (blu) e falloidina (rosso).

a) Colture neuronali di 1 mese



b) Cocolture di neuroni e MSC di 1 mese

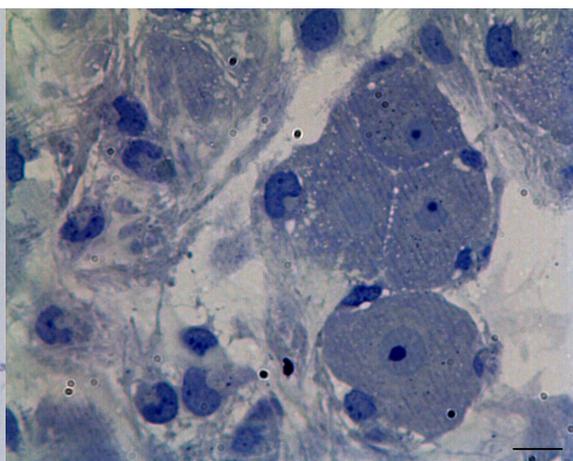
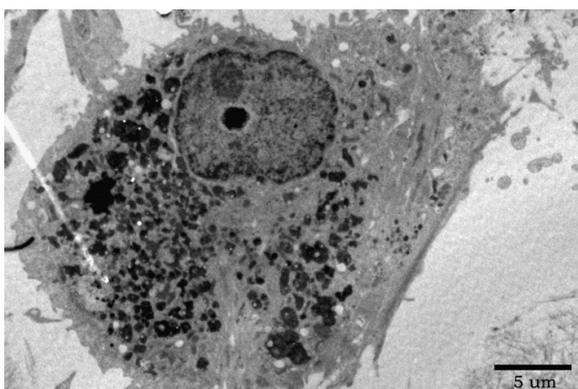
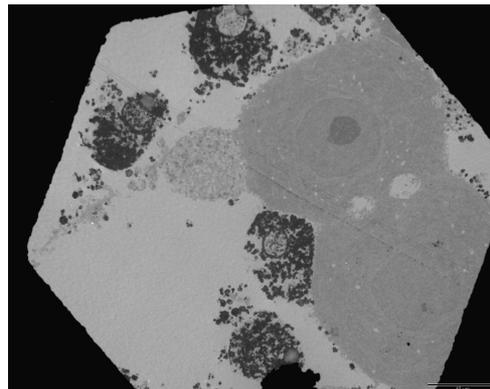


Fig. 4: Foto di sezioni semifini colorate con blu di metilene e osservate in microscopia ottica di neuroni (a) e cocolture (b). (Barra=10 μ m)

a) Colture neuronali di 1 mese



b) Colture neuronali di 1 mese



c) Cocolture di neuroni e MSC di 1 mese

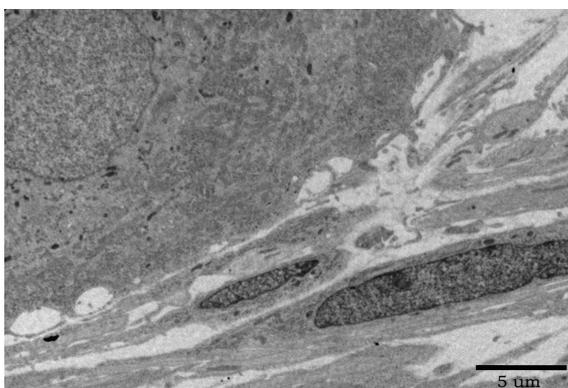


Fig. 5: Foto di sezioni ultrafini osservate in microscopia elettronica di neuroni (a, b) e cocolture (c).

2 EFFETTO TROFICO DELLE MSC: RILASCIO DI FATTORI NEUROTROFICI.

2.1 NEURONI SENSITIVI TRATTATI CON IL MEDIUM CONDIZIONATO DELLE COCOLTURE DIRETTE DI NEURONI SENSITIVI ED MSC

Nel precedente lavoro di Scuteri et al. (230) è stato dimostrato le MSC non rilasciano spontaneamente nel terreno di coltura fattori neurotrofici in grado di supportare la sopravvivenza neuronale a lungo termine. In questo lavoro abbiamo verificato se l'eventuale rilascio di fattori da parte delle MSC avvenisse in seguito al contatto diretto con i neuroni. A tal fine le colture neuronali sono stati trattate con il medium condizionato delle cocolture. Come mostrato dalle immagini della figura 6 i neuroni in coltura con il medium fresco dopo 2 settimane di coltura sono vitali e con numerosi prolungamenti (Fig. 6 a), mentre i neuroni trattati con il medium condizionato delle cocolture presentano segni di sofferenza cellulare (Fig. 6 b).

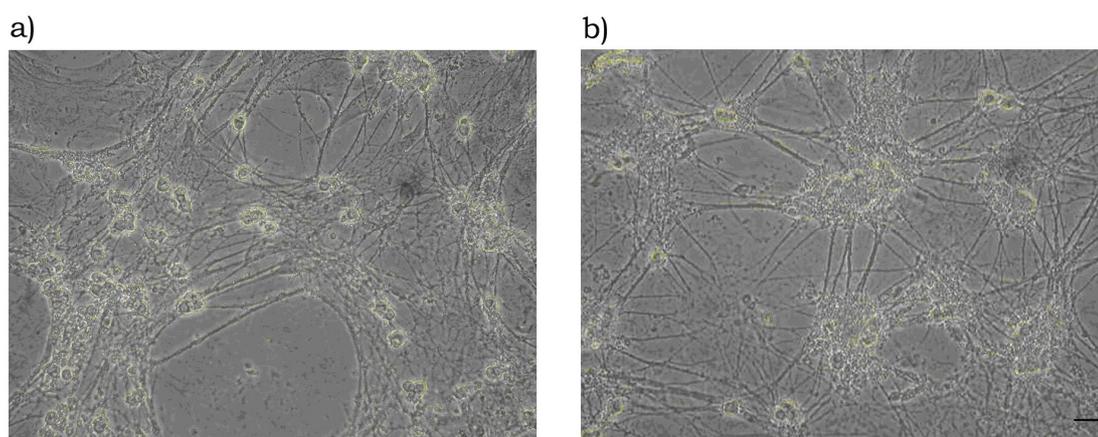


Figura 6: a) Neuroni sensitivi trattati con medium AN₂+NGF 5ng/ml per 2 settimane; b) Neuroni sensitivi trattati con terreno condizionato delle cocolture per 2 settimane. (Barra 50 μ m).

3. EFFETTO TROFICO DELLE MSC: MOLECOLE DI SUPERFICIE

Dopo aver escluso che il prolungamento della sopravvivenza nelle coculture fosse dovuto al rilascio di fattori neurotrofici abbiamo valutato l'ipotesi per cui le MSC esprimano sulla loro superficie delle molecole che, in contatto con recettori presenti sulla superficie neuronale, attivino in questi ultimi pathways che ne favoriscano la sopravvivenza. In particolare per verificare l'importanza delle molecole espresse costitutivamente dalle MSC sono state piastrate 100000 MSC per dish successivamente fissate con Paraformaldeide al 4% (231) e allo 0,5% (232) in modo da "congelare" l'espressione proteica delle MSC e impedire ulteriore sintesi proteica. Sopra di esse sono stati piastrati neuroni sensitivi primari. Come mostrato dalla figura 7 le MSC fissate con entrambe le concentrazioni di paraformaldeide (Fig 7 a, b) non sono in grado di svolgere il loro ruolo neuroprotettivo e di aumentare la sopravvivenza a lungo termine delle colture neuronali rispetto ai neuroni in cocoltura diretta con MSC non fissate (7 c), dove i confini dei corpi cellulari dei neuroni sono ben definiti e i neuriti non frammentati si diramano tutt'intorno ai raggruppamenti dei corpi cellulari neuronali. La sopravvivenza dei neuroni sensitivi in cocoltura con le MSC fissate è paragonabile a quella dei neuroni sensitivi in coltura da soli (7 d).

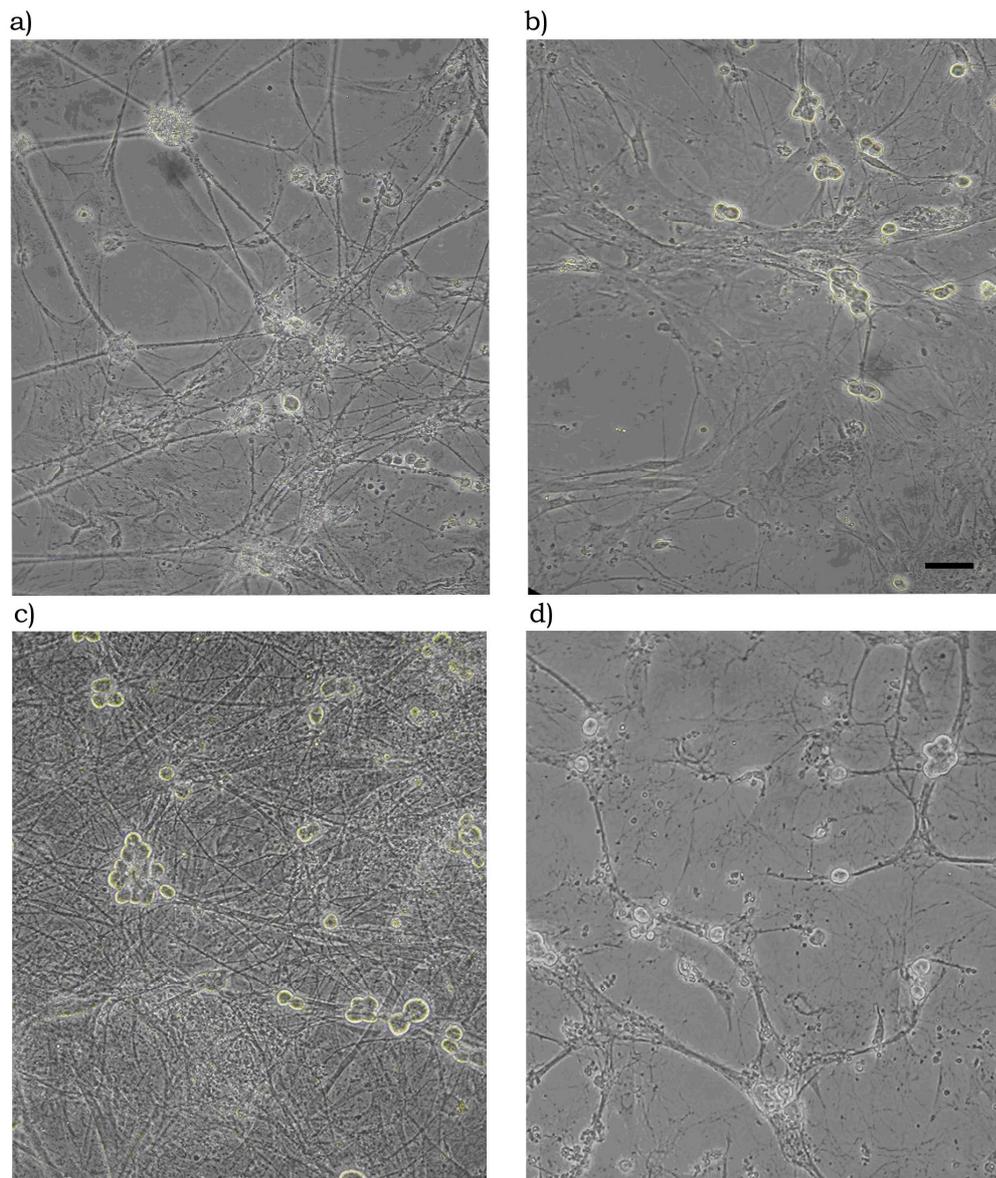


Figura 7: a) Coculture dirette di 1 mese di neuroni sensitivi ed MSC fissate con Paraformaldeide 4%; b) Coculture dirette di 1 mese di neuroni sensitivi ed MSC fissate con Paraformaldeide 0,5%; c) Coculture dirette di 1 mese di neuroni sensitivi ed MSC non fissate; d) Neuroni sensitivi in coltura da soli da 1 mese. (Barra 50 μm).

4. INTERAZIONE TRA NEURONI E MSC

Abbiamo dimostrato che le MSC proteggono i neuroni dalla morte cellulare solo se poste in contatto diretto con essi. Inoltre è stato anche dimostrato che le MSC non esprimono delle molecole di superficie che prolungano la sopravvivenza neuronali. Questo risultato suggerisce la presenza di un'interazione tra MSC e neuroni. Al microscopio elettronico è stata osservata la presenza di numerosi punti di contatto tra le due colture (Fig. 8). In particolare a basso ingrandimento (Fig. 8 a) si possono osservare delle estroflessioni poco pronunciate che mettono in relazione le MSC e i prolungamenti dei neuroni. Ad alto ingrandimento (Fig. 8 b) alcuni di questi punti di contatto possono essere considerati delle giunzioni di tipo desmosomiale, dove si può osservare il caratteristico ispessimento delle due membrane che risultano a questo punto molto ravvicinate. Questo tipo di strutture sono assenti invece nei neuroni da soli, che dopo 4 settimane, come già descritto, mostrano segni di degenerazione cellulare.

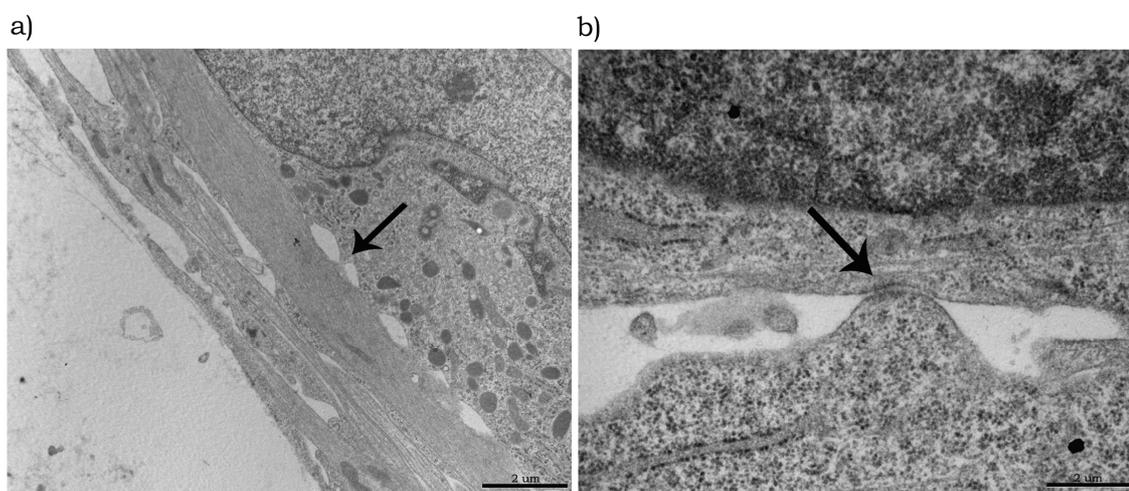


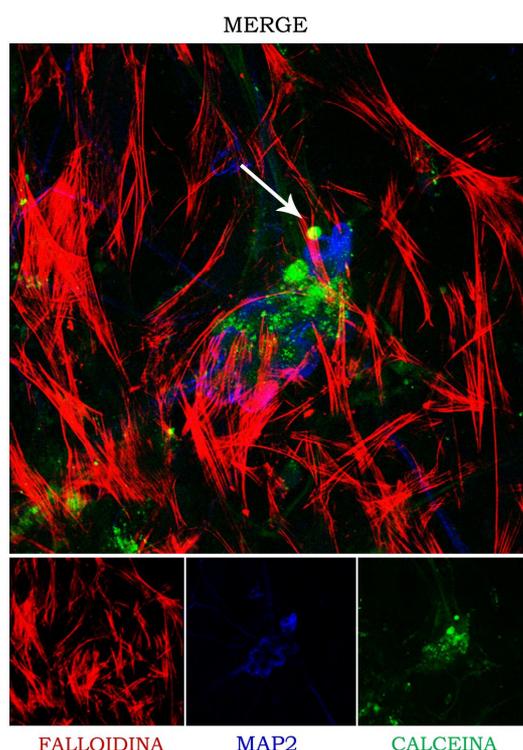
Figura 8: Immagini delle coculture in microscopia elettronica a basso (a) e ad alto (b) ingrandimento.

Sulla base di questi risultati abbiamo voluto osservare se questo contatto fosse in grado di promuovere lo scambio di molecole tra neuroni ed MSC. Le colture neuronali sono state marcate con la calceina, un colorante vitale

citoplasmatico diffusibile, e successivamente sono state allestite le cocolture con le MSC. Dopo un mese di cocoltura si può osservare in microscopia confocale la presenza di calceina all'interno delle MSC (Fig. 9 a, i punti gialli sono i punti in cui la calceina è passata all'interno delle MSC), suggerendo che tra MSC e neuroni ci può essere stato uno scambio di materiale. Questa osservazione è stata anche confermata dall'esperimento contrario, in cui abbiamo marcato le MSC con la calceina prima di allestire le cocolture con i neuroni (Fig. 9 b). E' stato quindi possibile osservare la presenza di numerosi neuroni positivi per il colorante citoplasmatico.

Questi risultati indicano che tra neuroni ed MSC sono presenti dei punti di contatto attraverso i quali ci può essere lo scambio di molecole.

a) Neuroni e MSC in cocoltura da 2 settimane, calceina nei neuroni



b) Neuroni e MSC in cocoltura da 2 settimane, calceina nelle MSC

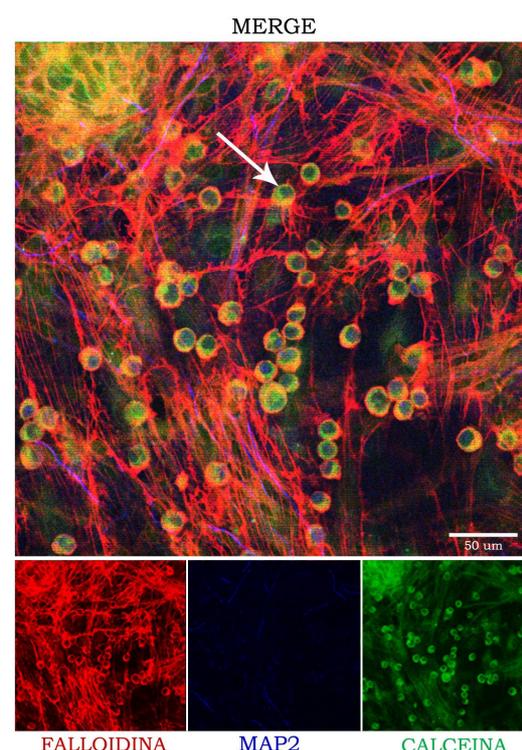


Figura 9: a) Calceina (verde) aggiunta nei neuroni (NeuN, blu) prima della cocoltura con le MSC (falloidina, rosso). b) Calceina (verde) aggiunta alle MSC (falloidina, rosso) prima della cocoltura con i neuroni (NeuN, blu). Entrambe le immagini sono state acquisite dopo 30 giorni di cocoltura. (Barra 50 μ m).

