

1. INTRODUZIONE

1.1. LE PATOLOGIE MIDOLLARI SPINALI

Le patologie a carico del midollo spinale risultano particolarmente drammatiche a causa della scarsa capacità rigenerativa delle cellule che compongono il sistema nervoso centrale (SNC). In seguito ad una lesione, il midollo spinale non è più in grado di ricevere impulsi fruibili dai centri superiori e di trasmetterli in modo utile ai terminali sensitivo-motori che si trovano a valle della zona danneggiata.

Le disfunzioni midollari spinali nella pratica clinica possono essere dovute ad un'ampia serie di cause, che vanno dalla lesione traumatica di regioni definite (contusione o sezione), alla perdita di specifiche popolazioni motoneuronali (malattie degenerative), alle patologie tumorali intraassiali.

Le sole lesioni traumatiche, comprendenti in gran parte incidenti stradali ma anche fatti di violenza urbana o bellica, eventi sportivi ed incidenti sul lavoro, sono responsabili nel mondo di 15-40 nuovi casi/milione/anno (111). Negli Stati Uniti si calcola che i mielolesi post-traumatici siano più di 200.000 (8).

A questa tipologia di lesione responsabile di numeri già ragguardevoli, si devono aggiungere le patologie infettive (causa di deficit spesso però non permanenti) e soprattutto quelle neurodegenerative, alcune delle quali si distinguono per la selettività con cui colpiscono i motoneuroni: alcune quelli superiori, altre gli inferiori, altre ancora entrambi.

L'atrofia muscolare spinale (o SMA, spinal muscular atrophy), malattia genetica a trasmissione autosomica recessiva che riconosce 4 varianti, colpisce i motoneuroni inferiori determinando atrofia dei muscoli prossimali, degli arti e del tronco (85) e porta, nelle forme gravi, a morte gli

affetti in età infantile. Altre malattie del motoneurone più rare sono rappresentate dalla paralisi bulbare progressiva, in cui il processo degenerativo interessa soprattutto i motoneuroni dei nuclei dei nervi cranici bulbari, e la sclerosi laterale primaria, in cui è prevalentemente interessato il motoneurone centrale.

La malattia degenerativa motoneuronale più frequente e maggiormente studiata è però la **sclerosi laterale amiotrofica (SLA)**, descritta già nel 1874 da Charcot. Colpisce il primo e secondo motoneurone e causa quindi degenerazione sia nel midollo spinale che nella corteccia e nel tronco cerebrale, provocando paralisi muscolare progressiva ed irreversibile fino alla morte. Presenta un'incidenza di circa 2 casi/100.000/anno ed esordisce solitamente nella 4^a-5^a decade di vita. I sintomi iniziali variano da un individuo all'altro, ma in genere consistono in alterazioni motorie come fascicolazioni, clonie, iperreflessia, debolezza di uno o più arti o difficoltà nella parola e nella deglutizione (13, 28); le mani sono spesso colpite per prime, rendendo difficili le normali attività quotidiane. Con il passare del tempo, sempre più muscoli vengono interessati, finché la malattia assume una distribuzione simmetrica. Le funzioni intellettive e sensoriali rimangono integre, ed il malato assiste così in piena lucidità alla perdita graduale delle proprie capacità motorie fino alla paralisi completa degli arti con impossibilità, oltre che al movimento degli arti, anche alla deglutizione, fonazione e masticazione. La paralisi dei muscoli respiratori rende infine necessaria la ventilazione assistita ed è spesso la causa della morte nelle persone affette da SLA. La progressione è piuttosto rapida con un'aspettativa media di vita di circa 3 anni, una sopravvivenza del 25 % a 5 anni e minore del 10 % a 10 anni.

Nella grande maggioranza dei casi la SLA è sporadica, ma in circa il 10% dei casi è ereditata come carattere autosomico dominante (tipo I) o recessivo (tipo II), con alta penetranza dopo la 6^a decade. SLA sporadica e familiare sono clinicamente simili.

Le cause della SLA sono ancora sconosciute. E' ormai accertato che la SLA sporadica non è dovuta ad una singola causa; si tratta invece di una malattia multifattoriale, determinata cioè dal concorso di più circostanze, in particolare genetiche ed ambientali. Nonostante i meccanismi molecolari che causano la morte dei motoneuroni nella SLA siano ancora sconosciuti, quello maggiormente chiamato in causa è lo stress ossidativo secondario alla formazioni di radicali liberi dell'ossigeno, dovuto ad una mutazione della superossido dismutasi 1 (SOD1) (vedi parag. 1.3).

1.2. MODELLI ANIMALI DI DISFUNZIONE SPINALE

La possibilità di indurre efficacemente una lesione selettiva dei motoneuroni spinali è di fondamentale importanza negli studi sperimentali.

I modelli animali di disfunzioni spinali sono sostanzialmente suddivisibili in 3 categorie, a seconda del tipo di danno che si va a riprodurre: quelli traumatici, quelli degenerativi transgenici e quelli neurotossici.

Per quanto attiene alle lesioni traumatiche, i modelli sul ratto sono di gran lunga i più sfruttati, risultandone chiari i principali benefici: basso costo, facilità di mantenimento con possibilità di studio su grandi numeri, infezioni post-chirurgiche rare, metodiche di analisi funzionale ben codificate. Modelli traumatici sul topo risultano meno adatti per la difficoltà nelle manovre chirurgiche viste le loro dimensioni; di contro, l'abilità ormai acquisita nel manipolare il loro genoma e nel capire le complesse alterazioni molecolari, li rende particolarmente adatti nei modelli transgenici, che riproducono però solitamente malattie degenerative (124).

In linea generale si può affermare che i modelli traumatici, i più utili per la comprensione della patogenesi e per l'approccio terapeutico al danno midollare acuto conseguente a traumatismo, risultano gravati da minore riproducibilità e superiore sofferenza per gli animali.

I modelli neurotossici e degenerativi, per la loro selettività e riproducibilità, risultano invece più adatti allo studio anatomo-patologico delle lesioni indotte e più affidabili nella fase in cui si pianifichi un approccio terapeutico, sia esso di natura cellulare o basato su neuroprotezione. Vero è però che i modelli neurotossici non replicano alcuna patologia di usuale riscontro clinico, mentre quelli degenerativi riproducono, dal punto di vista sia anatomico che funzionale, patologie neurologiche umane attualmente di grosso interesse (31): malattia di Alzheimer, morbo di Parkinson, corea di Huntington e, per quel che attiene alla degenerazione motoneuronale, appunto la SLA.

1.2.1. Modelli di contusione

Il midollo spinale risulta sperimentalmente piuttosto tollerante a piccole compressioni ed allungamenti, ma stress prolungati possono portare a danni permanenti del tessuto. Il modello di contusione presenta un decorso neuropatologico e caratteristiche istologiche che si avvicinano a quelle presenti nell'uomo in seguito a trauma. Si innescano infatti una serie di processi biochimici che portano ad una necrosi cellulare confinata principalmente all'interno del midollo, la cui entità correla con la perdita della capacità motoria (45,86,117,126). Al contempo, però, esso è soggetto ad una forte variabilità che riguarda sia il tipo di fasci che vengono danneggiati, sia le metodiche adottate nei vari laboratori.

