



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Neuroscienze

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE MEDICHE, CLINICHE E SPERIMENTALI

INDIRIZZO: NEUROSCIENZE
CICLO XX

**MODELLI MURINI DI DISFUNZIONE MIDOLLARE SPINALE BASATI SULLA
DEGENERAZIONE TRANSGENICA O SULLA RIMOZIONE NEUROTOSSICA DI
POPOLAZIONI MOTONEURONALI. CARATTERIZZAZIONE E APPROCCI
PRELIMINARI DI TERAPIA CELLULARE**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Silvano Todesco

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Corrado Angelini

Supervisore :Ch.mo Prof. Giampiero Leanza

Dottorando : Dott. Alessandro Fiorindi

DATA CONSEGNA TESI
31 gennaio 2008

a Barbara

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	1
1.1. LE PATOLOGIE MIDOLLARI SPINALI	1
1.2. MODELLI ANIMALI DI DISFUNZIONE SPINALE	3
1.2.1. Modelli di contusione	4
1.2.2. Modelli di transezione	5
1.2.3. Modelli basati su espressione di transgeni o su mutazioni spontanee.....	6
1.2.4. Modelli neurotossici	8
1.2.5. Analisi dei modelli	9
1.3. MODELLO TRANSGENICO NEURODEGENERATIVO: TOPO G93A	10
1.4. MODELLO NEUROTOSSICO: LESIONE MEDIANTE VOLKENSINA NEL RATTO.....	15
1.5. POSSIBILI APPROCCI TERAPEUTICI: NEUROPROTEZIONE E RIPRISTINO CELLULARE.....	16
1.6. SCOPI DELLA TESI	23
2. MATERIALI E METODI.....	25
2.1. TOPI G93A: CARATTERIZZAZIONE DEL MODELLO E TRAPIANTO SPINALE	25
2.1.1. Genotipizzazione	26
2.1.2. Caratterizzazione funzionale	26
2.1.3. Caratterizzazione anatomica	28
- <i>Sacrificio e processamento dei tessuti</i>	
- <i>Immunoistochimica</i>	
- <i>Colorazione istochimica dei processi AChE-positivi</i>	
- <i>Stima stereologica del numero delle cellule ChAT-positive e del loro volume</i>	
- <i>Densitometria</i>	
- <i>Analisi statistiche</i>	
2.1.4. Trapianto spinale di precursori immortalizzati	31
2.2. RATTI: INDUZIONE DELLA LESIONE E TRAPIANTO SPINALE	32
2.2.1. Induzione delle lesione spinale	32

2.2.2. Trapianto spinale di neuroblasti e precursori immortalizzati	34
- <i>Neonati</i>	
- <i>Adulti</i>	
2.3. LE CELLULE: NEUROBLASTI E PRECURSORI UMANI IMMORTALIZZATI.....	37
2.3.1. Neuroblasti.....	37
- <i>Immunocitochimica</i>	
2.3.2. Precursori umani immortalizzati.....	38
2.4. SACRIFICIO E PROCESSAMENTO DEI MIDOLLI IMPIANTATI.....	39
3. RISULTATI.....	41
3.1. TOPI G93A.....	41
3.1.1. Genotipizzazione.....	41
3.1.2. Caratterizzazione funzionale del modello.....	42
3.1.3. Caratterizzazione anatomica del modello.....	42
- <i>Stima stereologica del numero delle cellule ChAT-positive e del loro volume</i>	
- <i>Densitometria</i>	
3.1.4. Trapianto spinale.....	45
3.2. RATTI LESIONATI.....	46
3.2.1. Effetto della lesione.....	46
3.2.2. Colture cellulari di neuroblasti.....	47
3.2.3. Trapianto spinale di neuroblasti.....	48
3.2.4. Trapianto spinale di cellule immortalizzate.....	50
4. DISCUSSIONE.....	53
5. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE.....	67
6. BIBLIOGRAFIA.....	69

RIASSUNTO

Il nostro lavoro è consistito nell'identificazione e caratterizzazione di 2 modelli animali di degenerazione motoneuronale spinale sui quali tentare, in una seconda fase, un approccio mediante trapianto cellulare.

Abbiamo innanzitutto caratterizzato approfonditamente dal punto di vista anatomico-funzionale il topo transgenico G93A, modello animale che riproduce una malattia molto simile alla sclerosi laterale amiotrofica umana, evidenziando come numero di motoneuroni, loro volume e densità delle fibre colinergiche correlino tra loro e con lo stato funzionale progressivamente decadente degli animali.

Su questo modello abbiamo poi impiantato dei precursori umani immortalizzati nel midollo spinale, ma in nessun caso abbiamo osservato sopravvivenza delle cellule nel tessuto ospite, probabilmente a causa di un protocollo immunosoppressivo non adatto.

Nel secondo modello, abbiamo noi stessi indotto in ratti sani la lesione mediante Volkensina, una neurotossina che, iniettata per via intramuscolare al primo giorno di vita, dà deplezione selettiva di motoneuroni spinali. Dopo aver valutato la bontà del modello, abbiamo in esso effettuato dei trapianti con neuroblasti di ratto e con precursori umani immortalizzati negli animali neonati ed adulti. In questo caso, abbiamo osservato come le cellule impiantate sopravvivano e riescano ad integrarsi nel tessuto ospite, sebbene nel caso dei precursori immortalizzati non si sia riusciti ad identificare con precisione verso quale linea le cellule si fossero differenziate.

ABSTRACT

In this study we have identified two models of motor neuronal degeneration in which we attempted, in a second phase, a preliminary approach of cell transplantation.

First of all, we characterized from a pathological and functional point of view the G93A mouse, a transgenic animal model that develops a disease very similar to human amyotrophic lateral sclerosis, highlighting how the number and volume of motor neurons and the density of cholinergic processes are correlated one another and with the functional progressively deteriorating conditions of the animals. We transplanted, in the spinal cords of these mice, immortalized human precursors, but in none of the cases implanted cells survived, probably due to an improper immunosopressive protocol.

In the second model, we induced a lesion in healthy rats by the intramuscular injection of Volkensin, a neurotoxin that produces selective motor neuronal degeneration.

After assessing the goodness of the model, we performed transplantation, in newborn and adult animals, with immortalized human precursors and with rat neuroblasts. In both cases, we observed how implanted cells survived and integrated in the host tissue, although in the case of human precursors we could not identify to which cellular line they differentiated.