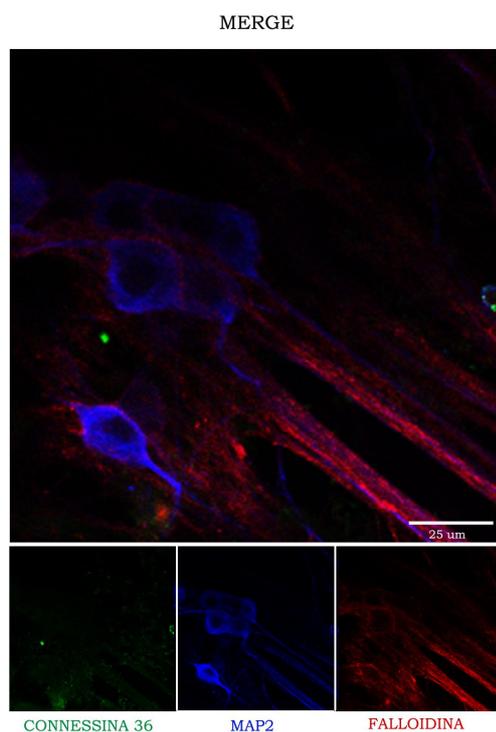
Partendo da questa dimostrazione abbiamo verificato la presenza di proteine che sono coinvolte nella formazione delle giunzioni cellulari, in particolare delle gap junction, ovvero le giunzioni che permettono lo scambio di molecole, quali le connessine. In particolare abbiamo dimostrato la presenza di 3 connessine neuronali, la connessina 36, la connessina 43 e la connessina 32. Dalle immagini di microscopia confocale dopo 30 giorni di coltura mostrate in Fig. 10 la connessina 36 risulta assente nelle colture di soli neuroni (Fig. 10 a), mentre la stessa è presente lungo i prolungamenti dei neuroni in co-coltura (Fig. 10 b). La connessina 36 è invece assente nelle MSC (Fig. 10 c).

Anche la connessina 43 ha una distribuzione simile, in quanto è assente nelle colture di soli neuroni e nelle MSC (Fig. 11 a, b), mentre è presente nei prolungamenti dei neuroni in co-coltura (Fig. 11 c).

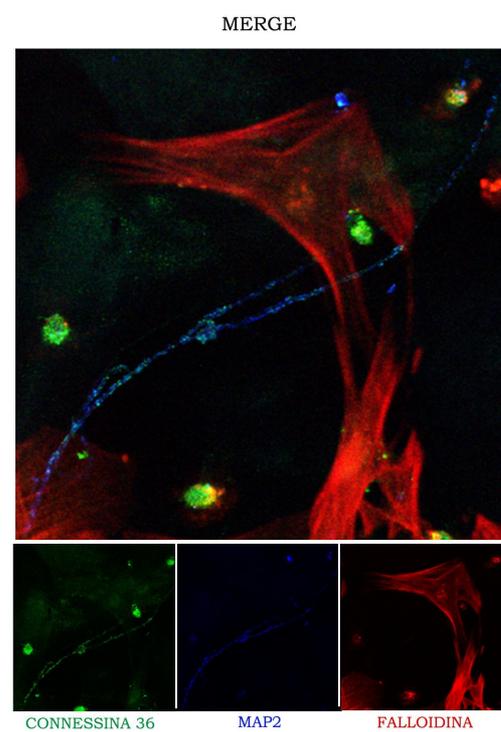
Anche la connessina 32 (Fig. 12) è assente nelle colture neuronali (Fig. 12 a) e nelle MSC (Fig. 12 e), mentre è presente nelle coculture (Fig. 12 b, c, d). In particolare nelle coculture è espressa a livello sia nucleare che citoplasmatico nei neuroni, ma anche nelle MSC, come si può anche osservare nell'immagine dell'asse Z (c), dove si osserva la presenza della connessina 32 nelle MSC, in particolare a livello di membrana. Dall'ingrandimento della Figura c si può osservare la presenza di connessina 32 in corrispondenza della membrana delle MSC e dei prolungamenti dei neuroni. Questo risultato suggerisce la presenza di una connessione tra le due popolazioni cellulari.

Tutti insieme questi risultati dimostrano che nelle coculture sono presenti delle proteine caratteristiche delle gap junction, che potrebbero presiedere allo scambio di molecole tra neuroni ed MSC.

a) Neuroni in coltura da 1 mese



b) Cocolture di neuroni e MSC di 1 mese



c) MSC in coltura da 1 mese

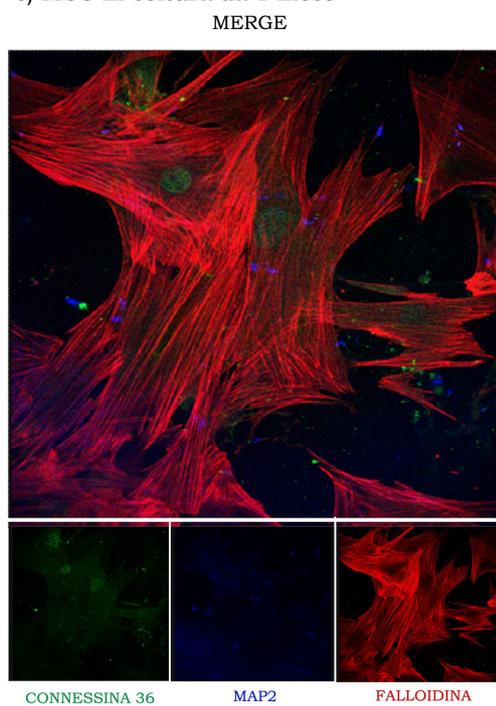
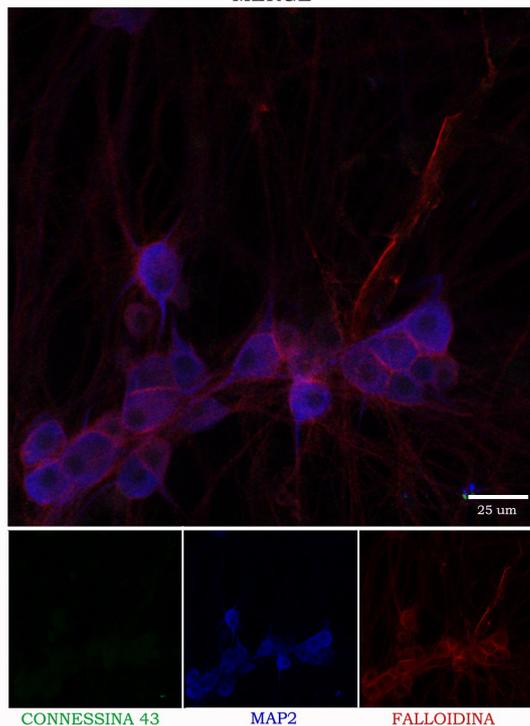
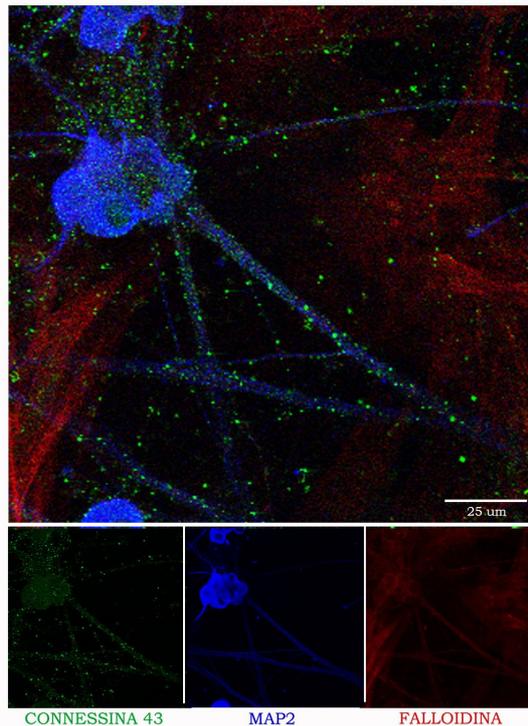


Fig. 10: Neuroni (a), Cocolture (b) ed MSC (c) in coltura da un mese. Immunofluorescenza per connessina 36 (verde), Map2 (blu) e falloidina (rosso).

a) Neuroni in coltura da 1 mese
MERGEb) Cocolture di neuroni e MSC di 1 mese
MERGE

c) MSC in coltura da 1 mese

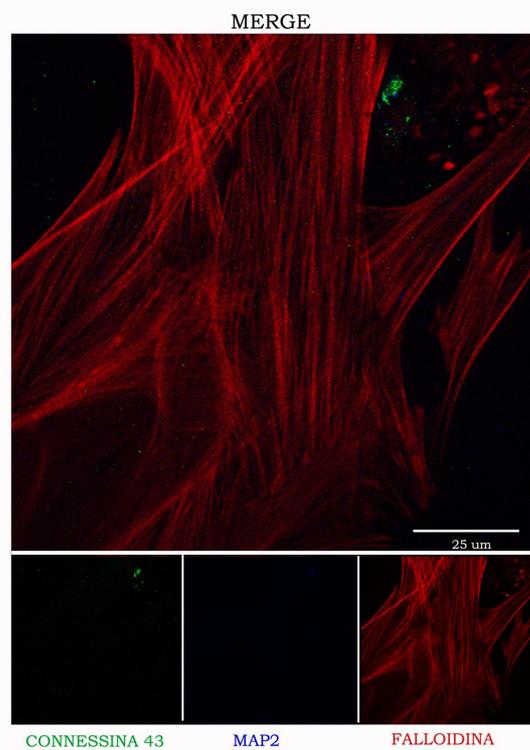
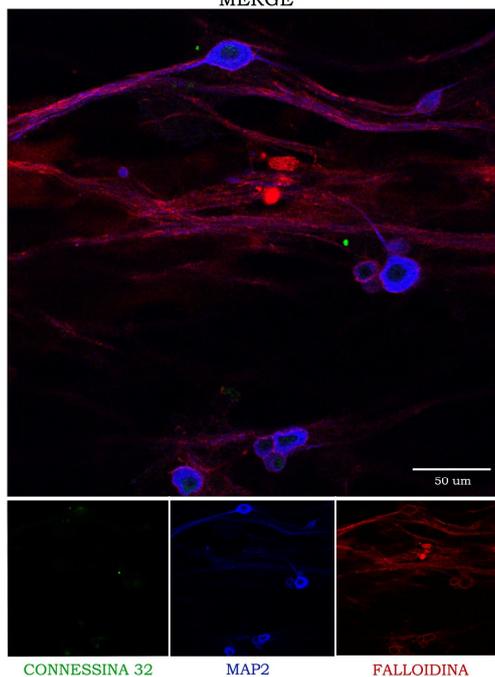
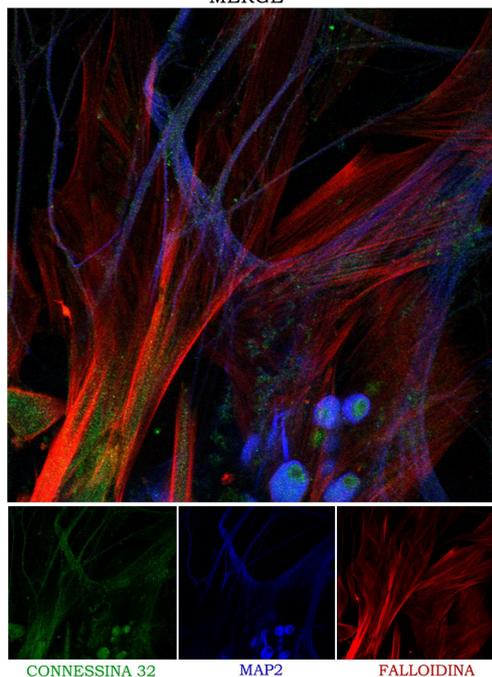


Fig. 11: Neuroni (a), Cocolture (b) ed MSC (c) in coltura da un mese. Immunofluorescenza per connessina 43 (verde), Map2 (blu) e falloidina (rosso).

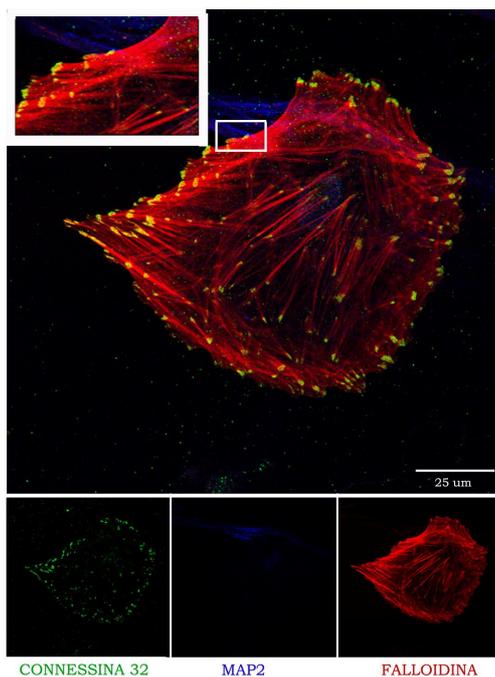
a) Neuroni in coltura da 1 mese
MERGE



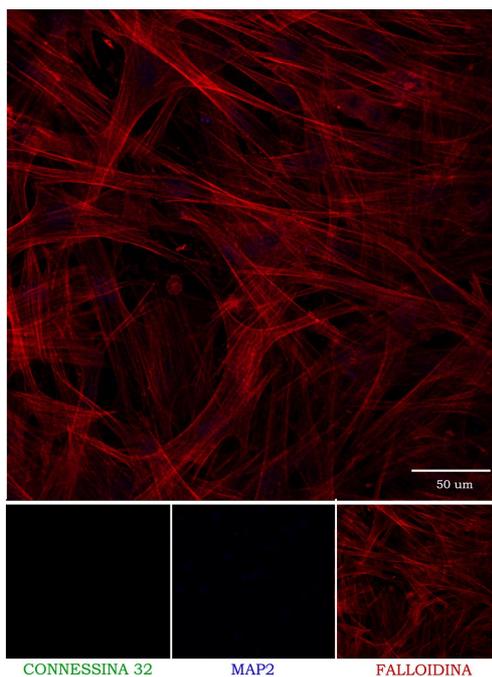
b) Neuroni e MSC in cocoltura da 1 mese
MERGE



c) Neuroni e MSC in cocoltura da 1 mese
MERGE



e) MSC in coltura da 1 mese
MERGE



d) Asse Z cocolture

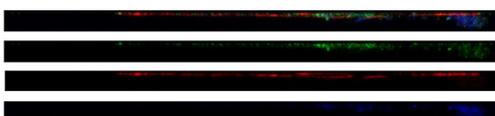


Fig. 12: Neuroni (a) e Cocolture (b, c, d) ed MSC (e) in coltura da un mese. Immunofluorescenza per Map2 (blu), falloidina (rosso) e Connexina 32 (verde). d) Asse Z delle cocolture.

5. MIELINIZZAZIONE NELLE COCOLTURE

Mediante analisi morfologica abbiamo evidenziato oltre ad un prolungamento della sopravvivenza neuronale anche una maturazione dei neuroni stessi, come osservato dall' aumento del numero di prolungamenti e dello spessore degli stessi nei neuroni in cocoltura rispetto ai neuroni da soli. Quindi abbiamo indagato se le MSC promuovessero anche la formazione della mielina, struttura fondamentale per una efficiente trasmissione dell'impulso nervoso. In microscopia elettronica è stata osservata la presenza di neuriti circondati dal citoplasma delle MSC (Fig. 13 a). Inoltre alcuni neuriti posti all'interno delle MSC presentano strutture mieliniche, fin dalle 2 settimane di cocoltura (Fig. 13, b). Nelle colture dei soli neuroni al contrario non è stato trovato alcun segno di mielinizzazione, né alle 2 né alle 4 settimane. La mielina ritrovata nelle cocolture è di tipo compatto, caratterizzato dai tipici avvolgimenti lamellari, e si può inoltre osservare la presenza della linea intraperiodo. Inoltre sia nell'immagine ad alto ingrandimento (Fig. 13 b), che in quella a basso ingrandimento (Fig. 13 c), si può osservare la presenza di una struttura morfologicamente paragonabile ad un nodo di Ranvier, indicando quindi che la mielina formata può essere funzionale. A 2 settimane di cocoltura lo spessore di mielina è compreso tra i 130 e i 250 nm, mentre il numero di layer è in media di 10. A 4 settimane di cocoltura (Fig 13 d, e) lo spessore di mielina va dai 141 nm nei casi di mielina più sottile ai 216 nm nei casi di mielina più spessa. Per quanto riguarda il numero di lamelle, esse variano da 10 a 14 avvolgimenti in base allo spessore della mielina. Inoltre lo spessore della mielina è molto variabile lungo il processo, da questo la variabilità delle misurazioni. Nel lavoro di Takeda et al 2001 (233) il numero di lamelle formate dopo 30 giorni di cocoltura tra neuroni sensitivi e cellule di Schwann è di 11, mentre nel lavoro di Keilhoff et al 2006 (228) nelle cocoltura di PC12 e cellule di Schwann il numero di lamelle dei neuriti mielinizzati è di 7. Dal confronto con questi risultati è possibile affermare che il numero di lamelle formate dalle MSC nelle nostre colture è paragonabile a quello formato nelle colture in vitro con le cellule di Schwann.