Un'ampia serie di metodi sono stati sviluppati negli anni per lesionare il midollo spinale tramite compressione esterna. Il primo modello animale fu proposto nel 1911 da Allen: si trattava di un peso fatto cadere sul midollo spinale di un cane precedentemente sottoposto a laminectomia (6), ed il suo principio base è tuttora tra i più usati per riprodurre una contusione midollare. Il controllo della gravità del trauma è ottenuto variando l'altezza del peso impattante (standardizzato a 20g). Con questo metodo non è però possibile variare indipendentemente l'entità della compressione e la velocità

iniziale. Esistono alcuni protocolli di contusione, il più usato dei quali è il New York University Impactor (50), che permette di controllare alcuni parametri biomeccanici e valutare l'entità della contusione; nell'Ohio State University Impactor (91), l'impatto viene controllato da un computer. Entrambi questi sistemi, tuttavia, comportano un danno singolo e veloce che non permette di riprodurre il quadro che si ottiene con una compressione prolungata, situazione che viene invece studiata tramite il CLIP (103), il quale, attraverso una lesione che si prolunga per tempi variabili, dimostra la relazione esistente tra danno e durata dell'evento lesivo. Numerosi autori hanno riportato successivamente l'uso di impattatori controllati da computer per produrre traumi midollari simil-contusivi in ratti e topi (82,119,120).

Queste ultime metodiche, seppur ampiamente usate, presentano degli svantaggi: per la loro sofisticatezza, risultano piuttosto dispendiose; danno una completezza di lesione variabile e non permettono, nella valutazione dei trapianti, una buona tracciabilità del tessuto rigenerato rispetto a quello risparmiato dalla lesione (124).

1.2.2. Modelli di transezione

In questo caso il danno midollare è creato attraverso un'incisione diretta sul midollo. Il modello animale di transezione più noto è quello del gruppo di Bunge (23). Il midollo viene esposto a livello di T8 e sezionato; in aggiunta, nel caso in cui serva impiantare dei "devices", il tratto T9-T11 viene asportato. Questo metodo permette, attraverso iniezione di sostanze fluorescenti o l'uso di microscopio ad alta risoluzione, di valutare con certezza l'eventuale rigenerazione assonale. I principali svantaggi del modello sono che esso riproduce un tipo di lesione, la transezione completa, di raro riscontro clinico ma, soprattutto, che la cura post-chirurgica degli animali così menomati è molto difficoltosa.

Un'alternativa è l'emisezione (135), che permette una certa funzionalità residua ed offre un controllo interno nella metà midollo risparmiato, ma, allo stesso tempo, rende piuttosto difficile distinguere i benefici derivanti dalla procedura terapeutica che si vuole testare e quelli dovuti invece alla riorganizzazione del sistema ospite, eventualità che viene invece tralasciata quando si esegue una transezione.

Esiste infine l'assotomia, la quale consiste nel taglio selettivo di una subpopolazione di fasci, importante per verificare la rigenerazione di specifici tratti assonali. Un problema comune a questo tipo di lesione deriva dal fatto che l'operatore deve essere sicuro che i fasci di interesse effettivamente siano stati eliminati, altrimenti i risultati ottenuti potrebbero essere parzialmente falsati da fibre rimaste intatte (69).

1.2.3. Modelli basati su espressione di transgeni o su mutazioni spontanee

L'uso di animali transgenici e di mutanti spontanei si è rivelato, negli ultimi anni, uno strumento utile per studiare le funzioni di geni coinvolti nell'insorgenza di patologie umane come le malattie genetiche degenerative motoneuronali: tra questa, la più indagata è la SLA, e su questa ci soffermeremo in particolare.

Con l'avvento dell'ingegneria genetica i neurobiologi sono riusciti a creare modelli transgenici di topi in grado di simulare sempre più fedelmente le manifestazioni clinico-patologiche che si osservano nei pazienti affetti da SLA. Poiché questa patologia è il risultato di mutazioni che si verificano a livello di diversi geni, esistono oggi numerosi tipi di modelli (64).

Il primo modello, quello da noi approfondito, è quello di topi esprimenti una forma mutata di SOD1 (vedi paragrafo 1.3).

Molto studiati sono i modelli con disorganizzazione dei filamenti intermedi (IFs) neuronali, quali i neurofilamenti (NF-L, NF-H) e la periferina, proteine che spesso si ritrovano nelle inclusioni assonali. Studi effettuati con topi KO

hanno messo in evidenza come, sebbene influisca sullo stato di mielinizzazione degli assoni (67), la mancanza di queste proteine non determini notevoli disturbi dei motoneuroni (42,99). Al contrario, una aumentata espressione dei neurofilamenti determina un loro accumulo a livello dei corpi cellulari con conseguente atrofia dei motoneuroni (32).

Un altro modello è costituito da animali con difetti in proteine implicate nel trasporto assonale mediato dai microtubuli, come le chinesine, le dinesine e Tau. Tra questi vi è il topo pmn (*progressive motor neuropathy*), portatore di una mutazione spontanea, il quale a partire dalla terza settimana di vita sviluppa una progressiva debolezza muscolare che nell'arco di un mese ne determina il decesso per paralisi dei muscoli respiratori. Dal punto di vista istologico si assiste ad una degenerazione assonale distale che in gran parte risparmia gli assoni prossimali, così come i corpi cellulari, caratteristica questa che allontana il modello dalla SLA (109).

Un modello il cui decorso clinico maggiormente ricorda le patologie umane dei motoneuroni è quello del topo wobbler, caratterizzato da un'assonopatia e neuropatia che colpisce esclusivamente le cellule del midollo spinale (84).

Gli ultimi 2 gruppi comprendono infine topi knockout per Als2 (Alsina), una proteina correlata allo sviluppo della forma giovanile di SLA familiare, e topi che presentano una mutazione nell'elemento responsivo all'ipossia.

I modelli di SLA più studiati sono, come detto precedentemente, quelli in cui viene fatta esprimere una forma di SOD mutata; tra questi i più conosciuti sono i ceppi G93A, G37R, G85R, in cui alla copia endogena dell'enzima ne viene aggiunta una ulteriore, mutata, di origine umana (20,53,133). La manifestazione clinica in questi animali risulta molto simile a quella che si osserva negli umani, con inclusioni positive per SOD1, neurofilamenti ed ubiquitina ed un indebolimento muscolare che si aggrava progressivamente fino a determinare una condizione letale. La velocità e la gravità con cui questi sintomi divengono evidenti dipende non tanto dal tipo di mutazione,

ma, piuttosto, dal numero di copie mutate espresse (43). I topi che presentano un alto numero di copie del transgene (high expressor mice) sono caratterizzati da un'insorgenza precoce della malattia e da una rapida degenerazione, mentre i topi con un basso numero di copie (low expressor mice) hanno un'insorgenza ritardata e una progressione lenta. Inoltre, l'insorgenza e la durata della patologia variano a seconda della mutazione che caratterizza il transgene.