Per verificare che la mielina fosse effettivamente presente solo nei neuroni in cocoltura e non nei neuroni da soli sono state effettuati esperimenti di immunofluorescenza per osservare la presenza di una delle proteine più espresse nella mielina periferica, MBP. Nella Fig. 14 è possibile osservare immagini di microscopia confocale in cui si osserva la presenza di MBP lungo alcuni prolungamenti dei neuroni in cocoltura (Fig. 14 b). MBP è invece risultata assente nelle colture di soli neuroni (Fig. 14 a). Gli esperimenti di immunofluorescenza sono risultati positive per MBP solo a partire dalle 4 settimane di coltura, suggerendo che la mielina osservata a 2 settimane in microscopia elettronica non può essere evidenziata con questo tipo di tecnica. Un'ulteriore conferma della presenza di MBP e quindi di mielina solo nei neuroni in cocoltura è stata dimostrata mediante esperimenti di Immunoblotting. In Fig. 14 c possiamo osservare la presenza di MBP esclusivamente nei neuroni in cocoltura e non nelle colture di soli neuroni e di sole MSC. In questo caso MBP è stata osservata dopo 6 settimane di cocoltura, confermando ulteriormente che la presenza di questa proteina è osservabile solo nelle cocolture a lungo termine, e che prima la presenza di mielina è troppo bassa per essere osservata mediante Western Blotting.

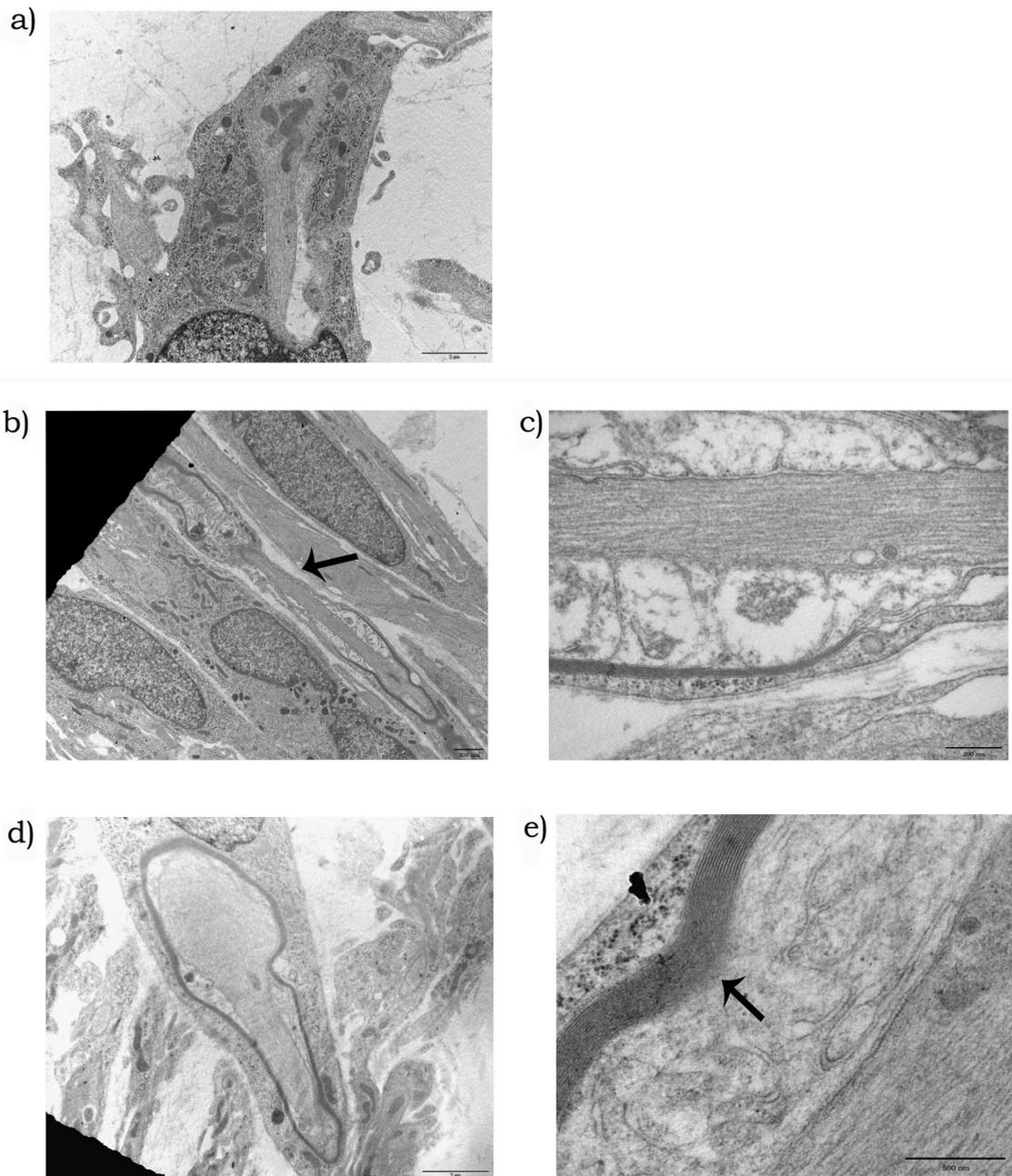


Fig. 13: Immagini di microscopia elettronica di coculture di neuroni e MSC. (a) Neurite circondato da una MSC. (b, c) Dopo 2 settimane di cocoltura si osserva la comparsa di mielina e la presenza di nodi di Ranvier, in basso (b) ed alto (c) ingrandimento. (d, e) Mielina compatta dopo 4 settimane di cocoltura a basso (d) ed alto (e) ingrandimento.

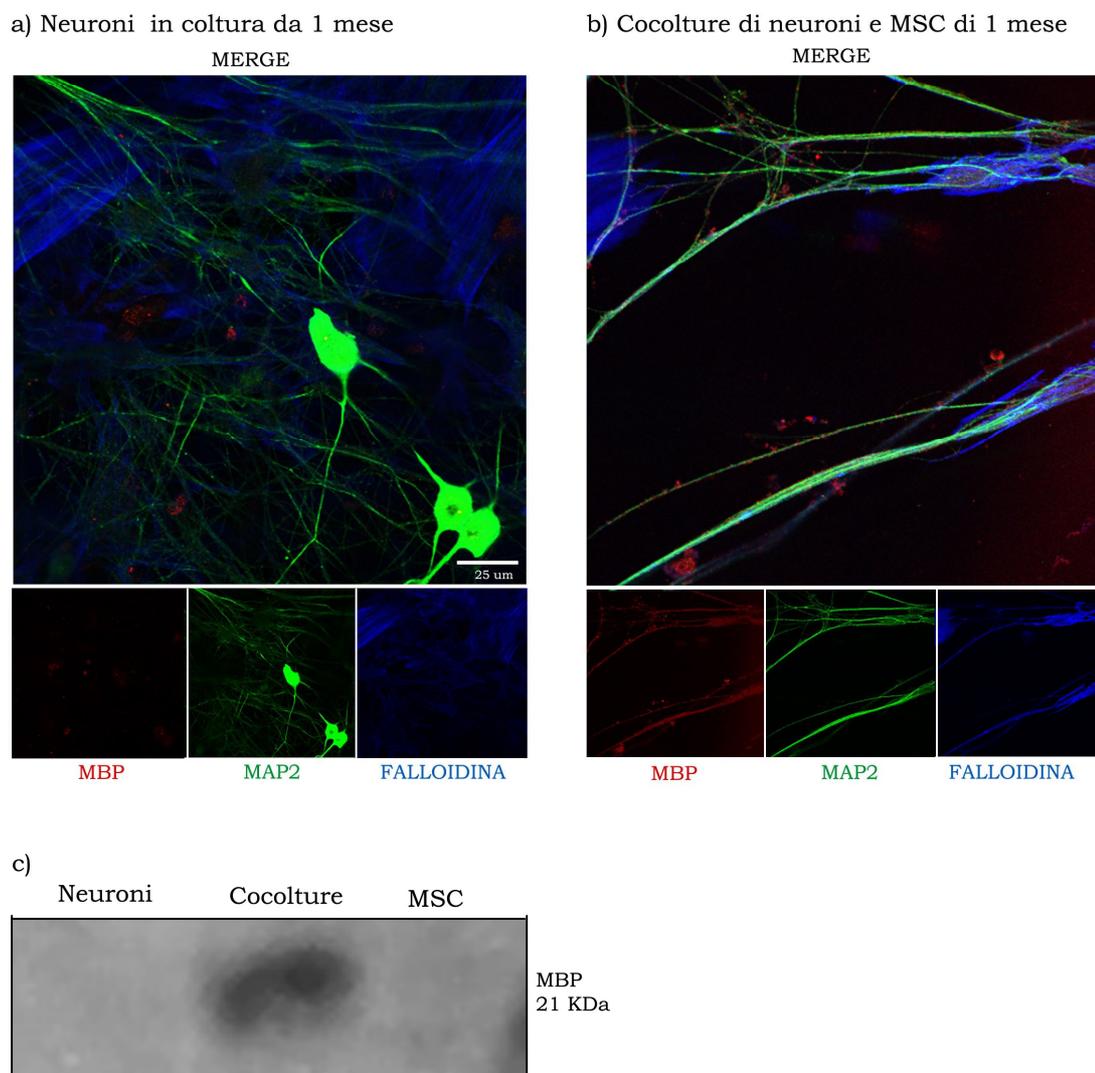


Fig. 14: Neuroni (a) e Cocolture (b) in coltura da un mese. Immunofluorescenza per Map2 (verde), falloidina (blu) e MBP (rosso). c) Western Blotting per MBP dopo 6 settimane di coltura.

5.1 VALUTAZIONE DELLA PRESENZA DI CELLULE GLIALI NELLE COLTURE NEURONALI

Dopo avere osservato la presenza della mielina nelle coculture è stato verificato se nelle colture di neuroni sensitivi fossero presenti cellule gliali. Infatti all'interno del ganglio sono presenti cellule gliali, che nelle nostre colture vengono eliminate dal trattamento con la Fluorodesossipuridina (10^{-5} μ M, FUDR), un intercalante che elimina le cellule in fase replicativa. In particolare le colture vengono trattate dal giorno successivo al piastramento con FUDR per 5 giorni, dopodichè vengono mantenute in terreno AN₂ con NGF. Per verificare la presenza di cellule satelliti e cellule di Schwann sono stati effettuati degli esperimenti di immunofluorescenza con dei marcatori specifici per le cellule di Schwann non mielinizzanti (GFAP) e mielinizzanti (S100) sulle colture neuronali con e senza il trattamento con FUDR per 5 giorni (Fig. 15 e 16). Gli esperimenti di immunofluorescenza sono stati effettuati sia dopo 5 giorni dal piastramento (subito dopo il trattamento con FUDR) che dopo 30 giorni.

Nelle immunofluorescenze si possono osservare subito dopo il trattamento con FUDR la presenza solo di frammenti di cellule marcati con GFAP (Fig. 15 a), mentre senza trattamento ci sono numerose cellule positive per tale marker gliale (Fig. 15 b). Dopo 30 giorni dal piastramento il risultato è confermato: nelle colture neuronali trattate con FUDR non ci sono cellule GFAP positive (Fig. 15 c), mentre nelle colture senza trattamento vi sono numerose cellule positive per il marcatore gliale (Fig. 15 d).

Anche per quanto riguarda S100 il risultato è analogo. Subito dopo il trattamento con FUDR non vi sono cellule positive per S100 (Fig. 16 a), mentre vi sono numerose cellule positive nelle colture neuronali senza trattamento con FUDR (Fig. 16 b). Dopo 15 (Fig. 16 c, d) e 30 (Fig. 16 e, f) giorni di coltura, nelle colture neuronali trattate con FUDR non vi sono cellule positive per S100, mentre le colture senza trattamento mostrano cellule S100 positive.

Abbiamo quindi dimostrato che nelle nostre colture neuronali non sono presenti cellule di Schwann che possono mielinizzare i prolungamenti neuronali.

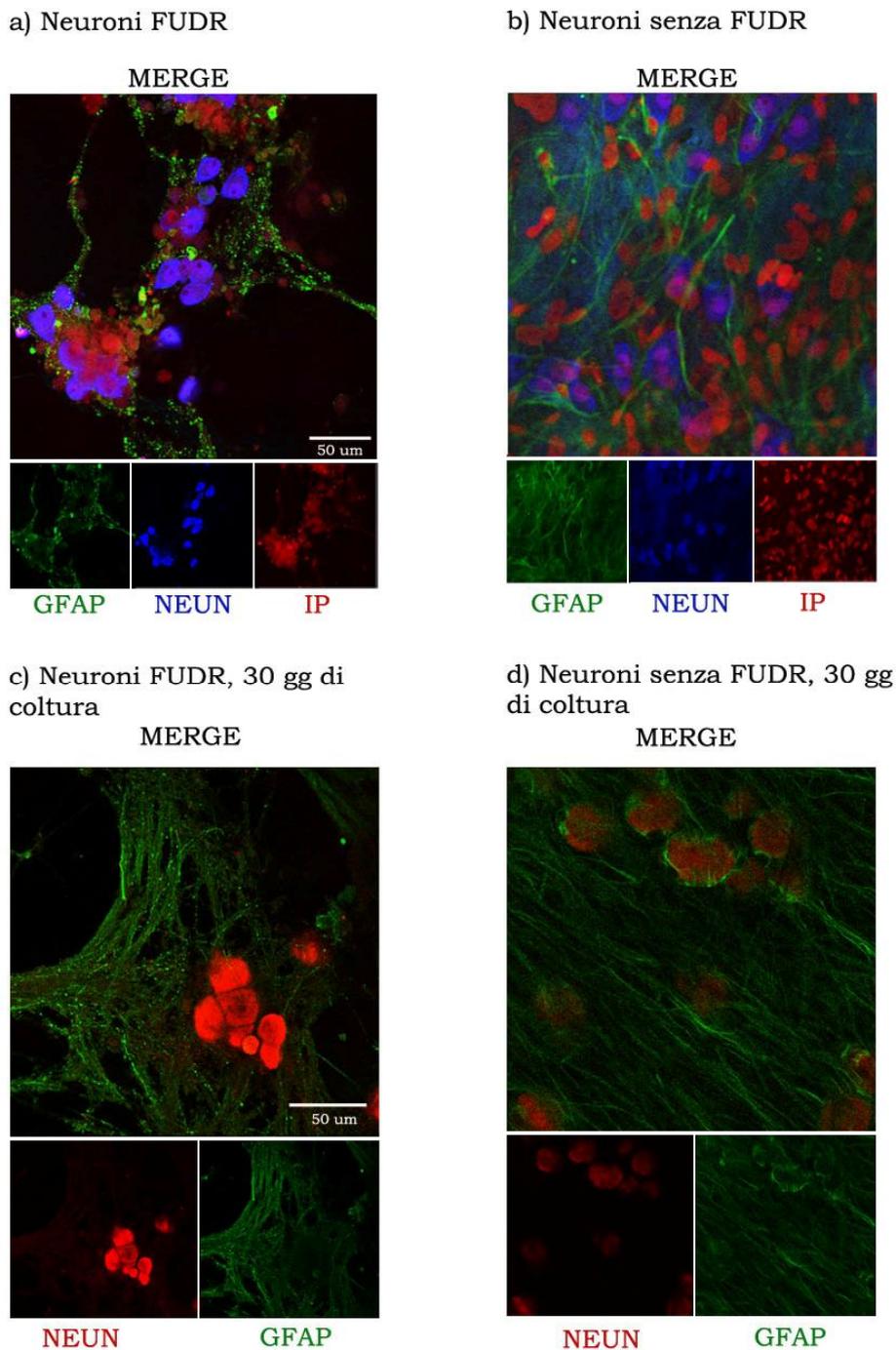


Fig.15: a, b). Immunofluorescenze di neuroni trattati con FUDR (a) e non trattati con FUDR (b) dopo 5 giorni dal piastramento. GFAP (verde), NeuN (Blu) e Ioduro di propidio (rosso). c- d) Neuroni trattati con FUDR (c) e non trattati con FUDR (d) dopo 30 giorni dal piastramento. NeuN (rosso), GFAP (verde).