1.2.4. Modelli neurotossici

Un modello alternativo di lesione del midollo spinale è quello neurochimico, nel quale vengono utilizzate sostanze tossiche che permettono di eliminare una precisa popolazione di neuroni. Inizialmente furono utilizzate eccitotossine che basavano la propria selettività sul tipo di neurotrasmettitore rilasciato: 6-idrossidopamina e 5,6-idrossitriptofano per citare le più note: risultavano però poco specifiche ed efficienti (132). Si è così passati all'utilizzo di tossine di basso peso molecolare che potessero essere trasportate in modo retrogrado fino al soma ("trasporto suicida") per eliminare selettivamente tutti i neuroni che proiettano in una determinata zona. Una volta endocitate, queste molecole si legano ai ribosomi impedendo la sintesi proteica, evento che determina la morte cellulare (41).

La dinamica d'azione di queste tossine dipende da vari fattori, quali il tempo necessario affinché vengano endocitate, trasportate al soma, e processate. A questo si aggiunge il tempo richiesto dal neurone per interrompere la propria funzione ed andare incontro a dissoluzione anatomica. Tra le tossine più utilizzate vi sono le lectine come ricino, abrina e mordeccina (129,130), impiegate per determinare la localizzazione dei recettori dei neurotrasmettitori, per studiare la plasticità dei sistemi motori e sensori in seguito a perdita neuronale (33,57), e per testare il ruolo dei neuroni sensori primari nel comportamento autotomico (processo per cui alcuni animali riescono a staccare una parte del proprio corpo che è stata lesionata) (17).

Alla famiglia delle lectine appartiene anche la Volkensina, descritta approfonditamente nel paragrafo 1.4.

Un diverso metodo per ottenere l'eliminazione selettiva di una determinata popolazione neuronale prevede l'uso di immunotossine, ovvero tossine legate ad anticorpi capaci di riconoscere specifici antigeni neuronali. A questa categoria appartengono 192 IgG -ricino (39), OX7-saporina (131). In modo molto simile funzionano le tossine legate a neuropeptidi come, ad esempio, la sostanza P (80).

1.2.5. Analisi dei modelli

L'efficacia e la selettività degli interventi sperimentali vengono analizzate attraverso studi anatomici, neurofisiologici e funzionali-comportamentali.

Gli studi anatomici si avvalgono in particolare di tecniche istopatologiche quali le colorazioni istochimiche, l'immunoistochimica e l'utilizzo di traccianti assonali. Questi ultimi sono molecole che vengono captate dagli assoni per essere successivamente trasportate in modo retrogrado fino al soma o, alternativamente, possono essere applicate a livello del corpo cellulare e raggiungere poi i processi assonali seguendo un percorso anterogrado. Permettono così di individuare, rispettivamente, i neuroni che proiettano in un determinato sito, o gli assoni che in seguito a danno sono andati incontro a rigenerazione (5). Tra i marcatori anterogradi più utilizzati vi sono destrano amina biotinilata (BDA), la subunità B della tossina del colera (CTB) e l'enzima perossidasi coniugato all'agglutinina del germe di grano (HRP-WGA). Tra i traccianti retrogradi, invece, i più utilizzati sono il Fluoro-Gold, il Fast-Blue ed il Nuclear Yellow.

Un ruolo importante rivestono anche gli studi neurofisiologici, i quali si basano sui principi dell'elettrofisiologia e possono essere condotti sia *in vivo* che *in vitro*. Tale approccio ha consentito di approfondire notevolmente le conoscenze riguardanti i flussi ionici che sono alla base della trasmissione sinaptica, così come hanno permesso di testare la modalità d'azione e

l'efficacia di farmaci somministrati in seguito a danno del midollo spinale (96).

Poiché il fine ultimo di chi vuole testare possibili strategie terapeutiche in relazione a patologie del sistema nervoso è un recupero funzionale, gli studi comportamentali rivestono un ruolo estremamente importante. A tale scopo sono stati ideati numerosi test: tra questi il "grid walking test", il test del piano inclinato ed il BBB (Basso, Beattie e Bresnahan) (10). Il BBB è un test comportamentale ideato nel 1995, associato ad una scala di 21 punti suddivisa in tre intervalli che permettono di classificare il movimento: senza supporto del peso (intervallo 1-8), con supporto e coordinazione delle zampe anteriori e posteriori (9-13), movimento coordinato, stabile con controllo della coda (14-21). Sebbene questa scala non copra fedelmente tutti gli spettri possibili, risulta comunque uno strumento piuttosto affidabile per determinare il grado di danno tessutale che si verifica in seguito a contusione (82).

Un altro strumento spesso utilizzato per valutare la capacità motoria è il Rotarod, un cilindro ruotante in cui si testa la capacità degli animali di rimanere in equilibrio e muovere le zampe in modo coordinato (vedi parag. 2.1.2.).

1.3. MODELLO TRANSGENICO NEURODEGENERATIVO: IL TOPO G93A

Nel 1991 venne dimostrato che in alcuni casi di SLA familiare la malattia era legata ad un difetto genetico localizzato nel cromosoma 21 (115).

Rosen et al. nel 1993 identificarono per la prima volta lo stretto legame genetico esistente tra la SLA familiare ed un gene, situato appunto nel cromosoma 21q, che codifica per una superossido dismutasi (SOD) citosolica legante Cu/Zn, la quale catalizza la reazione di trasformazione dell'anione

superossido in O₂ ed H₂O₂ (104). Venivano in quell'occasione identificate 11 differenti mutazioni non-senso della SOD1 in 13 famiglie affette da SLA familiare.

La scoperta assunse ancora maggiore importanza quando Gurney et al., nel 1994, produssero un topo transgenico che esprimeva una forma mutata della SOD umana (53). La mutazione in questione è la sostituzione di una glicina in posizione 93 con un'alanina (Gly⁹³→Ala), da cui il nome del topo: **G93A**.

Gli autori notarono che topi esperimenti SOD umana wild-type (NSOD) descritti in precedenza, non manifestavano la malattia. I G93A con SOD umana mutata, invece, sviluppavano una sindrome stereotipata di malattia motoneuronale. A 3-4 mesi di vita cominciavano a presentare segni di debolezza agli arti inferiori: estendevano le zampe meno del normale quando sollevati per la coda, i fianchi apparivano magri e comparivano segni di trascuratezza. Dai 5 mesi la marcia si deteriorava rapidamente e nel giro di 2 settimane una o più zampe risultavano paralizzate e gli animali non erano più in grado di accedere all'acqua ed al cibo. L'analisi anatomicopatologica dei midolli dei topi G93A mostrava una marcata perdita di motoneuroni contenenti acetilcolinesterasi (ChAT); la maggior parte dei rimanenti risultava piena di materiale neurofibrillare, interpretabile come neurofilamenti fosforilati, i cambiamenti più pronunciati essendo a carico del midollo anteriore.

Dal Canto e Gurney (34,35) condussero un approfondito studio anatomicopatologico su midollo spinale, tronco e cervello del topo G93A con l'ausilio anche del microscopio elettronico. Le modificazioni istologiche riscontrate nel midollo spinale furono classificate in 2 patterns principali, early e late. Nell' *early disease pattern* (topi sacrificati da 70° al 163° giorno di vita), i topi più giovani mostravano, nei motoneuroni di maggiori dimensioni delle corna anteriori, vacuoli citoplasmatici strettamente addossati tra loro che occupavano spesso l'intero corpo cellulare, interpretabili come l'iniziale espressione anatomicopatologica della malattia. Questa "degenerazione

vacuolare” non fu osservata nelle corna posteriori. Negli animali più cresciuti del gruppo (sacrificati tra 101 e 163 giorni) i vacuoli risultavano localizzati sia nei corpi cellulari che nel circostante neuropilo, senza la presenza di infiltrati infiammatori e con astrociti ed oligodendrociti generalmente normali. La sostanza bianca risultò solo moderatamente interessata, mentre le corna anteriori erano uniformemente affette con alterazioni moderate: diminuito numero di assoni, con assoni sopravvissuti edematosi; macrofagi con residui di mielina generalmente accompagnavano queste alterazioni.

Il *late disease pattern* (topi sacrificati dopo i 180 giorni di vita) era caratterizzato da riduzione del volume delle corna anteriori con massiccia perdita di motoneuroni, con neuroni superstiti atrofici e dai contorni irregolari. Nella sostanza bianca, gli assoni risultavano edematosi con assoplasma denso e granuloso; l'interessamento delle radici anteriori appariva marcato ed anomalie erano presenti anche nelle radici posteriori. L'esame dell'encefalo e del cervelletto non mostrava alterazioni patologiche, mentre numerosi nuclei del tronco cerebrale evidenziavano le medesime alterazioni vacuolari descritte per le corna anteriori.

Agli studi ultrastrutturali, sia i neuroni che i dendriti mostravano degenerazione vacuolare negli animali con *early disease pattern*. Inclusioni ialine si osservavano nel *late disease pattern*, consistenti in accumuli sferici di filamenti strettamente impacchettati.

L'ipotesi formulata dagli Autori è che i due pattern siano collegati in sequenza temporale. La prima fase del coinvolgimento patologico potrebbe essere caratterizzata principalmente da degenerazione vacuolare dei neuroni, i quali successivamente soccombono dando luogo all'atrofia delle corna anteriori secondaria a deplezione motoneuronale che si osserva nella fase avanzata.

La SLA è stata studiata nell'uomo dal punto di vista anatomo-patologico, ma solo minimi fenomeni di vacuolizzazione sono stati riportati nei

motoneuroni di midollo spinale e tronco cerebrale (13). Ciò, secondo gli Autori (34), potrebbe essere giustificato dal fatto che la maggior parte degli studi sono autoptici, ed i patologi non hanno la possibilità di osservare i tessuti nelle prime fasi della malattia. Essendo lo stadio anatomo-patologico finale di malattia dei G93A il più vicino a quello osservato nei pazienti con SLA, si potrebbe concludere che anche nell'uomo le modificazioni finali potrebbero essere di tipo vacuolare.

Un'altra ipotesi che spieghi l'assenza di vacuoli nei motoneuroni dei pazienti rispetto ai topi G93A, potrebbe essere l'alto numero di copie del transgene espresso dai topi (118).

Dal 1993, anno in cui Rosen per la prima volta associò SOD1 alla forma familiare di SLA (104), sono state individuate più di 120 mutazioni a carico di questo gene, di cui 115 sostituzioni aminoacidiche, 4 delezioni e 3 inserzioni. Salvo qualche rara eccezione (come la D90A), queste mutazioni si trasmettono in modo dominante, determinando numerosi fenotipi che variano per età di insorgenza, progressione, penetranza e manifestazione clinica (49). La SOD1 normalmente svolge una funzione protettiva nelle cellule, eliminando i radicali liberi tossici. In particolare catalizza la detossificazione del radicale anione superossido (O_2^-) convertendolo in perossido di idrogeno (H_2O_2) e ossigeno (O_2). La diminuzione dell'attività di SOD1 provoca un accumulo dell'anione superossido, che non viene dismutato in perossido di idrogeno e ossigeno (11). L'anione superossido inoltre riduce Fe^{3+}/Cu^{2+} in Fe^{2+}/Cu^+ , che sono più reattivi. La conseguenza è che il perossido di idrogeno con Fe^{2+}/Cu^+ genera il radicale tossico idrossile.

L'aumento dell'attività di SOD1 invece provoca un accumulo di perossido di idrogeno. L'abbondante quantità di H_2O_2 impedisce la sua completa eliminazione da parte della glutatione perossidasi e della catalasi ed inoltre si genera il radicale idrossile tramite la reazione Fenton.

In entrambi i casi il risultato è uno stress ossidativo.

Inizialmente si ipotizzò che le mutazioni potessero determinare una perdita della funzione (*“loss of function”*) di SOD1, ma tale ipotesi fu abbandonata quando si osservò che topi privi di questo enzima non svilupparono la malattia (101). Al contrario, i topi transgenici G93A, che esprimono una maggiore quantità di SOD1 umana mutata, seppur in presenza della forma endogena wild type, sviluppano i segni tipici della patologia, appoggiando così l'ipotesi di una *“gain of function”* (53). La tossicità mediata dai radicali liberi è una spiegazione plausibile della morte dei motoneuroni: la SOD mutata può facilitare la via del danno ossidativo.

Nonostante un'ipotesi iniziale suggerisse l'esistenza di una certa correlazione tra l'errata attività chimica dell'atomo di rame e lo sviluppo della patologia, oggi si ritiene tale supposizione non più attendibile. È stato osservato infatti come topi recanti una forma di SOD1 priva di rame, così come topi privi di CCS (*copper chaperone for SOD1*), enzima essenziale per il corretto inserimento degli atomi di rame, pur avendo una ridotta attività dismutasica, non vanno incontro ad un alterato decorso della malattia (123,127).

Le mutazioni puntiformi che si verificano a carico della sequenza aminoacidica determinano, oltre alla citata *“gain of function”*, un cambiamento conformazionale di SOD1 che può portare alla formazione di aggregati, fenomeno che si manifesta soprattutto durante lo stadio sintomatico della malattia. Tali aggregati, costituiti da proteine mutate SOD^{G93A} e da ubiquitina, si accumulano progressivamente all'interno dei corpi di neuroni e della glia e dei loro processi sotto forma di filamenti spessi 13 nm e correlano con la progressione di malattia (118).

Analisi neuropatologiche dimostrano come un ruolo importante è giocato dai neurofilamenti, strutture coinvolte nel trasporto assonale (112). Sono state individuate alcune importanti mutazioni, quali inserzioni e delezioni a

livello di una sequenza altamente ripetuta nel sito di fosforilazione dei neurofilamenti (3,44) che correlano con una loro scorretta localizzazione a livello dei motoneuroni (79). Tali molecole si accumulano ed eventualmente si aggregano originando inclusioni a livello dei corpi e degli assoni motoneuronali (60), in modo molto simile a quanto accade per i corpi di Lewy e le placche che si osservano rispettivamente nel morbo di Parkinson e nella malattia di Alzheimer.