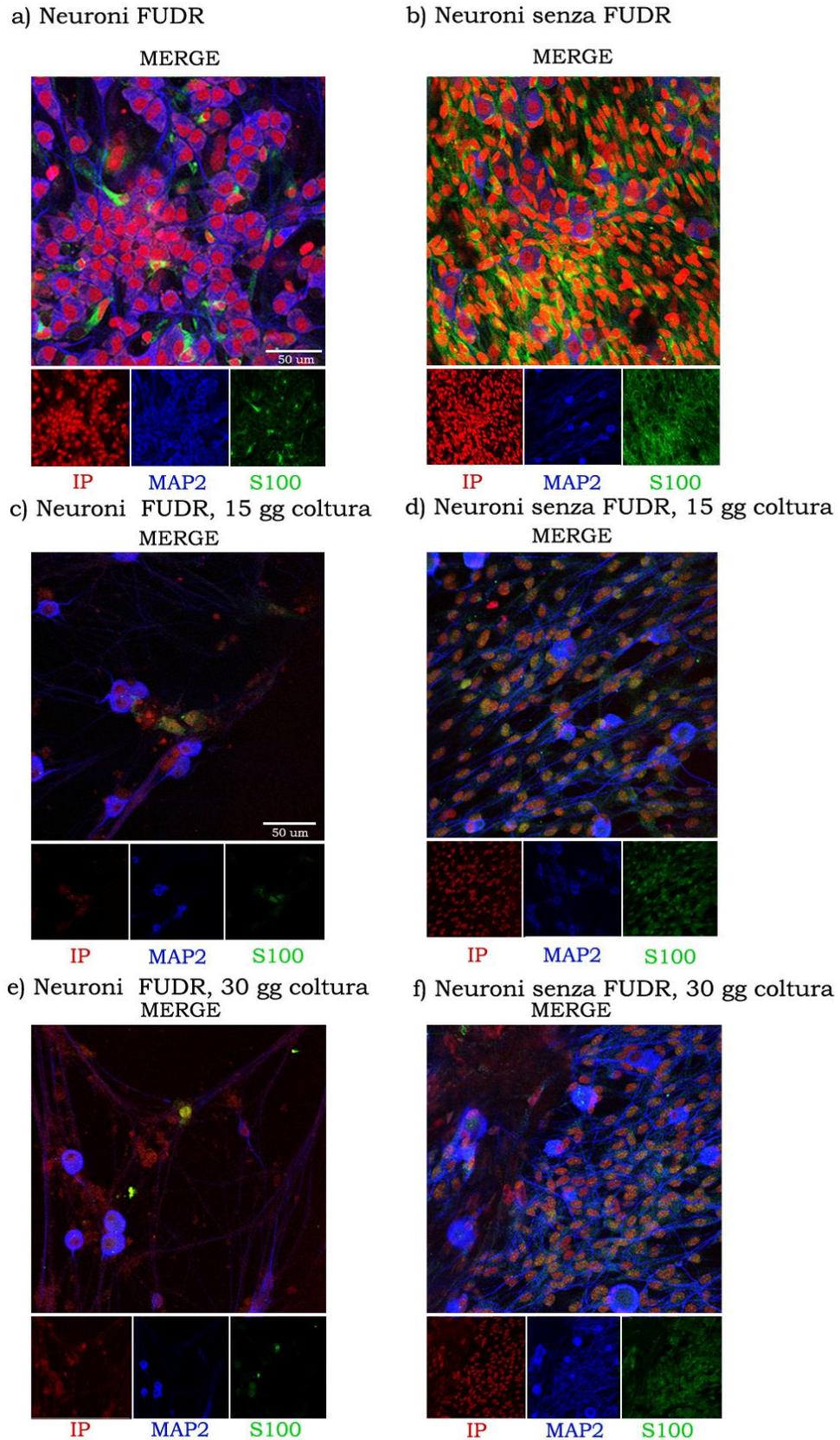


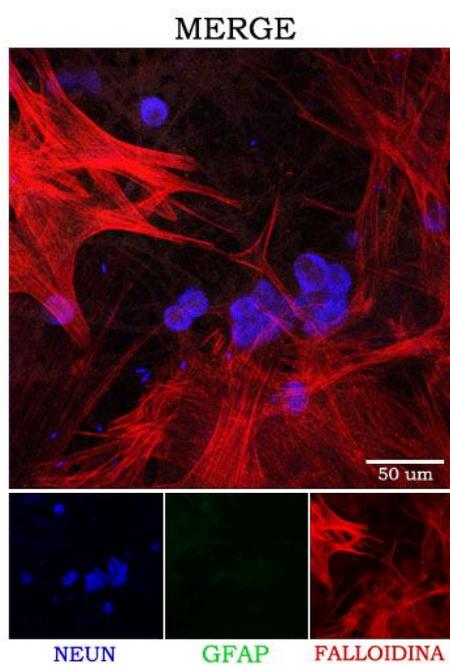
Fig 16: a,b). Immunofluorescenze di neuroni trattati con FUDR (a) e non trattati con FUDR (b) dopo 5 (a e b) ,15 (c e d) e 30 (e e f) giorni dal piastramento. S100 (verde), Map2 (Blu) e Ioduro di propidio (rosso).

5.2 VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE NELLE MSC DEI MARCATORI SPECIFICI DELLE CELLULE GLIALI

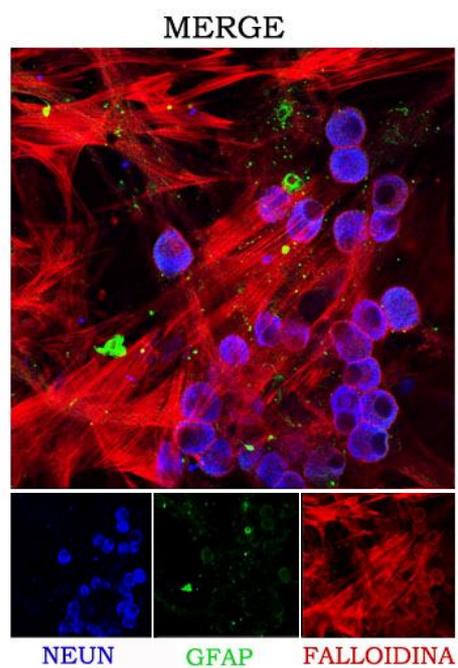
Dopo avere escluso la presenza di cellule gliali nelle colture primarie di neuroni sensitivi è stato verificata la presenza di MSC transdifferenziate in cellule di gliali mediante esperimenti di immunofluorescenza. In particolare è stata valutata la presenza di due marcatori specifici delle cellule di Schwann non mielinizzanti (GFAP) e mielinizzanti (S100) dopo 15 e 30 giorni di cocoltura.

A 15 e a 30 giorni dal piastramento non ci sono MSC positive per il marcatore gliale GFAP (Fig. 17), dimostrando quindi che le MSC non sono transdifferenziate in cellule di Schwann non mielinizzanti. Anche MSC in coltura da sole non esprimono tale marcatore gliale (Fig. 17 c).

a) Neuroni e MSC 15 giorni di cocoltura



b) Neuroni e MSC 30 giorni di cocoltura



c) MSC 30 giorni di coltura

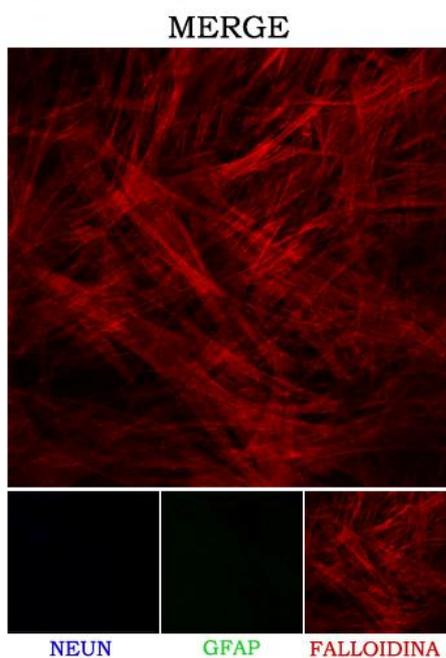
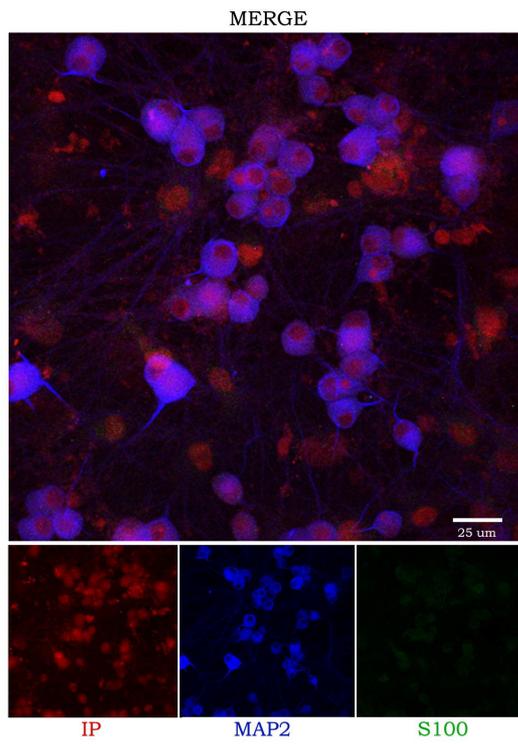


Fig 17: Immunofluorescenze delle cocolture dopo 15 e 30 giorni dal piastramento e delle sole MSC dopo 30 giorni dal piastramento. GFAP (verde), NeuN (Blu) e falloidina (rosso).

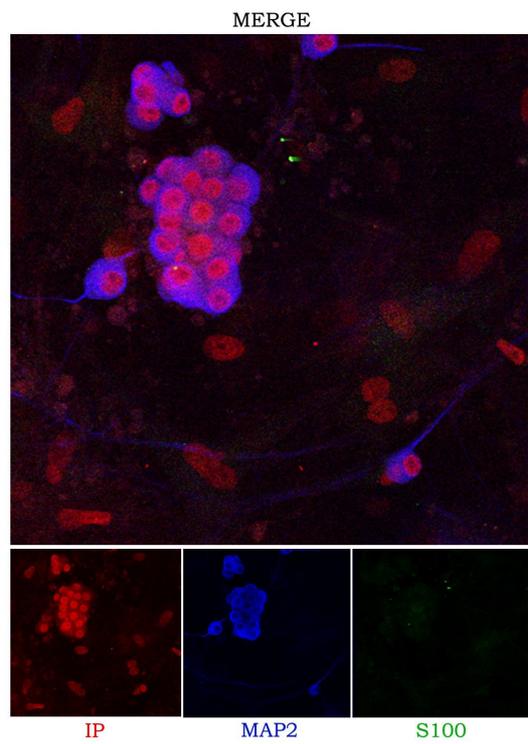
Anche per quanto riguarda S100, né a 15 né a 30 giorni vi sono cellule positive per il marcatore (Fig. 18 a, b). Inoltre è stato dimostrato che le MSC non esprimono spontaneamente in coltura il marcatore gliale S100 (Fig. 18 c).

I risultati precedenti indicavano che nelle colture primarie di neuroni fossero presenti solo neuroni e non cellule gliali; questi risultati indicano che le MSC non transdifferenziano in cellule gliali, come evidenziato dall'assenza dell'espressione dei marcatori analizzati. Da queste dimostrazioni possiamo affermare che le MSC in cocoltura con i neuroni sensitivi ne mielinizzano alcuni processi senza transdifferenziare in cellule di Schwann.

a) Neuroni e MSC in cocoltura da 15 gg



b) Neuroni e MSC in cocoltura da 30 gg



c) MSC in coltura da 30 gg.

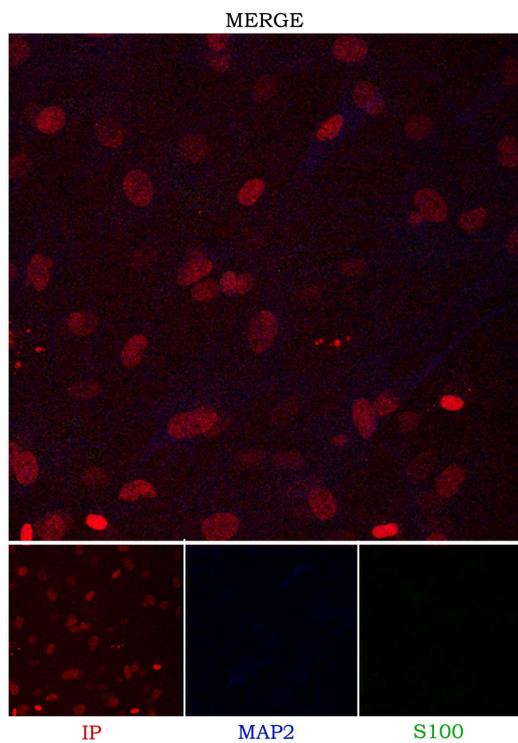


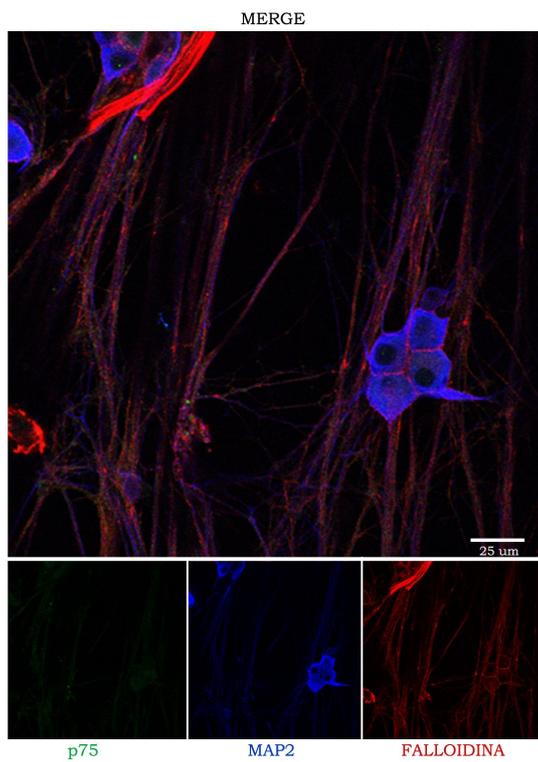
Fig 18: Immunofluorescenze di cocolture dopo 15 e 30 giorni dal piastramento (a e b). c) MSC dopo 30 giorni dal piastramento. S100 (verde), Map2 (Blu) e Ioduro di propidio (rosso).

6 ANALISI DELLE MOLECOLE COINVOLTE NELLA MIELINIZZAZIONE

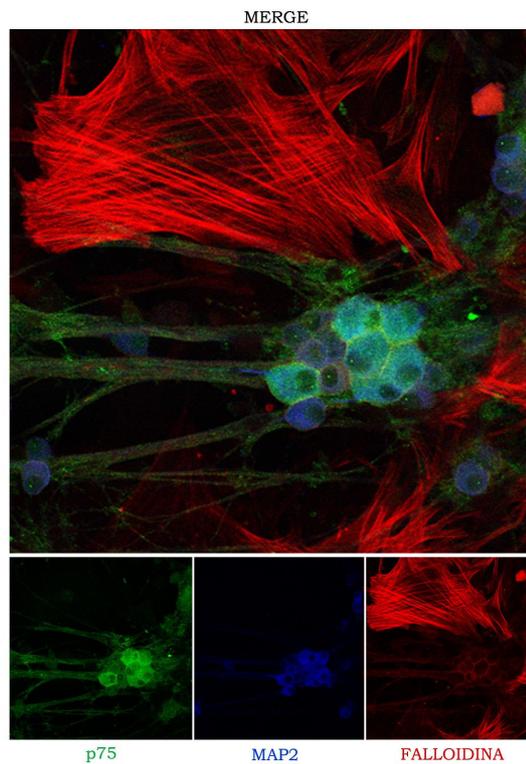
In letteratura vi sono molti lavori che studiano il processo di mielinizzazione, anche se tuttavia rimangono dei dubbi riguardo ai meccanismi molecolari che inducono la mielinizzazione.

Un ruolo fondamentale sembra essere svolto dalle neurotrofine e dai loro recettori. Per questo abbiamo analizzato la presenza nei neuroni da soli e nelle coculture di tre classi di recettori: p75, TrkA, TrkB e TrkC. Per quanto riguarda p75, esso è un recettore aspecifico per tutte le neurotrofine, ma in letteratura sono presenti molti lavori che dimostrano che il legame con p75 a livello assonale e il BDNF è uno dei segnali che portano alla mielinizzazione da parte delle cellule di Schwann. Nelle immunofluorescenze effettuate si può osservare che p75 è assente nelle sole colture neuronali (Fig. 19 a), mentre è presente sia a livello citoplasmatico che dei prolungamenti nei neuroni in cocoltura (Fig. 19 b). p75 è inoltre assente nelle MSC in coltura da sole (Fig. 19 c). Questo risultato suggerisce che p75 possa essere coinvolto nel processo di mielinizzazione. TrkA invece è il recettore specifico per l'NGF ed è risultato espresso in ugual modo nelle colture di soli neuroni e nelle coculture (Fig. 20 a, b), e assente nelle MSC (Fig. 20 c). TrkB (Fig. 21) è il recettore specifico per il BDNF, ed è risultato assente sia nelle colture di soli neuroni (Fig. 21 a), che nelle coculture (Fig. 21 b), che nelle MSC (Fig. 21 c). TrkC invece è il recettore specifico per NT3 e 4. Negli esperimenti di immunofluorescenza TrkC è risultato assente nelle sole colture di neuroni, nelle coculture e nelle MSC (Fig. 22 a, b, c).

a) Neuroni in coltura da 1 mese



b) Cocolture di neuroni e MSC di 1 mese



c) MSC in coltura da 1 mese

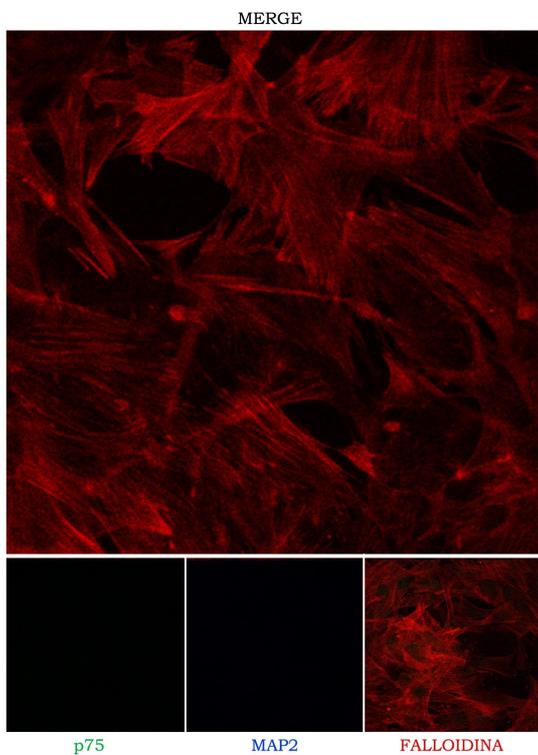
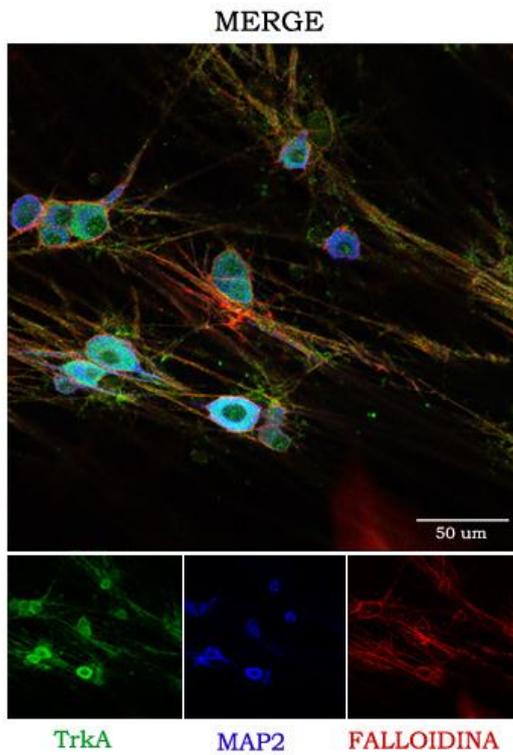
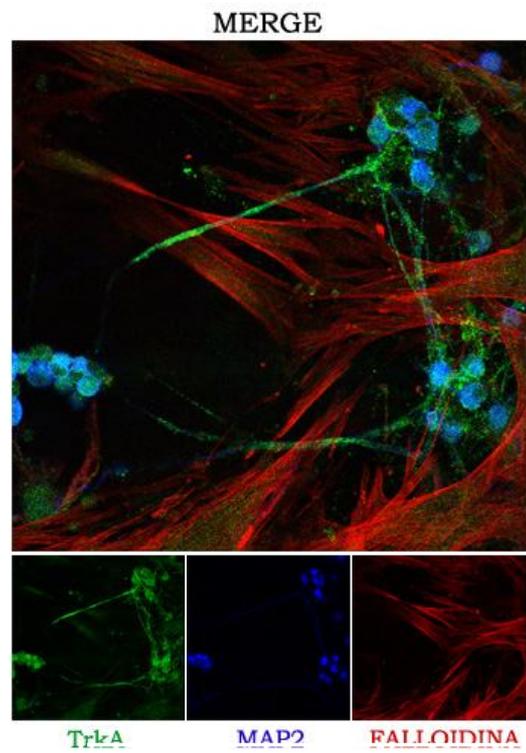