1.4. MODELLO NEUROTOSSICO: LESIONE MEDIANTE VOLKENSINA NEL RATTO

La Volkensina è una proteina altamente neurotossica (LD₅₀ 0.0017 mg/kg) (110) estratta dalle radici dell'*Adenia volkensis*. Si tratta di una glicoproteina della famiglia delle lectine appartenente alle RIP (*Ribosome Inactivating Proteins*) di tipo II, formata da 2 subunità unite da un legame noncovalente disulfidico, in grado di inibire permanentemente la sintesi proteica negli organismi eucarioti attraverso l'inattivazione della subunità 60S dei ribosomi (119).

Iniettata nel muscolo gastrocnemio o nel nervo sciatico del ratto, la tossina viene trasportata per via retrograda ai motoneuroni spinali corrispondenti, dove induce una deplezione che appare pressoché completa a 2 settimane dall'intervento, e si stabilizza a circa l'80% 4-8 settimane dopo la lesione (70). La caratteristica che la rende molto adatta per gli studi sperimentali sulle degenerazioni midollari, è che non dà apparenti effetti citotossici sugli interneuroni spinali adiacenti né sulle cellule di Schwann (87), fornendo quindi, oltre a una lesione selettiva, anche un ambiente circostante favorevole per la sopravvivenza e la differenziazione di eventuali trapianti (88).

1.5. POSSIBILI APPROCCI TERAPEUTICI: NEUROPROTEZIONE E RIPRISTINO CELLULARE

Numerosi studi hanno dimostrato come il midollo spinale sia dotato di una notevole plasticità che permette un rapido ed a volte completo recupero delle funzioni motorie (9,14); alla base di tale miglioramento vi è l'azione neuroprotettiva esercitata da cellule e molecole presenti nel sito di danno. Qualche settimana dopo un evento traumatico, spesso si assiste ad una transiente espressione di proteine associate a rigenerazione (*GAP growth-associated proteins*) e sopravvivenza cellulare (74), fenomeno che correla temporalmente con lo *sprouting* a carico di prolungamenti di cellule che proiettano a lunga distanza (125). Dopo la lesione si assiste, inoltre, ad un processo spontaneo, seppur limitato, di rimielinizzazione ad opera di oligodendrociti e cellule di Schwann; tale fenomeno è strettamente dipendente dalla presenza di astrociti ed in particolare, dalla loro produzione di CNTF (2).

La plasticità di cui è dotato il midollo è un punto di partenza che spinge i ricercatori a tentare nuovi approcci per ottenere un recupero funzionale. In particolare sono sempre più numerosi i tentativi di trapianti di tessuto spinale o di cellule che possano favorire, naturalmente o in seguito a manipolazione genica, la neuroprotezione o la neurorigenerazione.

Pur esulando da questa trattazione la degenerazione spinale post-traumatica, ne tratteremo essendo uno dei campi più attivamente battuti per quel che riguarda gli approcci riparativi.

Nella patologia traumatica, la necessità del "cell replacement", ossia della sostituzione dei neuroni danneggiati con altri efficienti, è meno rilevante rispetto alle patologie degenerative, in quanto solo i motoneuroni al livello danneggiato vengono persi, portando quindi di per se stessi un deficit quantitativamente trascurabile sul totale del danno (47). Più importanti

appaiono dunque i tentativi di rigenerazione della sostanza bianca delle vie lunghe, in particolare attraverso la cosiddetta "terapia ricostruttiva". Uno dei metodi attraverso cui si cerca di riparare il danno, è il trapianto di tessuto spinale o di nervi periferici, i quali, oltre a contenere neuroni vitali, possono fungere da ponte (*bridge*) tra le estremità danneggiate del midollo e, inoltre, possono rappresentare una stazione di sinapsi con i neuroni del midollo ospite. Attraverso questo approccio sembrerebbe possibile ristabilire una connessione tra le fibre che trasportano i segnali sensitivo-motori dai centri superiori e le fibre che, invece, si trovano caudalmente rispetto al sito di danno. Affinché tali *bridge* possano risultare funzionali, devono comprendere il maggior numero possibile di assoni ed essere in grado di creare un pattern preciso e riproducibile di sinapsi al quale il sistema nervoso si possa adattare per trarre vantaggi funzionali (25). È stato dimostrato come il trapianto di questo tipo di tessuto possa fornire un supporto trofico ai neuroni assotomizzati bloccandone così la morte retrograda (18); inoltre, le cellule presenti nel tessuto trapiantato possono rigenerare, attraversare il trapianto e raggiungere i target che si trovano a valle, ponendo così le basi per una connessione funzionale (15,16). Questi tipi di interventi, però, dimostrano un esito funzionale migliore quando effettuati su un animale giovane, differenza probabilmente dovuta alla diversa influenza delle vie coinvolte; infatti, mentre nell'adulto il contributo più rilevante deriva dalla riorganizzazione delle vie segmentali ed intersegmentali, nel neonato, dotato di una migliore riorganizzazione anatomica ed uno sprouting maggiore, si assiste ad una importante riorganizzazione delle vie discendenti (19).

Il capitolo che più da vicino ci interessa è però rappresentato dal trapianto di cellule. Gli approcci mediante terapia cellulare mirano alla riparazione dei circuiti nervosi lesionati, cercando di indurre a seconda dei casi in particolare(47, 81bis):

- la stimolazione della ricrescita assonale
- la rimielinizzazione
- la sostituzione di cellule perdute o ripristino cellulare ("cell replacement")
- il rilascio di fattori trofici o neuroprotezione ("cell protection").

Le cellule utilizzate possono essere di natura autologa oppure, più frequentemente, eterologa; in quest'ultimo caso bisogna ricorrere ad una terapia immunosoppressiva per evitare fenomeni di rigetto e cercare di favorire la sopravvivenza del trapianto.

Ai fini della nostra trattazione, che sono quelli di testare preliminarmente le capacità di sopravvivenza ed eventuale integrazione di un trapianto in modelli di deplezione motoneuronale selettiva, abbiamo usato neuroblasti di ratto e precursori neuronali umani immortalizzati.

In linea teorica, le cellule con le caratteristiche migliori per un "cell replacement" sarebbero le cellule staminali embrionali (ESCs), le quali si possono espandere indefinitamente, possono differenziarsi in numerosi fenotipi e possono essere sottoposte a manipolazione genetica. McDonald et al. nel 1999 (81) hanno dimostrato come cellule staminali embrionali murine trapiantate in ratti adulti possono sopravvivere, migrare e differenziare in astrociti, oligodendrociti e neuroni dopo una lesione traumatica, determinando inoltre un recupero motorio. Tuttavia l'applicazione di queste cellule pone alcuni problemi, come la loro propensione a formare teratomi ed il possibile sviluppo di cellule ectopiche, data la loro scarsa sensibilità ai segnali provenienti dell'ambiente. Il loro utilizzo risulta inoltre limitato da problemi di ordine etico, oggi molto attuali, ed immunologico. Risulta perciò più sicuro ricorrere a cellule progenitrici, ovvero cellule che, pur mantenendo un'ampia capacità differenziativa, hanno intrapreso il cammino verso un determinato destino fenotipico. Questo parziale differenziamento può avvenire spontaneamente in vivo (72) oppure può essere ottenuto in vitro attraverso l'applicazione di protocolli di priming o differenziamento (102). Precursori gliali derivanti da cellule staminali embrionali possono

differenziare in vivo in oligodendrociti ed astrociti e dare luogo ad un processo di rimielinizzazione (95). Oligodendrociti ottenuti da colture di cellule staminali embrionali trattate con acido retinoico sono state trapiantate sia nella colonna dorsale di ratti adulti sottoposti a demielinizzazione, sia in topi mielina-deficienti; tali cellule sono sopravvissute, migrate ed, infine, hanno rimielinizzato gli assoni ospiti (75). In un studio analogo, tuttavia, si sono ottenuti risultati piuttosto contrastanti: infatti, in seguito al trapianto effettuato utilizzando lo stesso tipo di cellule, si è osservata una maggiore debilitazione, un aumento della morbilità ed una crescita simil-tumorale delle cellule trapiantate (62). Sono stati utilizzati anche altri tipi di cellule neurali staminali, come le cellule del bulbo olfattivo, le quali hanno il compito naturale di circondare gli assoni dei nervi olfattivi proteggendoli dai segnali che, a livello del SNC, ne inibiscono la crescita. Queste cellule hanno il grande vantaggio di crescere in un ambiente che appartiene al SNC e quindi, in vista di un eventuale utilizzo a livello spinale, si verrebbero a trovare in un habitat molto simile a quello da cui hanno avuto origine (106). Il bulbo olfattivo, inoltre, rappresenta una fonte aseptica dalla quale si possono ottenere colture cellulari pure (98). Queste cellule, trapiantate nel midollo spinale di ratti adulti sottoposti a transezione completa, hanno dimostrato di poter favorire la ricrescita degli assoni attraverso il sito di danno, consentendo un significativo recupero funzionale.

Sempre su modelli traumatici, sono stati effettuati protocolli di trapianto utilizzando cellule di Schwann (93), macrofagi attivati (100) e, soprattutto, cellule staminali derivanti da midollo spinale, sia fetale che adulto (63,71,138,140). Da questi studi è emerso come la capacità delle cellule di differenziare verso un determinato fenotipo dipenda molto dall'ambiente che le circonda, ovvero, dalla cosiddetta "nicchia", un microambiente specializzato dotato di appropriate caratteristiche anatomiche e funzionali, dove precise interazioni intercellulari, componenti della matrice

extracellulare, così come fattori solubili, proteici o meno, vengono orchestrati al fine di fornire alle cellule staminali le condizioni ideali per proliferare o differenziare (46,108).

Cellule neurali staminali che in vitro possono essere fatte differenziare in numerosi fenotipi, in vivo originano cellule neuronali se trapiantate in siti neurogenici (SVZ ed ippocampo) (114) e in cellule gliali se poste in siti non neurogenici quali il midollo spinale adulto (26). L'incapacità di queste cellule staminali neurali di produrre neuroni a livello del midollo spinale può essere dovuta ad una mancata transizione, sopravvivenza o maturazione dei precursori neurali: precursori neurali e gliali ristretti (NRP e GRP) trapiantati in midollo spinale adulto di ratto hanno dato luogo rispettivamente a neuroni e a cellule gliali capaci di sopravvivere e migrare, indicando quindi che l'ambiente di per sé sarebbe in grado di garantire il differenziamento verso entrambi i fenotipi. Evidentemente, quindi, si ha un blocco a monte, probabilmente a livello della transizione da cellule multipotenti a cellule neurali ristrette (55).

In base a queste osservazioni, quindi, risulta conveniente, nel caso di trapianti a livello del midollo spinale, utilizzare cellule derivate da midollo spinale o cellule predifferenziate in vitro. Recentemente, oltre a cellule neurali, si è provato ad applicare protocolli con cellule appartenenti ad altri tessuti, quali il midollo osseo. Anche in questo caso i risultati ottenuti sono contrastanti: si è osservato infatti che trapiantando cellule di midollo osseo intero, si ottiene un differenziamento in cellule di Schwann ed oligodendrociti (1,107), mentre se il trapianto viene effettuato con cellule SP (Side Population, ricche di cellule staminali ematopoietiche) tale differenziamento non si verifica (52). Un ruolo importante, inoltre, è giocato dal tipo di lesione. Cellule di midollo osseo trapiantate in modelli animali di demielinizzazione e compressione vanno incontro a differenziamento in oligodendrociti e cellule di Schwann (1,107), mentre cellule trapiantate in animali sottoposti ad irradiazione rispondono differenziandosi in microglia

ed astrociti quando l'irradiazione è subletale (29), o non differenziandosi affatto se l'irradiazione è letale per le cellule del midollo osseo (27).

Tutti gli esempi di applicazione delle cellule staminali finora riportati avevano come scopo la sostituzione o la rimielinizzazione delle cellule perse in seguito al danno. Un altro tipo di approccio, cosiddetto di neuroprotezione, può invece basarsi sul trapianto di cellule che, naturalmente o in seguito a modificazione genetica, liberano fattori di crescita, citochine o molecole capaci di inibire sostanze che impediscono la neurogenesi al fine di sostenere la rigenerazione endogena (78,94,137). Uno studio molto importante è stato condotto da Llado e collaboratori, che hanno dimostrato non solo che le cellule staminali neurali cresciute con colture spinali promuovono la crescita dei motoneuroni ma, soprattutto, che si può ottenere lo stesso risultato utilizzando il medium di coltura di queste cellule, osservazione che evidenzia la loro capacità di produrre fattori solubili con proprietà trofiche (76).

I modelli di SLA, risultando la malattia dalla perdita selettiva dei motoneuroni, potrebbero sembrare candidati ideali da sottoporre alla terapia cellulare, tecnica ideale qualora si voglia ripristinare un pool specifico di cellule, e diversi tentativi di "cell replacement" sono infatti stati suggeriti. Affinché questo approccio possa essere attuato è necessario avere a disposizione una popolazione cellulare facile da isolare, espandere e manipolare geneticamente (116). Inoltre, per poter ottenere un risultato funzionale, queste cellule devono sopravvivere in un tessuto che è andato incontro a danno, migrare, differenziare nel corretto fenotipo e, soprattutto, devono interagire funzionalmente con le cellule dell'ospite (97).