Fig. 19: Neuroni (a), coculture (b) ed MSC (c) in coltura da un mese. Immunofluorescenza per Map2 (blu), falloidina (rosso) e p75 (verde).

a) Neuronii in coltura da un mese



b) Neuronii e MSC in cocoltura da un mese



c) MSC in coltura da un mese

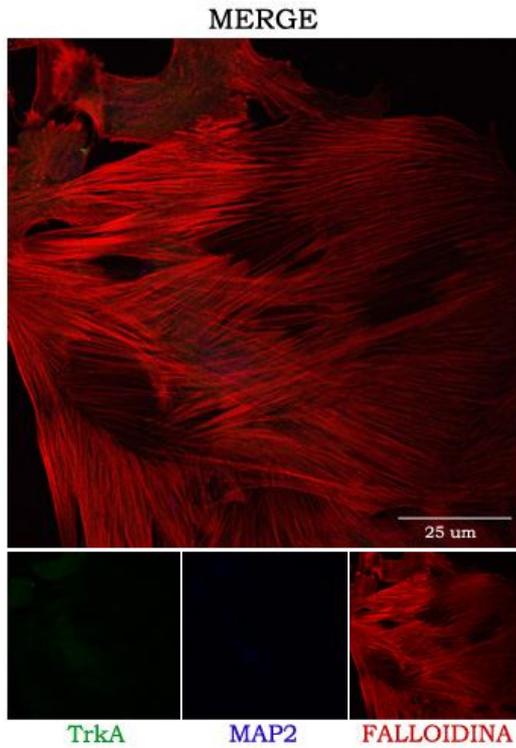
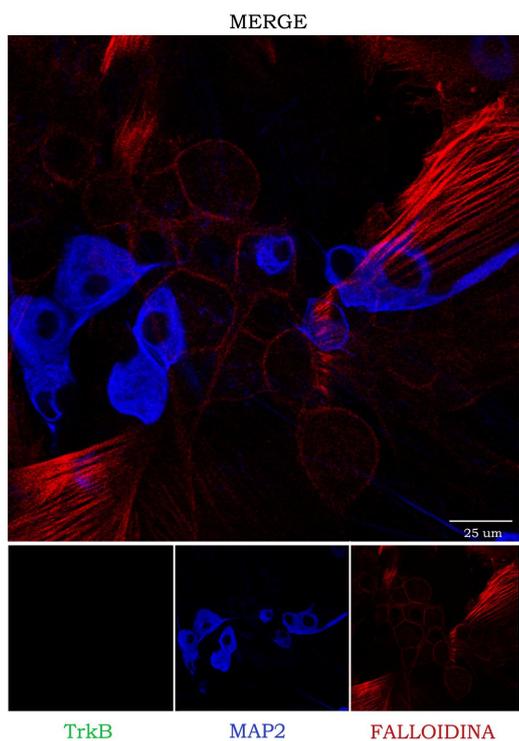
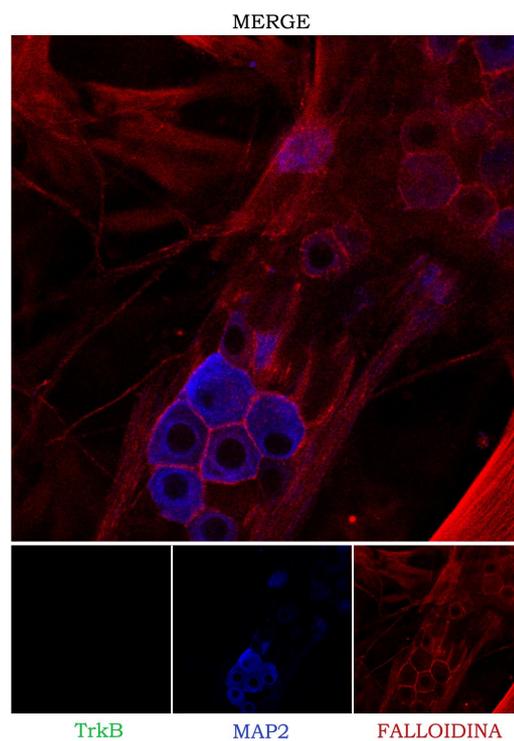


Fig. 20: Neuronii (a), cocolture (b) ed MSC (c) in coltura da un mese. Immunofluorescenza per Map2 (blu), falloidina (rosso) e TrkA (verde).

a) Neuroni in coltura da 1 mese



b) Neuroni e MSC in cocoltura da 1 mese



c) MSC in coltura da 1 mese

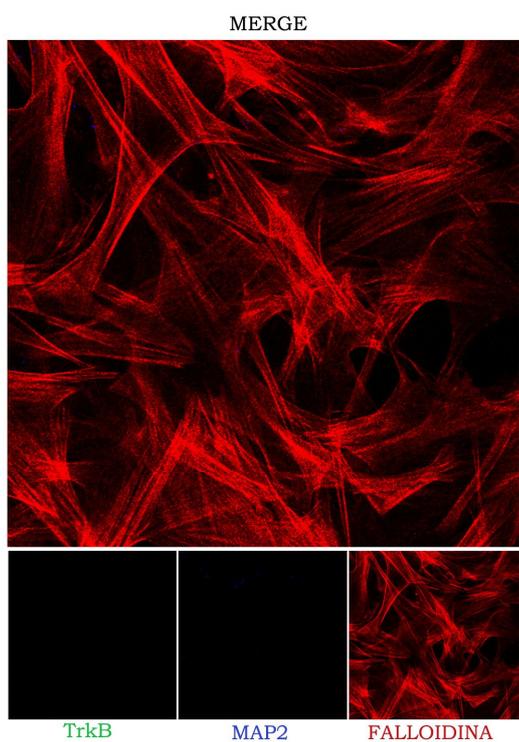
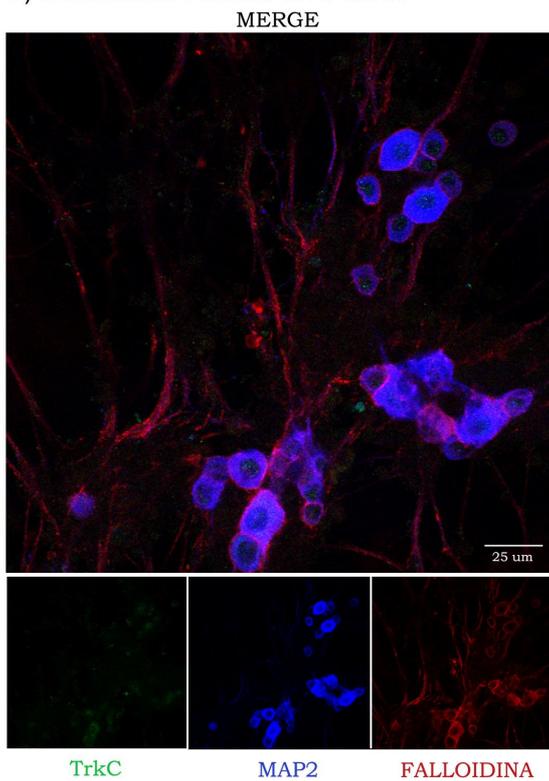
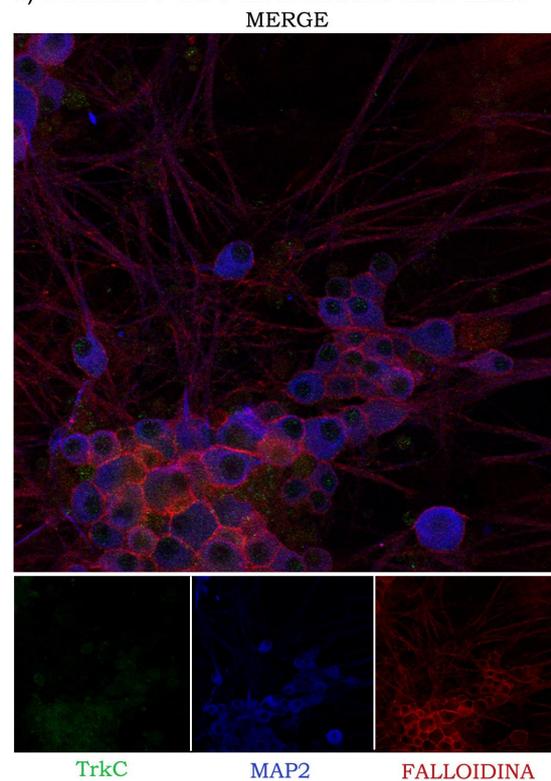


Fig. 21: Neuroni (a), cocolture (b) ed MSC (c) in coltura da un mese. Immunofluorescenza per Map2 (blu), falloidina (rosso) e TrkB (verde).

a) Neuroni in coltura da 1 mese



b) Neuroni e MSC in cocoltura da 1 mese



c) MSC in coltura da 1 mese

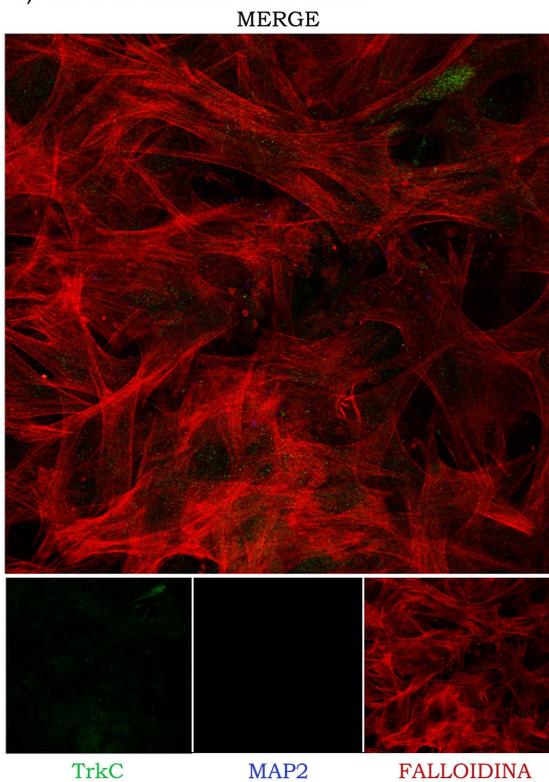


Fig. 22: Neuroni (a), coculture (b) ed MSC (c) in coltura da un mese. Immunofluorescenza per Map2 (blu), falloidina (rosso) e TrkC (verde).

DISCUSSIONE

Le malattie demielinizzanti sono malattie altamente debilitanti che colpiscono numerose persone in tutto il mondo e per le quali non esiste ancora una terapia efficace. Tra le malattie demielinizzanti, la più frequente nel sistema nervoso centrale è la Sclerosi Multipla, mentre nel sistema nervoso periferico troviamo la Sindrome di Charcot Marie Tooth. Tutti i farmaci per la sclerosi multipla ad oggi in commercio diminuiscono la frequenza delle ricadute e la formazione di nuove placche, ma non sono in grado di contrastare a lungo termine la progressione della malattia (84). Per la Sindrome di Charcot Marie Tooth invece non esistono ancora farmaci o terapie. Data la mancanza di cure efficaci oggi disponibili per il trattamento della demielinizzazione è di forte interesse l'applicazione di tecniche di replacement cellulari con cellule deputate alla produzione di mielina. Fin dagli anni settanta sono stati sviluppati numerosi studi al fine di riportare la mielina in aree demielinizzate del sistema nervoso. In particolare sono state trapiantati progenitori di oligodendriociti e cellule di Schwann. Tuttavia l'utilizzo sia dei precursori degli oligodendriociti che delle cellule di Schwann pone dei problemi: un basso tasso di crescita ed espansione in vitro, capacità di mielinizzare solo ristrette aree del cervello (223), capacità di mielinizzare solo se viene indotta anche una reazione infiammatoria (234, 235) e, per le cellule di Schwann, capacità di mielinizzare solo in assenza di astrociti. Le proprietà funzionali e morfologiche delle cellule staminali potrebbero superare queste difficoltà rappresentando in futuro una terapia alternativa per le malattie demielinizzanti. All'interno del panorama delle cellule staminali, le MSC per le loro proprietà di facile reperibilità, di plasticità, di rapida espansione e di ipoimmunogenicità, offrono interessanti prospettive di cura per patologie demielinizzanti (85). Inoltre, a differenza delle cellule staminali embrionali, esse non sono tumorigeniche e, a differenza delle cellule staminali neurali, le MSC sono più semplici da manipolare e da coltivare (126, 127), oltre a non presentare problemi di tipo etico.

Le cellule staminali mesenchimali (MSC) sono cellule staminali adulte indifferenziate e multipotenti che possono essere isolate ed espanse da diversi tessuti adulti quali il midollo osseo (152), il sangue periferico (162), i tessuti adiposo, muscolare e sinoviale (161).

In letteratura esistono numerose pubblicazioni che dimostrano il potenziale terapeutico dell'utilizzo delle MSC in diverse patologie dai disturbi neurologici [236], ai problemi cardiovascolari [196] fino a patologie che coinvolgono il fegato come la fibrosi epatica. In particolare numerosi lavori enfatizzano l'uso delle MSC nell'ambito delle malattie demielinizzanti. Studi in vivo condotti su animali affetti da EAE hanno dimostrato che le MSC sono in grado di migliorare il decorso della patologia demielinizzante, grazie alle loro capacità immunomodulatorie, diminuendo la risposta autoimmune (176). Nel lavoro di Gerdoni 2007 (178) è inoltre stato dimostrato che le MSC somministrate ad animali affetti da EAE diminuiscono gli infiltrati infiammatori, la demielinizzazione e la perdita assonale, ma non transdifferenziano in cellule nervose o gliali, dimostrando anche in questo caso il miglioramento della malattia a causa dell'interferenza delle MSC con il sistema immunitario.

Nel nostro studio abbiamo dimostrato che le MSC di ratto sono in grado di supportare in vitro la sopravvivenza a lungo termine di neuroni sensitivi primari altrimenti destinati a morire, che le stesse riescono a connettersi con i neuroni e che sono in grado di mielinizzarne i processi.

Il ruolo neuroprotettivo delle MSC dai nostri esperimenti risulta essere mediato dal contatto diretto tra i due tipi cellulari posti in coltura, infatti la sopravvivenza neuronale a lungo termine si osserva solo nelle coculture dirette tra MSC e neuroni e non in quelle indirette, dove viene evitato il contatto tra i due tipi cellulari. Anche altri lavori scientifici sostengono che il contatto diretto tra MSC e altri tipi cellulari sia fondamentale, da un lato, per il differenziamento delle MSC stesse (236, 237, 238), dall'altro, per l'influenza che le MSC possono avere nei confronti di altri tipi cellulari (239). Un lavoro pubblicato da Wang e collaboratori dimostra che il contatto cellula-cellula è in grado di guidare le MSC verso il differenziamento cardiomiocitico e muscolare liscio. In questo lavoro è stato dimostrato che le

MSC in cocoltura diretta con cardiomiociti o cellule muscolari lisce (SMC) differenziano verso il tipo cellulare con il quale sono state messe in coltura. Lo stesso risultato non è stato osservato nelle cocolture indirette e colture di sole MSC trattate con medium condizionato dei due precedenti tipi cellulari, cardiomiociti e SMC. Un altro recente lavoro dimostra che se le MSC sono poste in contatto con cellule endoteliali, queste ultime inducono il differenziamento delle MSC in cellule endoteliali stesse e in cellule muscolari lisce (238). Il lavoro di Ball (239) dimostra inoltre che, non solo le MSC poste in cocoltura diretta con cellule muscolari lisce e cellule endoteliali sono in grado di differenziare in entrambe i tipi cellulari, ma anche che, se messe in cocoltura diretta con fibroblasti dermici, questi ultimi differenziano in miofibroblasti. Nel lavoro di Li QM et al (240) è stato inoltre dimostrato che le MSC promuovono il differenziamento delle cellule staminali neurali in oligodendriociti, se poste in cocoltura con esse. Da tutti questi lavori è possibile quindi affermare che le MSC sono da un lato influenzabili dal tipo cellulare in diretto contatto con loro e dall'altro sono in grado di guidare il differenziamento di altri tipi cellulari.

In un precedente lavoro di Scuteri et al. (230) è stato escluso il differenziamento delle MSC in senso neuronale o gliale in seguito a cocoltura con neuroni sensitivi. Inoltre in questo lavoro abbiamo escluso anche un differenziamento delle MSC in cellule di Schwann mielinizzanti. In letteratura è ancora acceso il dibattito circa la reale possibilità che le MSC possano differenziare in cellule nervose funzionanti. Cuevaz e colleghi dimostrano che le MSC sono in grado di sopperire ad un danno nervoso sostituendosi alle cellule danneggiate mediante un processo di trans-differenziamento che porterebbe le MSC ad assumere il fenotipo di cellule neurali (216). Un altro lavoro mostra che le MSC sono in grado di esprimere markers gliali in seguito all'esposizione in vitro al Glial Growth Factor (GGF) e che, una volta somministrate in un modello animale di danno periferico, sono in grado di favorire la rigenerazione delle cellule di Schwann. Tuttavia alcuni autori ritengono che questo tipo di differenziamento possa essere semplicemente un artefatto e non un vero e proprio trans-differenziamento (192).