Ad oggi, sono stati sperimentati diversi protocolli di terapia cellulare applicata alla SLA. Sulla base di studi che suggeriscono un possibile ruolo della microglia nel danno motoneuronale nel modello G93A (4), Beers et al.

hanno fatto un tentativo di trapianto di microglia wild-type, dimostrando come sia efficace nella protezione dei motoneuroni (12). L'approccio mediante cellule ematopoietiche, in particolare di midollo osseo, adottato da Corti e coll. nel modello G93A, ha evidenziato una ritardata comparsa di malattia ed un'aumentata sopravvivenza degli animali, attribuite più alle modificazioni del microambiente che a neurogenesi (30). Hemendinger et al. hanno invece trapiantato nei midolli spinali di topi G93A le cellule del Sertoli, sfruttando le loro già dimostrate capacità neuroprotettive in patologie neurodegenerative quali le malattie di Parkinson e di Huntington (58). I loro risultati hanno dimostrato un aumentato numero di motoneuroni sopravvissuti in prossimità del sito di iniezione, dato interpretato come beneficio secondario a secrezione di fattori neurotrofici da parte delle cellule trapiantate. Un altro tipo di approccio è stato quello mediante cellule umane derivate da sangue del cordone ombelicale. I risultati ottenuti da Garbuzova-Davis con l'iniezione intravenosa di queste cellule nei topi G93A, hanno evidenziato un'insorgenza di malattia ritardata di 2-3 settimane ed un aumento della sopravvivenza dei topi ammalati (48).

Recentemente infine Xu e coll. hanno impiantato nel midollo lombare di topi G93A, cellule staminali umane (da midolli fetali) dimostrando che esse si differenziano in neuroni capaci di formare contatti sinaptici con le cellule ospiti e di rilasciare fattori neurotrofici; questo si è riflettuto clinicamente con una ritardata comparsa, nonché rallentata progressione di malattia, ed un aumento di sopravvivenza di circa 10 giorni (136).

Uno dei principali problemi nell'applicazione di tecniche di terapia cellulare alla SLA è costituito dalle difficoltà che si incontrano nel guidare il differenziamento delle cellule verso il fenotipo motoneuronale. Grazie alle conoscenze avanzate nel versante della biologia molecolare, sono stati sviluppati alcuni protocolli di predifferenziamento e differenziamento in vitro che hanno consentito la generazione di cellule umane colinergiche

regione specifica (134) permettendo in alcuni casi di ottenere una buona migrazione ed un parziale recupero funzionale (38).

Nell'altro modello soggetto del nostro studio, quello di lesione neurotossica mediante Volkensina, è infine stata dimostrata recentemente la possibilità di ottenere, mediante trapianto di neuroblasti omotipici, sopravvivenza ed integrazione delle cellule trapiantate (pur senza capacità di estensione delle fibre al muscolo leso) ma, ciò che appare più interessante, rilascio di ACh in quantità vicina al normale (evidenziata con metodiche di microdialisi in vivo), seppur senza possibilità di regolazione (51).

1.6. SCOPI DELLA TESI

Nel nostro studio abbiamo individuato e quindi deciso di utilizzare 2 modelli animali di disfunzione di motoneuroni spinali, uno transgenico degenerativo nel topo ed uno neurotossico nel ratto.

Per quanto riguarda il primo, i topi transgenici G93A, portatori di una mutazione che causa una malattia clinicamente ed istologicamente simile alla SLA umana, sono stati da noi sottoposti ad un approfondito studio anatomo-funzionale nei vari stadi della malattia, per verificare se vi fosse correlazione precisa tra il graduale deterioramento motorio e le caratteristiche anatomo-patologiche (in particolare numero e volume dei motoneuroni e delle loro arborizzazioni colinergiche).

Nel secondo modello abbiamo indotto la lesione motoneuronale midollare mediante la neurotossina Volkensina, e ne abbiamo verificato gli effetti sia funzionali sia istologici.

La scelta di questi due modelli si è basata sulla maggiore affidabilità nel produrre lesioni selettive, delimitate e riproducibili rispetto ad altri modelli, in particolare quelli traumatici.

Lo scopo di questa prima fase dello studio è stato quindi di cercare di validare questi modelli sotto il profilo istopatologico e funzionale nel breve medio e lungo termine.

Nella seconda fase si è condotto uno studio preliminare sull'approccio terapeutico con l'impianto intraspinale di precursori neuronali di ratto (neuroblasti) e di precursori neurali umani immortalizzati di origine corticale, al fine di evidenziarne eventuale capacità di sopravvivenza ed integrazione o di osservare fenomeni di neuroplasticità o neuroprotezione.

2. MATERIALI E METODI

In questo studio sono stati utilizzati 40 ratti Wistar e 70 topi femmine appartenenti al ceppo B6SJL; di quest'ultimi 37 sono risultati topi wild type (di seguito indicati come WT), mentre i rimanenti 33 erano topi transgenici (B6SJL-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J, (di seguito indicati come G93A) che esprimono il gene umano SOD1 recante la mutazione G93A (Jackson Laboratories Bar Harbor, ME, USA) e sviluppano entro i 5 mesi una malattia dalle caratteristiche simili alla sclerosi laterale amiotrofica.

Tutti gli animali sono stati forniti dallo Stabulario dell'Università degli Studi di Trieste e mantenuti presso la medesima struttura per tutta la durata degli esperimenti, con un ciclo di luce/buio di 12 ore e cibo ed acqua ad libitum.

Tutti gli esperimenti sugli animali sono stati condotti presso il "Laboratorio B.R.A.I.N. di neurogenesi e riparazione" del Dipartimento di Fisiologia e Patologia dell'Università di Trieste, rispettando le direttive del Consiglio della Comunità Europea, e sono stati approvati dal comitato etico dell'Università di Trieste.

2.1. TOPI G93A: CARATTERIZZAZIONE DEL MODELLO E TRAPIANTO SPINALE

Sono stati utilizzati in totale 70 topi femmine del ceppo B6SJL, impiegati in parte per caratterizzare il modello dal punto di vista funzionale ed anatomico, ed in parte per verificare la capacità di cellule staminali di sopravvivere quando trapiantate nel midollo spinale di un modello murino di SLA.

Gli animali utilizzati per la caratterizzazione del modello sono stati divisi in due gruppi, il primo formato da 5 WT e 7 G93A, ed il secondo da 11 WT e 11 G93A, sacrificati rispettivamente a 2 e 4 mesi dalla nascita.

Prima di procedere con gli esperimenti, i topi sono stati genotipizzati per verificare la presenza del transgene.

2.1.1. Genotipizzazione

Il DNA genomico è stato estratto da un piccolo frammento di coda dell'animale. Ciascun campione è stato mantenuto in agitazione a 55°C O/N in un tampone di digestione a cui è stata aggiunta proteinasi K alla concentrazione finale di 0,6 mg/ml. Si è quindi proceduto alla separazione del DNA dalle proteine mediante il protocollo fenolo-cloroformio; il DNA così isolato è stato lavato con etanolo 70% ed amplificato con la PCR. La reazione di polimerizzazione a catena è stata eseguita aggiungendo 1µl di DNA genomico ad una soluzione mix contenente 1µl RedTaq DNA polimerasi (Sigma, 1U/µl), 0,6µl dNTPs (conc. finale 200 µM) e 1 µl di ciascun primer diluito 1:10 (conc. finale 0,5µM). I campioni sono quindi stati sottoposti ad un programma di PCR che prevedeva un iniziale riscaldamento dei campioni a 95°C, seguito da 30 cicli composti da un minuto a 95°C, un minuto a 65°C (temperatura di annealing) ed un ulteriore minuto a 72°C. Terminati i cicli, i campioni sono stati mantenuti a 72°C per 8 minuti per poter permettere la completa esecuzione delle reazioni di allungamento; una volta raffreddati, i campioni sono stati caricati su un gel di agarosio 1% in tampone Tris-EDTA con l'aggiunta di Etidio bromuro (0,5 µl/ml di gel) per consentirne la visualizzazione. Oltre ai campioni sono stati caricati un marcatore di pesi molecolari, un controllo positivo ed un controllo negativo.