Dimostrata la necessità del contatto tra MSC e neuroni per il prolungamento della sopravvivenza neuronale, in questo lavoro abbiamo cercato di capire se l'effetto protettivo delle MSC fosse dovuto alla secrezione di fattori neurotrofici, come riportato in altri studi che hanno osservato la produzione da parte delle MSC di fattori neurotrofici quali l'NGF e il Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), in grado di supportare la sopravvivenza neuronale e di promuovere la rigenerazione dei nervi in sede di lesione. Inoltre la somministrazione di MSC promuove il recupero funzionale in modelli animali di trauma cerebrale in seguito alla produzione di fattori neurotrofici quali l'NGF (74). Nel nostro modello sperimentale l'NGF, ossia il fattore di crescita fondamentale per la sopravvivenza neuronale, viene aggiunto al medium di coltura neuronale in tutte le condizioni sperimentali da noi analizzate. I neuroni in coltura da soli nonostante siano coltivati in terreno con NGF vanno incontro a degenerazione già a partire dalla seconda settimana di coltura, mentre se in cocoltura con le MSC la loro morte viene ritardata. Il ruolo neuroprotettivo delle MSC non è dovuto alla secrezione di ulteriori fattori neurotrofici, oltre all'NGF già presente nel medium di coltura, poiché il medium condizionato delle sole MSC e quello delle coculture di neuroni ed MSC, non sono sufficienti a supportare la sopravvivenza neuronale a lungo termine. Quindi le MSC non secernono nel medium di coltura, né spontaneamente né in seguito a contatto con i neuroni, fattori neurotrofici in quantità sufficienti a prolungare la sopravvivenza neuronale, pur non potendo escludere che vi sia da parte delle MSC rilascio di fattori neurotrofici che possano concorrere all'effetto neuroprotettivo da noi osservato.

Partendo da questo risultato che dimostra che le MSC promuovono la sopravvivenza neuronale mediante il contatto diretto abbiamo voluto caratterizzare il tipo di morte cellulare dei neuroni sensitivi. Sia in esperimenti di microscopia ottica ed elettronica, che di immunofluorescenza mediante l'osservazione della caspasi 3 attiva, che di citofluorimetria mediante il test dell'Annexina V, è stato dimostrato che questi muoiono per apoptosi, e che le MSC in seguito al contatto preservano le colture di neuroni da questa morte. I neuroni possono morire per apoptosi in seguito a diversi

stimoli, come per esempio in mancanza di fattori neurotrofici, nel caso dei neuroni sensitivi dell'NGF, dopo perdita di aderenza al substrato, in un processo chiamato anoikis (97), dopo esposizione a sostanze tossiche, farmaci, radicali liberi dell'ossigeno e radiazioni ionizzanti che causano danni al DNA o gravi stress al reticolo endoplasmatico o ai mitocondri (96). Inoltre la morte neuronale per apoptosi è caratteristica di molte malattie neurodegenerative, come la Sclerosi Laterale Amiotrofica, l'Alzheimer, il morbo di Parkinson e la Corea di Huntington (96).

Dopo avere dimostrato che le MSC promuovono la sopravvivenza neuronale mediante il contatto diretto, abbiamo anche valutato la presenza di punti di contatto e di connessione tra neuroni ed MSC. Infatti sono state osservate in microscopia elettronica delle connessioni tra prolungamenti di neuroni e MSC. Inoltre è stato osservato mediante il trasferimento del colorante citoplasmatico calceina tra le due popolazioni, che tra MSC e i neuroni vi può essere uno scambio di molecole, e che in alcuni punti di contatto tra MSC e neuroni sono espresse a livello di membrana le connessine neuronali, ovvero la connessina 32, 36 e 43 (31). Le connessine sono proteine che formano le gap junction. Le gap junction sono delle giunzioni che promuovono lo scambio di molecole, e in particolare nei neuroni sono fondamentali per le sinapsi elettriche, in quanto lasciano passare ioni e piccole molecole. In altri studi è stata osservata la presenza di connessine nelle MSC in cocoltura con diverse popolazioni cellulari, come i miociti e i cardiomiociti (241). In particolare nel lavoro di Beeres et al 2005 (242) è stato dimostrato che le MSC in cocoltura con i cardiomiociti sono in grado di connettersi, e che queste connessioni possono promuovere lo scambio di molecole, dimostrato come nel nostro caso con il trasferimento di calceina tra cardiomiociti e MSC, e formare delle gap junction con i cardiomiociti stessi. In un altro lavoro è stato dimostrato che le MSC umane in coltura si interconnettono tra di loro mediante giunzioni aderenti (243). Anche MSC umane predifferenziate in osteociti sottoposte a stress meccanico esprimono connessina 43 e formano le gap junction tipiche degli osteoblasti (244). Nel nostro caso abbiamo osservato la presenza di connessine e, in particolare,

della connessina 32, a livello di punti di contatto tra il neurite e le MSC, suggerendo che neuroni ed MSC possano connettersi.

Oltre a promuovere la sopravvivenza neuronale, mediante il contatto diretto tra neuroni ed MSC, ed avere dimostrato che le due popolazioni possono scambiarsi molecole, nel nostro lavoro abbiamo anche dimostrato che le MSC non transdifferenziate in cellule di Schwann sono in grado di promuovere la mielinizzazione di alcuni processi neuronali. Infatti abbiamo dimostrato la presenza solo nelle coculture e non nelle colture di soli neuroni di alcuni processi mielinizzati, sia mediante microscopia elettronica che mediante immunofluorescenza e immunoblotting. Inoltre, a differenza di altri lavori, abbiamo dimostrato che le MSC non transdifferenziano in cellule di Schwann in quanto non esprimono marcatori specifici di queste ultime. La mielina ritrovata nelle nostre colture non è quantitativamente abbondante, in particolare abbiamo riscontrato la presenza di mielina solo in sezioni longitudinali, mentre in sezioni trasversali, dove sarebbe stato più corretto effettuare le misurazioni, non abbiamo trovato assoni mielinizzati in quanto solo pochi assoni sono mielinizzati. Pur se non abbondante, la mielina ritrovata è sia mielina compatta, come dimostrato dalla presenza di numerose lamelle, che mielina funzionale, data la presenza di nodi di Ranvier. A questi risultati si aggiunge il ritrovamento della connessina 32 nelle coculture sia nei neuroni che nelle MSC. Questa proteina è infatti è anche una proteina della mielina, in particolare è presente nei paranodi e nelle incisore di Schmidt Lanterman della guaina mielinica, dove forma le caratteristiche gap junction.

In letteratura quasi tutti i lavori che hanno osservato la mielinizzazione da parte delle MSC hanno avuto la necessità di transdifferenziare prima di effettuare le coculture (224, 226), o si sono osservate le MSC stesse che spontaneamente transdifferenziavano in cellule di Schwann se poste in cocoltura con i neuroni (227). Nel nostro caso le MSC tendono spontaneamente a produrre mielina se poste in cocoltura con i neuroni, senza tuttavia transdifferenziare in cellule di Schwann complete, per quanto riguarda l'analisi dei marcatori analizzati. Questo risultato è molto importante in vista di una futura applicazione terapeutica delle MSC nella

cura delle malattie demielinizzanti. Infatti la necessità di manipolare le MSC mediante cocktail di citochine e di fattori anche tossici per transdifferenziarle in cellule di Schwann le renderebbero molto meno sicure per una applicazione clinica. Inoltre, come già detto, la valutazione del differenziamento delle MSC mediante analisi dell'espressione di marcatori specifici è ancora in fase di dibattito, in quanto alcuni autori sostengono da una parte che il differenziamento potrebbe essere un artefatto, dall'altra che nella popolazione totale di MSC ci possano essere varie sottopopolazioni che esprimono spontaneamente marcatori di lineages non mesengenic. Come già accennato numerosi studi, sia in vivo (224, 225, 226), che in vitro (227, 228), correlano le cellule staminali mesenchimali a processi di mielinizzazione. Nell'ambito dell'utilizzo delle MSC nelle malattie demielinizzanti, l'unico lavoro in cui le MSC non trasdifferenziate formano la mielina è quello di Akiama, in cui trapiantando MSC indifferenziate esprimenti GFP in ratti Wistar con una lesione focale demielinizzante, queste esprimono p0, una delle proteine costituenti la mielina, si dispongono lungo l'area demielinizzata e ne promuovono la rimielinizzazione. Negli altri lavori in vivo le MSC vengono prima predifferenziate in vitro e poi trapiantate in vivo (224, 228, 229). Allo stesso modo nei lavori in vitro le MSC precedentemente differenziate vengono in seguito poste in cocoltura con i neuroni o le cellule PC12 (228), e sono in grado di formare un tipo di mielina paragonabile per quanto riguarda il numero di lamelle a quella da noi ritrovata. In particolare nel nostro stesso modello di cocoltura di neuroni sensitivi e MSC il lavoro di Yang dimostra che le MSC transdifferenziano spontaneamente in cellule di Schwann se coltivate in un medium mielinogenico e poste in cocoltura dopo 18 giorni di trattamento dei neuroni sensitivi con FUDR per eliminare le cellule satelliti e successivamente mantenimento delle colture neuronali nel medium di coltura una settimana prima di aggiungere le MSC. Nel lavoro viene ampiamente sottolineata la capacità delle MSC di avvolgere gli assoni, e di formare mielina, anche se la mielina formata non è di tipo compatto. Nel nostro caso non viene utilizzato un medium mielinogenico ma il medium stesso di coltura dei neuroni, che tuttavia contiene acido ascorbico ed NGF, due costituenti che possono

promuovere la mielinizzazione. Questi due fattori potrebbero essere dei segnali che possono indurre la mielinizzazione da parte delle MSC. Inoltre dopo il trattamento di 5 giorni con FUDR le colture sono già prive di cellule satelliti e possono essere quindi già allestite le coculture con le MSC. Nel nostro modello inoltre le colture di soli neuroni dopo 3 settimane dal piastramento iniziano ad avere numerosi segni di degenerazione, che vengono invece posticipati di circa 6 settimane se dopo 5 giorni dal piastramento vengono aggiunte le MSC. Le diversità dei risultati da noi ottenuti rispetto al lavoro di Young possono essere quindi dovute a questi due fattori: tipo di medium, che nel loro caso promuove il differenziamento in senso gliale, e tempistica di aggiunta delle MSC alle colture neuronali, nel nostro caso dopo 5 giorni mentre nel loro dopo 25 giorni. Nei lavori precedentemente citati non viene proposto un meccanismo alla base della modalità di mielinizzazione delle MSC, ma viene esclusivamente osservata l'analisi dei marcatori gliali delle stesse dopo il differenziamento e la presenza di mielina nelle coculture. Noi osserviamo che gli assoni decorrono all'interno delle MSC, diversamente da come succede nel caso delle cellule di Schwann, che invece mostrano una tipica disposizione allungata del nucleo e l'inizio della deposizione di mielina compatta attorno all'assone. Al contrario nel nostro modello gli assoni si trovano all'interno delle MSC e qui vi è una deposizione piuttosto lassa di mielina, come dimostrato dagli spazi presenti tra la mielina e il citoplasma delle MSC, che in seguito viene compattata. Queste differenze nel processo di mielinizzazione devono essere approfondite, ma indicano una differente modalità delle MSC di mielinizzare rispetto alle cellule di Schwann e agli oligodendriociti.

In questo lavoro è stata anche indagata la presenza di alcuni fattori che promuovono la mielinizzazione, come i recettori per le neurotrofine TrkA, TrkB, TrkC e p75. TrkA è il recettore specifico per l'NGF. La medesima espressione di TrkA nei neuroni sensitivi nei due tipi di coltura può essere spiegata dal fatto che i neuroni sensitivi in coltura sopravvivono solo in presenza di NGF. La morte dei neuroni in coltura da soli per apoptosi dopo un mese dal piastramento e la presenza allo stesso tempo di TrkA suggerisce che i neuroni in coltura da soli muoiono anche se c'è NGF e se

sono ancora responsivi all'NGF stesso. P75 invece è un recettore aspecifico delle neurotrofine, e la sua espressione a livello assonale è uno dei fattori che promuovono la mielinizzazione (75). Nelle nostre colture è stato osservato p75 a livello assonale e citoplasmatico solo nei neuroni in cocoltura e non nei neuroni da soli. Questa differenza di espressione di p75 suggerisce che i neuroni posti in cocoltura con le MSC possano offrire dei segnali che inducono le MSC a mielinizzare. TrkB è il recettore specifico del BDNF ed è risultato assente sia nelle colture di soli neuroni che nelle coculture che nelle MSC. Visto che p75 è un recettore aspecifico anche del BDNF e che il legame tra BDNF e p75 è necessario per la mielinizzazione, in futuro sarebbe interessante indagare se le MSC secernono BDNF in cocoltura con i neuroni. Al contrario TrkC, un recettore di NT3, è risultato assente sia nei neuroni da soli che nelle coculture che nelle sole MSC. Nel processo di mielinizzazione NT3 risulta necessario nella prima fase di proliferazione delle cellule di Schwann, mentre durante la fase di mielinizzazione vera e propria l'espressione di NT3 diminuisce e il recettore TrkC viene downespresso.

Nel nostro caso TrkC è risultato assente nei neuroni, nelle coculture e nelle MSC, indicando, insieme agli altri risultati, che nelle coculture ci possono essere dei segnali che possano permettere con la loro downregolazione uno stato di mielinizzazione. Infatti si può ipotizzare che la presenza di p75 nei neuroni in cocoltura con le MSC possa essere un segnale che indichi alle MSC di iniziare la produzione di mielina, mentre l'assenza di TrkC potrebbe indicare uno stato permissivo alla mielinizzazione degli assoni.

In conclusione, in questo lavoro abbiamo dimostrato che le MSC proteggono le colture neuronali dall'apoptosi mediante il contatto diretto, che tra le due popolazioni ci può essere scambio di materiale e che le MSC sono in grado di mielinizzare i prolungamenti dei neuroni. Tutti insieme questi risultati indicano un possibile utilizzo di queste cellule per la cura da una parte delle malattie neurodegenerative, promuovendo il miglioramento della sopravvivenza neuronale, dall'altra per le malattie demielinizzanti, essendo esse stesse in grado di produrre mielina. La mielina ritrovata nelle nostre colture è piuttosto esigua, pur essendo compatta e presentando nodi di

Ranvier, quindi la comprensione dei meccanismi che conducono le MSC a mielinizzare è auspicabile per consentire un aumento dell'efficienza della mielinizzazione e per un possibile utilizzo terapeutico delle stesse. Inoltre risulta molto importante che non abbiamo dovuto manipolare le MSC per permettere loro di produrre mielina, rendendole quindi più sicure per un'applicazione terapeutica. Inoltre le stesse analisi devono sia essere ripetute con MSC umane, in quanto dalla letteratura emergono dati ancora contrastanti sulla corrispondenza di risultati tra modello di MSC di ratto e umane, che ripetute su altri tipi neuronali. In particolare noi vorremmo studiare i neuroni corticali ed ippocampali nel sistema nervoso centrale.

BIBLIOGRAFIA

1. Cunningham's. Trattato di anatomia, Piccin. 1995.
2. Olsson Y. Mast cells in the nervous system. *Int Rev Cytol.* 1968; 24: 27-70.
3. Jimenez-Andrade JM, Herrera MB, Ghilardi JR et al. Vascularization of the dorsal root ganglia and peripheral nerve of the mouse: implications for chemical-induced peripheral sensory neuropathies. *Mol. Pain.* 2008; 19: 4-10.
4. Jacob M and Weddell G. Neural intersegmental connection in the spinal root and ganglion region of the rat. *Journ. Comp Neurol.* 1975; 1; 161: 115-23.
5. Pannese E, Bianchi R, Calligaris B et al. Quantitative relationships between nerve and satellite cells in spinal ganglia. An electron microscopical study. I. Mammals. *Brain Res.* 1972; 13; 46: 215-34.
6. Sandri C, Van Buren JM d Akert K. Membrane morphology of the vertebrate nervous system. *Prog. Brain Res.* 1982; 46: 201-265.
7. Tetzlaff W. Tight junction contact events and temporary gap junctions in the sciatic nerve fibres of the chicken during Wallerian degeneration and subsequent regeneration. *J. Neurocytol.* 1982; 11: 839-858
8. Rios JC, Melendez-Vasquez CV, Einheber S et al. Contactin-associated protein (Caspr) and contactin form a complex that is targeted to the paranodal junctions during myelination. *J Neurosci.* 2000; 15; 20(22): 8354-64.
9. Susuki K and Rasband M. Molecular mechanisms of node of Ranvier formation. *Curr Opin. Cell Biol.* 2008; 20 : 616-623.
10. Fazan VP, Rodrigues Filho OA, Jordão CE et al. Ultrastructural morphology and morphometry of phrenic nerve in rats. *Anat Rec (Hoboken).* 2009; 292(4): 513-7.

11. Bianchi R, Calzi F et al. Biochemical analysis of myelin lipids and protein in a model of methyl donor pathway deficit: effect of S-adenosylmethionine. *Exp. Neur.* 1999; 159: 258-266.
12. Bradbury K and Lumsden CE. The chemical composition of myelin in organ cultures of rat cerebellum. *J. Neurochem.* 1978; 32: 145-154.
13. Bilderback TR, Chan J R et al. Measurement of the rate of myelination using a fluorescent analogue of ceramide. *J. Neurosci. Res.* 1997; 49: 497-507.
14. Zalc B, Monge M, Dupouey P et al. "Immunohistochemical localization of galactosyl and sulfogalactosylceramide in the brain of the 30 days old mouse". *Brain Research.* 1981; 211: 341-354.
15. Kursula P. Structural properties of protein specific to the myelin sheath. *Amino Acids.* 2008; 34: 175-185.
16. Quarles RH. Myelin sheaths: glycoprotein involved in their formation, maintenance and degeneration. *Cell Mol. Life Scie.* 2002; 5: 1851-1871.
17. Hai M, Muja N, DeVries GH et al. Comparative analysis of Schwann cell lines as model systems for myelin gene transcription studies. *J. Neurosci. Res.* 2002; 15; 69(4): 497-508.
18. Georgiou J and Charlton MP. Non-myelin forming perisynaptic Schwann cells express protein zero and myelin-associated glycoprotein. *GLIA.* 1999; 27(2): 101-109.
19. Kitamura K, Suzuki M and Uyemura K. Purification and partial characterization of two glycoproteins in bovine peripheral nerve myelin membrane. *Biochem. Biophys. Acta.* 1976; 14; 455(3): 806.
20. Snipes GJ, Suter U et al. Characterization of a novel peripheral nervous system myelin protein (PMP-22/SR13). *J. Cell Biol.* 1992; 117: 225-238.
21. Trapp BD. Myelin-associated glycoprotein. Location and potential functions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1990; 605: 29-43.

22. Lippincot, Williams and Wilkins. "Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular and Medical Aspects". 1999; sesta edizione
23. Vyshkina T and Kalman B. Autoantibodies and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Lab Inv.* 2008; 88: 796-807.
24. Nave KA and Trapp BD. Axon-glia signaling and the glial support of axon function. *Annu. Rev. Neurosci.* 2008; 31: 535-61.
25. Dytrych L, Sherman DL, Gillespie CS et al. Two PDZ domain proteins encoded by the murine periaxin gene are the result of alternative intron retention and are differentially targeted in Schwann cells. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 5794-800.
26. Fannon AM, Sherman DL, Ilyina-Gragerova G et al. Novel E-cadherin-mediated adhesion in peripheral nerve: Schwann cell architecture is stabilized by autotypic adherens junctions. *J. Cell Biol.* 1995; 129(1): 189-202.
27. Boggs JM. Myelin basic protein: a multifunctional protein. *Cell and mol. Life scie.* 2006; 63: 1945-1961.
28. Conlon P, Oksenberg JR, Zhang J, Steinman L. The immunobiology of multiple sclerosis: an autoimmune disease of the central nervous system. *Neurobiol. Dis.* 1999; 6(3): 149-66.
29. Uyemura K, Yoshimura K, Suzuki M, Kitamura K et al. Lipid binding activities of the P2 protein in peripheral nerve myelin. *Neurochem. Res.* 1984; 9 (10): 1509-14
30. Raval-Fernandes J and Rome LH. "Role of axonal components during myelination". *Microscopy res. and tec.* 1988; 41: 379-392.
31. Söhl G, Maxeiner S and Willecke K. Expression and functions of neuronal gap junctions. *Nat. Rev. Neurosci.* 2005; 6(3): 191-200.
32. Yoshimura T, Satake M and Kobayashi T. Connexin 43 is Another Gap junction protein in the peripheral nervous system. *J. Neurochem.* 1996; 67: 1252-1258.

33. Martini R and Carenini S. Formation and maintenance of the myelin sheath in the peripheral nerve: roles of cell adhesion molecules and the gap junction protein connexin 32. *Microsc. Res and Tec.* 1998; 41: 403-415.
34. Penfield W. "Neuroglia: normal and pathological". *Cytology and Cellular Pathology in the Nervous System*, edited by Penfield W. New York: Hoeber. 1932; 2: 421-479.
35. Pfeiffer SE, Warrington AE and Bansal R. The oligodendrocyte and its many cellular processes. *Trends Cell Biol.* 1993; 3: 191-197.
36. Raff MC, Lillien LE, Richardson et al. Platelet-derived growth factor from astrocytes drives the clock that times oligodendrocyte development in culture. *Nature.* 1988; 333: 562-565.
37. Peters A, Palay S, Webster HD. "The Fine Structure of the Nervous System: the Neuron and the Supporting Cells". Oxford, UK: Oxford Univ. Press. 1991.
38. Luskin MB, Pearlman AL and Sanes JR. "Cell lineage in the cerebral cortex of the mouse studied in vivo and in vitro with a recombinant retrovirus". *Neuron.* 1988; 1: 635-647.
39. Price J and Thurlow L. "Cell lineage in the rat cerebral cortex: a study using retroviral-mediated gene transfer". *Development.* 1988; 104: 173-182.
40. Gao FB, Aprply J and Raff M. "Cell-intrinsic timers and thyroid hormone regulate the probability of cell-cycle withdrawal and differentiation of oligodendrocyte precursor cells". *Develop. Biol.* 1998; 197: 54-66.
41. Hart IK, Richardson WD, Bolsover SR et al. "PDGF and intracellular signalling in the timing of oligodendrocyte differentiation". *J. of Cell. Biol.* 1989; 109: 3411-3417.
42. Pringle NP and Richardson WD. "A singularity of PDGF alpha-receptor expression in the dorso-ventral axis of the neural tube may define the origin of the oligodendrocyte lineage". *Development.* 1993; 117: 525-533.
43. Reynolds R and Wilkin GP. "Development of macroglial cells in rat cerebellum. II. An in situ immunistochemical study of oligodendroglial

- lineage from precursor to mature myelinating cell". *Development*. 1988; 102: 409-425.
44. Reynolds R and Wilkin GP. "Cellular reaction to an acute demyelinating/remyelinating lesion of the rat brainstem: localization of GD3 ganglioside immunoreactivity". *J. of Neurosci. Res.* 1993; 36: 417-434.
45. Barres BA and Raff M. "Axonal control of oligodendrocyte development". *J. of Cell Biol.* 1999; 147: 1123-1128.
46. Meyer-Franke A, Shen S and Barres BA. "Astrocytes induce oligodendrocyte processes to align with and adhere to axons". *Mol. Cell. Neurosci.* 1999; 14: 385-397.
47. Waxman SG and Sims TJ. "Specificity in the central myelination: evidence for local regulation of myelin thickness". *Brain Research.* 1984; 292: 179-185.
48. Almazan G, Honegger P, Matthieu JM. "Triiodothyronine stimulation of oligodendroglial differentiation and maturation. A developmental study". *Development Neuroscience.* 1985; 7: 45-54.
49. Noguchi T. "Effects of growth hormone on cerebral development: morphological studies". *Hormonal Research.* 1996; 45: 5-17.
50. Jung-Testas I, Schumacher M, Robel P et al. "Action of steroid hormones and growth factors on glial cells of the central and peripheral nervous system". *J. of Steroid Biochemical Molecular Biology.* 1994; 48: 145-154.
51. Jessen KR and Mirsky R. Signals that determine Schwann cell identity. *J Anat.* 2002; 200(4): 367-76.
52. Jessen KR. Glial cells. *Int J. Biochem. Cell Biol.* 2004; 36(10): 1861-7.
53. Stevens B, Tanner S and Fields RD. Control of myelination by specific patterns of neural impulses. *J. Neurosci.* 1998; 22: 9303-9311.
54. Court FA, Wrabetz L and Feltri ML. Basal lamina: Schwann cells wrap to the rhythm of space-time. *Curr. Opin. cell Biol.* 2006; 16: 501-507.

55. Ghislain J and Charnay P. Control of myelination in Schwann cells: a Krox20 cis-regulatory element integrate Oct6, Brn2 and Sox 10 activity. *Europ. mol. Biol Org.* 2006; 7, 1: 52-58.
56. Kawasaki T, Oka N et al. Oct6, a transcription factor controlling myelination, is a marker for active nerve regeneration in peripheral neuropathies. *Acta Neuropathol.* 2002; 105: 203-208.
57. Jeagle M and Meijer D. Role of Oct6 in Schwann cell differentiation. *Microsc. Res. and techn.* 1998; 41: 372-378.
58. Garbay B, Heape AM, Sargueil F, Cassagne C. Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol.* 2000; 61(3): 267-304.
59. Schumacher M, Guennoun R, Robert F, et al. Local synthesis and dual actions of progesterone in the nervous system: neuroprotection and myelination. *Growth Horm. IGF Res.* 2004; 14: S18-33.
60. Morgan L, Jessen K R and Mirsky R. Negative regulation of the P0 gene in Schwann cells: suppression of P0 mRNA and protein induction in cultured Schwann cells by FGF2 and TGF β 1, TGF β 2 and TGF β 3. *Development.* 1994; 120. 1399-1409.
61. Monje PV, Rendon S, Athauda G. et al. Non-antagonistic relationship between mitogenic factors and cAMP in adult Schwann cell re-differentiation. *Glia.* 2009; 57(9):947-61.
62. Lemke G, Chao M. Axons regulate Schwann cell expression of the major myelin and NGF genes. *Development.* 1988; 102(3): 499-504.
63. Brinkmann BG, Agarwal A et al. Neuregulin 1/ErbB signaling serves distinct functions in myelination of the peripheral and central nervous system. *Neuron.* 2008 ; 59 (4: 581-595.
64. Esper RM, Pankonin MS, Loeb JA. Neuregulins: versatile growth and differentiation factors in nervous system development and human disease. *Brain Res Rev.* 2006; 51(2): 161-75.
65. Tao Y, Dai P, Liu Y, Marchetto S. et al. Erbin regulates NRG1 signaling and myelination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106(23): 9477-82.

66. Gomez-Sanchez JA, Lopez de Armentia M, Lujan R et al. Sustained axon-glia signaling induces Schwann cell hyperproliferation, Remak bundle myelination, and tumorigenesis. *J. Neurosci.* 2009 ; 9; 29(36): 11304-15.
67. Birchmeier C and Nave KA. Neuregulin-1, a key axonal signal that drives Schwann cell growth and differentiation. *Glia.* 2008; 1;56(14): 1491-7.
68. Brinkmann BG, Agarwal A, Sereda MW et al. Neuregulin-1/ErbB signaling serves distinct functions in myelination of the peripheral and central nervous system. *Neuron.* 2008; 28; 59(4): 581-95.
69. Corfas G, Velardez MO, Ko CP et al. Mechanisms and roles of axon-Schwann cell interactions. *J. Neurosci.* 2004; 20; 24(42): 9250-60.
70. Lemke G. Neuregulin-1 and myelination. *Sci STKE.* 2006; 7.
71. Lemke G. Unwrapping myelination. *Nature.* 1996; 3;383(6599): 395-6.
72. Esper RM. Rapid axoglia signaling mediated by neuregulin and neurotrophic factors. *J. Neurosci.* 2004; 7;24(27):6218-27.
73. Rosemberg S, Benjamin K and Chan J. The quest for remyelination: a new role for neurotrophins and their receptors. *Brain Path.* 2006; 280-294.
74. Chan JR, Watkins TA, Cosgaya JM. Et al. NGF controls axonal receptivity to myelination by Schwann cells or oligodendrocytes. *Neuron.* 2004; 22; 43(2): 183-91.
75. Chan J, Cosgaya et al. Neurotrophins are key mediators of the myelination program in peripheral nervous system. *PNAS.* 2001; 98, 25: 14661:14668.
76. Lu B, Pang PT and Newton HW. The yin and yang of neurotrophin action. *Nature Reviews.* 2005; 6; 603-614.
77. Pruginin-Bluger M, Shelton DL and Kalcheim CDL. A paracrine effect for neuron-derived BDNF in development of dorsal root ganglia: stimulation of Schwann cell myelin protein expression by glial cells. *Mech Dev.* 1997; 61(1-2): 99-111.
78. Schor NF. The p75 neurotrophin receptor in human development and disease. *Prog. Neurobiol.* 2005; 77: 201-14.

79. Jessen KR and Mirsky R. Negative regulation of myelination: relevance for development, injury, and demyelinating disease. *Glia*. 2008; 1; 56(14): 1552-65.
80. Noseworthy JH. Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis. *Nature*. 1999; 24; 399.
81. McFarlin DE and Lachmann PJ. Multiple sclerosis. Hopeful genes and immunology. *Nature*. 1989; 26; 341(6244): 693-4.
82. Mcfarland HF. Multiple sclerosis. *New Engl. J. Med.* 1982; 4; 307(19): 1183-8.
83. Zamvil SS, Steinman L. Autoimmune Demyelinating Disease. *West J. Med.* 1989; 150(3): 335-336.
84. Filippini G, Munari L, Incorvaia B et al. Interferons in relapsing remitting multiple sclerosis: a systematic review. *Lancet*. 2003; 15; 361(9357): 545-52.
85. Pluchino S, Zanotti L, Brini E et al. Regeneration and repair in multiple sclerosis: the role of cell transplantation. *Neurosci. Lett.* 2009; 12; 456(3): 101-6.
86. Giacobini PS, Darlington PJ and Bar Or A. Emerging multiple sclerosis disease-modifying therapies. 2009; 22:226-232
87. Foote AK and Blakemore WF. Inflammation stimulates remyelination in areas of chronic demyelination. *Brain*. 2005; 128(Pt 3): 528-39.
88. Buchet D and Evercooren A BV. In search of human oligodendroglia for myelin repair. *Neurosci. Lett.* 2009. 456: 112-119
89. Yang J, Rostami A and Zhang GX. Cellular remyelinating therapy in multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2009; 15; 276(1-2): 1-5.
90. Piaton G, Williams A, Seilhean D et al. Remyelination in multiple sclerosis. *Prog Brain Res.* 2009; 175: 453-64.
91. Shields SA, Blakemore WF and Franklin RJ. Schwann cell remyelination is restricted to astrocyte-deficient areas after transplantation into demyelinated adult rat brain. *J. Neurosci. Res.* 2000; 1; 60(5): 571-8.

92. Lubetzki C, Williams A and Stankoff B. Promoting repair in multiple sclerosis: problems and prospects. *Curr. Opin. Neurology*. 2005; 18: 237:244.
93. Parman Y. Hereditary neuropathies. *Cur.r Opin. Neurol*. 2007; 20(5): 542-7.
94. Skre H. Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease. *Clin Genet*. 1974; 6(2): 98-118.
95. Leal A, Ichim TE, Marleau AM et al. Immune effects of mesenchymal stem cells: implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *Cell Immunol*. 2008; 253(1-2):11-5
96. Macchi G, 1981. *Malattie del Sistema nervoso*. Libro di testo.
97. Valentijn AJ, Zouq N, Gilmore AP. Anoikis. *Biochemical Society Transaction*. 2004; 32:421-425.
98. Kerr JF. A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. *J. Pathol. Bacteriol*. 1965; 90:419-435.
99. Widmann C, Gibson S and Johnson GL. Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals. *J. Biol. Chem*. 1998; 273: 7141-7147.
100. Wyllie AH, Kerr JF and Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol*. 1980; 68:251-306.
101. Oberhammer F, Wilson JW, Dive C et al. Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J*. 1993; 12: 3679-84.
102. Murgia M, Pizzo P, Sandoná D et al. DNA is not fragmented during apoptosis. *J Biol Chem*. 1992; 267: 10939-10941.
103. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA. et al. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol*. 1992; 148: 2207-2216.

104. Rotonda J, Nicholson DW, Fazil KM et al. The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat. Struct. Biol.* 1996; 3:619-625.
105. Thornberry NA. The caspase family of cysteine proteases. *Br. Med. Bull.* 1997; 53: 478-490.
106. Weissman IL, Anderson DJ and Gage F. Stem and progenitor cells: Origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev. Cell Dev. Biol.* 2001; 17: 387-403.
107. Smith AG. Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2001; 17: 435-462.
108. Stenderup K, Justesen J, Clausen C et al. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone.* 2003; 33: 919-926.
109. Zimmermann S, Voss M, Kaiser S et al. Lack of telomerase activity in human mesenchymal stem cells. *Leukemia.* 2003; 17: 1146-1149.
110. Vats A, Tolley NS, Polak JM et al. Stem cells: sources and applications. *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.* 2002; 27: 227-232.
111. Mummery C. Stem cell research: immortality or a healthy old age? *Europ. J. of Endocrinology.* 2004; 151: U7-U12.
112. Ivanova NB, Dimos JT, Schaniel C et al. A stem cell molecular signature. *Science.* 2002; 298: 601-604.
113. Martin GR. Isolation of pluripotent cell line from early mouse embryos cultered in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1981; 78: 7634-7638.
114. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998; 282: 1145-1147.
115. Smith AG. Culture and differentiation of embryonic stem cells. *J. Tiss. Cult. Methods.* 1991; 13: 89-94.
116. Wiles MV and Johansson BM. Embryonic stem cell development in chemically defined medium. *Exp. Cell Res.* 1999; 247: 241-248.

117. Wiles MV and Keller G. Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem cells in culture. *Development*. 1991; 111: 259-267.
118. Li M, Pevny L, Lovell-Badge R and Smith A. Generation of purified neural precursors from embryonic stem cells by lineage selection. *Curr. Biol*. 1998; 8: 971-974.
119. Dani C, Smith AG, Dessolin S et al. Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro. *J. Cell Sci*. 1997; 110: 1279-1285.
120. Rohwedel J, Maltsev V, Bober E et al. Muscle cell differentiation of embryonic stem cells reflects myogenic determination genes and functional expression of ionic currents. *Dev. Biol*. 1994; 164: 87-101.
121. Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY and Field LJ. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells from stable intracardiac grafts. *J. Clin. Invest*. 1996; 98: 216-224.
122. Kramer J, Hegert C, Guan K et al. Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation in vitro: activation by BMP-2 and BMP-4. *Mech. Dev*. 2000; 92: 193-205.
123. Lumelsky N, Blondel O, Laeng P et al. Differentiation of embryonic stem cells to insulin secreting structures similar to pancreatic islets. *Science*. 2001; 292: 1389-1393.
124. Buttery LD, Bourne S, Xynos JD et al. Differentiation of osteoblasts and in vitro bone formation from embryonic stem cells. *Tissue Eng*. 2001; 7: 89-99.
125. Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D et al. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies comprising the three embryonic germ layers". *Mol. Med*. 2000; 6: 88-95.
126. Prockop D.J. Embryonic stem cells versus adult stem cells: some seemingly simple questions. *Handbook of Stem Cells*. 2004; 2:XXI-XXII.
127. Robey PG. Stem cells near the century mark. *J. Clin. Invest*. 2000; 105: 1489-1491.

128. Watt FM and Hogan BL. Out of Eden: Stem cells and their niches. *Science*. 2000; 287: 1427-1430.
129. Winslow Terese. The adult stem cell. *Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions*. , 2001; Chapter 4:23-42.
130. Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood*. 2003; 102: 3483-3493.
131. Johansson CB, Momma S, Clarke DL. Et al. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell*. 1999; 96: 25-34.
132. Minguell JJ, Erices A and Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp. Biol. Med.* . 2001; 266: 507-520.
133. Siena S, Bregni M, Brando B et al. Circulation of CD34+ hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose Cyclophosphamide treated patients: enhanced by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Blood*. 1989; 74:1905-1914.
134. Miura M, Gronthos S, Zhao M. et al. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc. Natl. Acad Sci. USA*. 2003. 100:5807-5812.
135. Kalyani AJ, Piper D, Mujtaba T et al. Spinal cord neuronal precursors generate multiple neuronal phenotypes in culture. *J. Neurosci*. 1998; 1: 7856-7868.
136. Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997; 275: 964-967.
137. Menasché P, Hagege AA, Scorsin M et al. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet*. 2001; 357: 279-280.
138. Ghazizadeh S and Taichman LB. Multiple classes of stem cells in cutaneous epithelium: a lineage analysis of adult mouse skin. *EMBO J*. 2001; 20:1215-1222.
139. Slack JM. Stem cells in epithelial tissues. *Science*. 2000; 287: 1431-1433.

140. Daniels JT, Dart JK, Tuft SJ et al. Corneal stem cells in review. *Wound Repair Regen.* 2001; 9: 483-494.
141. Holyoake TL, Nicolini FE and Eaves CJ. Functional differences between transplantable human hematopoietic stem cells from fetal liver, cord blood, and adult marrow. *Exp. Hematol.* 1999; 27: 1418-1427.
142. Cornelius JG, Tchernev V, Kao KJ et al. In vitro generation of islets in long-term cultures of pluripotent stem cells from adult mouse pancreas". *Horm. Metab. Res.* 1997; 29: 271-277.
143. Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J et al. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science.* 2000; 288: 1660-1663.
144. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat. Med.* 2000; 6: 1229-1234.
145. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature.* 2001; 410: 701-705.
146. Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J et al. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science.* 2000; 288: 1660-1663.
147. Romero-Ramos M, Vourc'h P, Young HE et al. Neuronal differentiation of stem cells isolated from adult muscle. *J Neurosci Res.* 2002; 69: 894-907.
148. Mezey E, Chandross KJ, Harta G et al. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science.* 2000; 290: 1779-1782.
149. Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA et al. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science.* 1999; 283: 534-537.
150. Blazsek I, Chagraoui J, Péault B. Ontogenic emergence of the hematopoietic stromal units that supports multipotential hematopoietic progenitors in mouse bone marrow. *Blood.* 2000; 96: 3763-3771.

151. Dormady SP, Bashayan O, Dougherty R et al. Immortalized multipotential mesenchymal cells and the hematopoietic microenvironment. *Stem Cell Res.* 2001; 10: 125-40.
152. Caplan A. Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 1991; 9: 641-650.
153. Caplan A. The molecular control of muscle and cartilage development. 39th Annual Symposium of the Society for developmental Biology 37. Cartilage. *Sci Am.* 1984; 251:84-94.
154. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science.* 1965; 150: 839-899.
155. Urist MR. The search for and discovery of bone morphogenic protein (BMP). *Bone graft derivatives and substitutes.* 1994; 315-362.
156. Caplan AI. The mesengenic process. *Clin. Plast. Surg.* 1994; 21:429-435.
157. Kassem M, Mosekilde L, Eriksen EF. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ potentiates fluoride-stimulated collagen type I production in cultures of human bone marrow stromal osteoblast-like cells. *J. Bone Min. Res.* 1993; 8: 1453-1458.
158. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI et al. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp. Cell Res.* 1998; 238: 265-272.
159. Justesen J, Stenderup K, Eriksen EF et al. Maintenance of osteoblastic and adipocytic differentiation potential with age and osteoporosis in human marrow stromal cell cultures. *Calc. Tissue Int.* 2002; 71: 36-44.
160. Mendes SC, Robin C and Dzierzak E. Mesenchymal progenitor cells localize within hematopoietic sites throughout ontogeny. *Development.* 2004; 132: 1127-1136.
161. Jorgensen C, Gordeladze J and Noel D. Tissue engineering through autologous mesenchymal stem cells. *Current Opinion in Biotechnology.* 1994; 15:406-410.

162. Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S et al. Circulating skeletal stem cells". *J. Cell Biol.* 2001; 153: 1133-1140.
163. Rosada C, Justesen J, Melsvik D, et al. The human umbilical cord blood: a potential source of osteoblast progenitor cells. *Calcified Tissue International.* 2003; 72: 135-142.
164. Kassem M, Kristiansen M, Abdallah BM. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.* 2004; 95: 209-214.
165. Luria EA, Panasyuk AF and Friedenstein AY. Fibroblast colony formation from monolayer cultures of blood cells. *Transfusion.* 1971; 11: 345-349.
166. Simmons PJ and Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood.* 1991; 78: 55-62.
167. Bruder SP, Jaiswal N and Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J. Cell. Biochem.* 1997; 64: 278-294.
168. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM et al. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *PNAS.* 2001; 97: 3213-3218.
169. Montzka K, Lassonczyk N, Tschöke B et al. Neural differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: misleading marker gene expression. *BMC Neurosci.* 2009; 3: 10-16.
170. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *International Society for Cellular Therapy. Cytotherapy.* 2005; 7(5): 393-5.
171. Dazzi F, Ramasamy R, Glennie S et al. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Review.* 2006; 20: 161-171.

172. Ikehara S. A new bone marrow transplantation method for stem cell disorders. *Ann N Y Acad Sci.* 2009; 1173: 774-80
173. Battiwalla M and Hematti P. Mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Cytotherapy.* 2009; 11(5): 503-15.
174. Meuleman N, Tondreau T, Ahmad I et al. Infusion of Mesenchymal Stromal Cells can Aid Hematopoietic Recovery Following Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Myeloablative Transplant: A Pilot Study. *Stem Cells Dev.* 2009; 18(9): 1247-52.
175. Valtieri M and Sorrentino A. The mesenchymal stromal cell contribution to homeostasis. *J. Cell Physiol.* 2008; 217(2): 296-300.
176. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood.* 2005; 106: 1755-1761.
177. Krampera M, Pasini A, Pizzolo G et al. Regenerative and immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells. *Curr. Opin. Pharmacology.* 2006; 6: 435-441.
178. Gerdoni E, Gallo B, Casazza S et al. Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann. Neurol.* 2007; 61(3):219-27.
179. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell. Biochem.* 1997; 64: 295-312.
180. Alhadlaq A and Mao JJ. Mesenchymal stem cells: Isolation and Therapeutics. *Stem Cell Dev.* 2004; 13:436-448.
181. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells". *Science.* 1999; 284: 143-147.
182. Muraglia A, Cancedda R and Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to hierarchical model. *J. Cell. Sci.* 2000; 113: 1161-1166.

183. Colter DC, Sekiya I and Prockop DJ. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001; 98: 7841-7845.
184. Grove JE, Bruscia E and Krause DS. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cell.* 2004; 22: 487-500.
185. Sanchez-Ramos JR. Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. *J. Neurosci. Res.* 2002; 69: 880-893.
186. Deng W, Obrocka M, Fischer I and Prockop DJ. In vitro differentiation of human bone marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 282: 148-152.
187. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J. Neurosci. Res.* 2000; 61: 364-370.
188. Safford KM, Hicok KC, Safford SD et al. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2002; 294: 371-379.
189. Woodbury D, Reynolds K and Black IB. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. *J. Neurosci. Res.* 2002; 69: 908-917.
190. Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI and Blau HM. From marrow to brain: Expression of neuronal phenotypes in Adult Mice. *Science.* 2000; 290: 1775-1779.
191. Slavin S, Kurkalli BG and Karussis D. The potential use of adult stem cells for the treatment of multiple sclerosis and other neurodegenerative disorders. *Clinical Neurology and Neurosurgery.* 2008; 110(9):943-6
192. Lu P, Blesch A and Tuszynski MH. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? *J. Neurosci. Res.* 2004; 77:174-191.

193. Bruder SP, Fink DJ and Caplan AI. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J. cell. Biochem.* 1994; 56: 283-294.
194. Kon E, Muraglia A, Corsi A et al. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defect of sheep long bone. *J. Biomed. Mater. Res.* 2000; 49: 328-337.
195. Ohgushi H, Goldberg VM and Caplan AI. Repair of bone defects with marrow cells and porous ceramic. Experiments in rats. *Acta Orthop. Scand.* 1989; 60: 334-339.
196. Lee MS and Makkar RR. Stem-cell transplantation in myocardial infarction: a status report. *Ann. Int. Med.* 2004; 140: 729-737.
197. Assmus B, Schächinger V, Teupe C et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction. *Circulation.* 2002; 106: 3009-3017.
198. Qian H, Yang H, Xu W et al. Bone marrow mesenchymal stem cells ameliorate rat acute renal failure by differentiation into renal tubular epithelial-like cells. *Int J Mol Med.* 2008; 22(3): 325-32.
199. Nagaya N, Fujii T, Iwase T et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am. J Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2004; 287(6): H2670-6
200. Ezquer FE, Ezquer ME, Parrau DB et al. Systemic administration of multipotent mesenchymal stromal cells reverts hyperglycemia and prevents nephropathy in type 1 diabetic mice. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2008; 14(6): 631-40.
201. Kurozumi K, Nakamura K, Tamiya T et al. BDNF gene-modified mesenchymal stem cells promote functional recovery and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Mol. Ther.* 2004; 9: 189-197.

202. Lu L, Zhao C and Liu Y. Therapeutic benefit of TH-engineered mesenchymal stem cells for Parkinson's disease. *Brain research*. 2005; 15: 46-51.
203. Hamada H, Kobune M, Nakamura K et al. Mesenchymal stem cells (MSC) as therapeutic cytoagents for gene therapy. *Cancer Sci*. 2004; 96: 149-156.
204. Chen J, Li Y, Katakowski M et al. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. *Neurosci Res*. 2003; 15; 73(6): 778-86.
205. Zheng W, Honmou O, Harada K et al. Therapeutic benefits of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow after global cerebral ischemia. *Brain Res*. 2009 Nov 11
206. Shichinohe H, Kuroda S, Lee JB et al. In vivo tracking of bone marrow stromal cells transplanted into mice cerebral infarct by fluorescence optical imaging. *Brain Res Brain Res Protoc*. 2004; 13(3):166-75
207. Qu C, Xiong Y, Mahmood A et al. Treatment of traumatic brain injury in mice with bone marrow stromal cell-impregnated collagen scaffolds. *J. Neurosurg*. 2009; 111(4): 658-65.
208. Mahmood A, Goussev A, Lu D et al. Long-lasting benefits after treatment of traumatic brain injury (TBI) in rats with combination therapy of marrow stromal cells (MSC) and simvastatin. *J. Neurotrauma*.. 2008; 25(12): 1441-7.
209. Zhao LR, Duan WM, Reyes M et al. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol*. 2002; 174(1): 11-20.
210. Phinney DG and Isakova I. Plasticity and Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells in the Nervous System. *Current pharmaceutical design*. 2005; 11:1255-1265.
211. Bae JS, Han HS, Youn DH et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote neuronal networks with functional synaptic transmission

- after transplantation into mice with neurodegeneration. *Stem Cells*. 2007; 25(5): 1307-16.
212. Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D et al. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A*. 2002; 99(4): 2199-204.
213. Satake K, Lou J and Lenke LG. Migration of mesenchymal stem cells through cerebrospinal fluid into injured spinal cord tissue. *Spine*. 2004; 15; 29(18): 1971-9.
214. Coronel MF, Musolino PL, Villar MJ. Selective migration and engraftment of bone marrow mesenchymal stem cells in rat lumbar dorsal root ganglia after sciatic nerve constriction. *Neurosci Lett*. 2006; 405(1-2): 5-9.
215. Coronel MF, Musolino PL, Brumovsky PR et al. Bone marrow stromal cells attenuate injury-induced changes in galanin, NPY and NPY Y1-receptor expression after a sciatic nerve constriction. *Neuropeptides*. 2009; 43(2): 125-32.
216. Cuevas P, Carceller F, Dujovny M et al. Peripheral nerve regeneration by bone marrow stromal cells. *Neuroscience Research*. 2002; 24: 634-638.
217. Liu ZJ, Zhuge Y, Velazquez OC. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*. 2009 Apr 15; 106(6):984-91.
218. Pan HC, Yang DY, Chiu YT et al. Enhanced regeneration in injured sciatic nerve by human amniotic mesenchymal stem cell. *J. Clin Neurosci*. 2006; 13(5): 570-5.
219. Bartzokis G, Lu PH and Mintz J. Quantifying age-related myelin breakdown with MRI: novel therapeutic targets for preventing cognitive decline and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2000; 6: S53-9.
220. Kövari E, Gold G, Herrmann FR et al. Cortical microinfarcts and demyelination significantly affect cognition in brain aging. *Stroke*. 2004; 35(2): 410-4.

221. Davis KL, Stewart DG, Friedman JI et al.. White matter changes in schizophrenia: evidence for myelin-related dysfunction. *Arch Gen Psychiatry*. 2003; 60(5): 443-56
222. Keirstead H. Stem cells for the treatment of myelin loss. *Trends Neurosci*. 2005; 28(12): 677-83.
223. Franklin RJ, Gilson JM, Blakemore WF. Local recruitment of remyelinating cells in the repair of demyelination in the central nervous system. *J. Neurosci Res*. 1997; 50(2): 337-44.
224. Dezawa M, Takahashi I, Esaki M et al. Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells. *Eur. J. Neurosci*. 2001; 14(11): 1771-6.
225. Akiyama Y, Radtke C, Honmou O, Kocsis JD. Remyelination of the spinal cord following intravenous delivery of bone marrow cells. *Glia*. 2002; 39(3): 229-36.
226. Tohill M, Mantovani C, Wiberg M. Rat bone marrow mesenchymal stem cells express glial markers and stimulate nerve regeneration. *Neurosci Lett*. 2004 27; 362(3): 200-3.
227. Yang J, Lou Q, Huang R, Shen L, Chen Z. Dorsal root ganglion neurons induce transdifferentiation of mesenchymal stem cells along a Schwann cell lineage. *Neurosci. Lett*. 2008; 445(3): 246-51.
228. Keilhoff G, Stang F, Goihl A et al. Transdifferentiated mesenchymal stem cells as alternative therapy in supporting nerve regeneration and myelination. *Cell Mol Neurobiol*. 2006; 26(7-8): 1235-52.
229. Mimura T, Dezawa M, Kanno H et al. Peripheral nerve regeneration by transplantation of bone marrow stromal cell-derived Schwann cells in adult rats. *J. Neurosurg*. 2004; 101(5): 806-12.
230. Scuteri A, Cassetti A and Tredici G. Adult mesenchymal stem cells rescue dorsal root ganglia neurons from dying. *Brain Res*. 2006; 20; 1116(1): 75-81.

231. Matsumoto C, Miyaura C, Ito A. B-Lymphocytes are elevated in mouse bone marrow by estrogen deficiency, and induce receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) expression in osteoblast via cell adhesion. *J. of Health Science*. 2004; 50: 309-314.
232. Alexanian AR. Neural stem cells induce bone-marrow-derived mesenchymal stem cells to generate neural stem-like cells via juxtacrine and paracrine interaction. *Experimental cell Research*. 2005; 310: 383-391.
233. Takeda Y, Murakami Y, Asou H, Uyemura K. The roles of cell adhesion molecules on the formation of peripheral myelin. *Keio J Med*. 2001; 50(4): 240-8.
234. Foote AK, Blakemore WF. Repopulation of oligodendrocyte progenitor cell-depleted tissue in a model of chronic demyelination. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2005; 31(4): 374-83
235. Yang YJ, Qian HY, Huang J et al. Combined Therapy With Simvastatin and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Increases Benefits in Infarcted Swine Hearts. *J. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2009.
236. Kim H, Lee JH, Suh H. Interaction of mesenchymal stem cells and osteoblasts for in vitro osteogenesis. *Yonsei Med. J.* 2003; 44(2): 187-97.
237. Lozito TP, Kuo CK, Taboas JM, Tuan RS. Human mesenchymal stem cells express vascular cell phenotypes upon interaction with endothelial cell matrix. *J Cell Biochem*. 2009; 107(4): 714-22.
238. Wang Y, Zhang D, Ashraf M et al. Combining neuropeptide Y and mesenchymal stem cells reverses remodeling after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009.
239. Ball SG, Shuttleworth AC, Kielty CM. Direct cell contact influences bone marrow mesenchymal stem cell fate. *Int. J. Biochem Cell Biol*. 2004; 36(4): 714-27.
240. Li QM, Fu YM, Shan ZY et al. MSC guide neurite directional extension and promote oligodendrogenesis in NSCs. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 384(3): 372-7.

241. Chang MG, Tung L, Sekar RB et al. Proarrhythmic potential of mesenchymal stem cell transplantation revealed in an in vitro coculture model *Circulation*. 2006; 113(15): 1832-41.
242. Beeres SL, Atsma DE, van der Laarse A et al. Human adult bone marrow mesenchymal stem cells repair experimental conduction block in rat cardiomyocyte cultures. *J Am Coll Cardiol*. 2005; 46(10): 1943-52.
243. Wuchter P, Boda-Heggemann J, Straub BK et al. Processus and recessus adhaerentes: giant adherens cell junction systems connect and attract human mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res*. 2007; 328(3): 499-514.
244. Grellier M, Bordenave L and Amédée J. Cell-to-cell communication between osteogenic and endothelial lineages: implications for tissue engineering. *Trends Biotechnol*. 2009; 27(10): 562-71.

RINGRAZIAMENTI

Vorrei ringraziare il Prof. Tredici per avermi permesso di trascorrere in questo laboratorio il periodo di Dottorato e tutto il DNTB per il sostegno e l'allegria che hanno reso questi 3 anni così piacevoli ed istruttivi

Inoltre vorrei ringraziare in particolare

Arianna per il sempre presente aiuto e per gli utili consigli durante la stesura della tesi

Silvia per la sua costante carica di energia positiva

Elisabetta perché..è superBetta, e non c'è stato momento in questi 3 anni in cui non mi abbia aiutata!

Valentina, Cecilia, Daniele, Dana ed Elisa per la loro simpatia e per i sempre utili consigli, lavorativi e non!

Mario e Virginia per l'indispensabile supporto in microscopia elettronica e confocale, oltre che per la compagnia!

Gabry, Mila e Roby per gli utili suggerimenti durante questi tre anni

La mia amica Marina, che è sempre presente e mi consiglia, per tutte le cose che in questi dieci anni abbiamo fatto insieme e per tutte quelle che faremo in futuro

Le mie care amiche Natalia (e Beatrice!), Sara e Maddalena

La mia famiglia, che da quando sono nata ha creduto in me e nelle mie capacità, e mi ha sempre motivata

Un ringraziamento tutto speciale al mio amore nonché marito Emilio, perchè è sempre un punto di riferimento ed è anche grazie a lui che ho raggiunto questo traguardo!