2.1.2. Caratterizzazione funzionale

Poiché la manifestazione clinica della malattia è una progressiva debolezza degli arti, i topi utilizzati per la caratterizzazione funzionale del modello

sono stati sottoposti al Rotarod test, il quale valuta le capacità motorie dell'animale. Si tratta di uno strumento costituito da un cilindro ruotante separato in setti (Fig. 2.1) che permette di testare le capacità sensitivo-motorie di diversi topi simultaneamente verificando la loro abilità nel rimanere in equilibrio e nel muovere in modo coordinato gli arti anteriori e posteriori. Il rotarod permette potenzialmente anche di valutare altri due parametri, quali la forza muscolare e la capacità di apprendimento che permette agli animali di migliorare le prestazioni con il passare del tempo (22). L'eventuale caduta dell'animale dal cilindro fa scattare un meccanismo che ferma il timer e permette di registrare il tempo di permanenza. Prima di iniziare l'esperimento tutti i topi sono stati sottoposti ad una fase di allenamento in cui sono stati mantenuti sul rotarod alla velocità minima fino a quando non hanno raggiunto i 100 secondi. Durante il test agli animali è richiesto di permanere sul cilindro rotante per 300 secondi ad ogni trial; il protocollo utilizzato in questo lavoro prevedeva, per ogni sessione, il monitoraggio degli animali a 3 velocità (5, 10 e 14 giri/minuto), per ciascuna delle quali sono stati effettuati 4 trials (in ordine velocità media, massima e minima), per un totale di 12 trials separati l'un altro da una pausa di 20 minuti al fine di far riposare gli animali.



Fig. 2.1 Rotarod test

Il Rotarod viene utilizzato per valutare la performance motoria degli animali sotto sforzo. I topi, posti su un cilindro rotante, devono rimanere in equilibrio e camminare. L'eventuale caduta fa scattare un meccanismo che permette di registrare il tempo di permanenza sul rullo.



Questo test è stato ripetuto due volte alla settimana dal secondo mese di vita degli animali fino alla manifestazione clinica evidente della patologia, in seguito alla quale gli animali sono stati sacrificati per non arrecare loro ulteriori sofferenze.

2.1.3. Caratterizzazione anatomica

Alla conclusione dei test motori gli animali sono stati sottoposti ad una anestesia terminale con cloralio idrato al 5% (7ml/kg) e sacrificati per estrarre il midollo spinale.

Sacrificio e processamento dei tessuti

I tessuti prelevati sono stati fissati per immersione in una soluzione di paraformaldeide al 4% a 4 °C per 2 ore, sono stati quindi trasferiti in una soluzione di saccarosio al 20% in tampone fosfato 0.1 M (pH 7.4) e mantenuti a 4 °C. Utilizzando un microtomo congelatore sono state ottenute sezioni del piano orizzontale (rostro-caudale) di 30 µm di spessore da regioni comprendenti le corna anteriori dei segmenti lombari del midollo spinale. Le sezioni sono state raccolte in quattro serie consecutive, ognuna delle quali è rappresentativa dell'intera zona di interesse. Le serie sono state conservate in una soluzione di criopreservazione (etilenglicole e glicerolo in tampone fosfato) a -20 °C fino al momento della colorazione.

Immunostochimica

Una prima colorazione effettuata sulle sezioni ottenute al microtomo è stata utilizzata per valutare la degenerazione motoneuronale, utilizzando un anticorpo specifico contro Colina Acetil Transferasi (ChAT).

Le sezioni sono state lavate in tampone potassio fosfato (KPBS) con tre passaggi successivi, e poi inizialmente trattate per 10 minuti con 10% metanolo e 3% perossido di idrogeno in KPBS per inattivare l'attività

perossidasi endogena. Le sezioni sono state quindi incubate per un'ora a temperatura ambiente in una soluzione contenente 5% del siero dell'animale in cui è prodotto l'anticorpo secondario e Triton 0,3% al fine di bloccare possibili siti aspecifici di legame con l'anticorpo e di permeabilizzare il tessuto grazie al detergente. Successivamente è stata effettuata la fase di incubazione con l'anticorpo primario (36-48 ore in agitazione a 4 °C), 2% siero normale e 0,3% Triton. L'immunoreattività è stata evidenziata con un procedura standard di avidina-biotina-perossidasi, incubando le sezioni per un'ora a temperatura ambiente, prima con l'anticorpo secondario biotinilato, poi con il complesso ABC (Vectastain ABC kit). Lo sviluppo è stato effettuato in una soluzione 250 µg/ml di diaminobenzidina (DAB) e perossido di idrogeno 3% per 2-3 minuti. Le sezioni dopo la reazione con DAB sono state posizionate su vetrini portaoggetto; quindi sono state disidratate mediante lavaggi in etanolo, etanolo/xilene e xilene e infine sono state montate con DPX (Fluka) e rivestite con il vetrino coprioggetto.

Colorazione istochimica dei processi AChE-positivi

Per accertare la deplezione motoneuronale e le conseguenze patologiche della malattia, è stata eseguita una colorazione in grado di rilevare specificatamente la presenza di fibre e neuroni colinergici. Questa colorazione ci permette in particolare di evidenziare le fibre Acetilcolinesterasi (AChE) positive, al fine di avere una valutazione dell'entità della riduzione della componente colinergica. Il protocollo impiegato è stato quello di Hedreen et al. (56), che è una modifica del metodo Karnovsky e Roots (65), il quale fornisce una colorazione selettiva nei siti di attività dell'enzima, nonché un'eccellente visualizzazione della reazione che rende possibile l'analisi dell'intensità di colorazione.

Le sezioni sono state lavate dalla soluzione di criopreservazione mediante tre passaggi in tampone sodio acetato a pH 6, poi incubate per 25 minuti in un medium contenente acetiltiocolina ioduro 0.05%, citrato di sodio, solfato

di rame e ferricianuro di potassio in tampone sodio acetato, al quale è stata aggiunta etopropazina per inibire le esterasi aspecifiche del tessuto processato. Successivamente sono stati effettuati dei passaggi di intensificazione della colorazione grazie a brevi incubazioni di un minuto prima in ammonio solfato 4% e poi in nitrato d'argento 0,1%. La colorazione avviene grazie alla catalisi da parte di AChE dell'acetilcolina ioduro, a formare tiocolina; questa riduce il ferrocianuro di potassio che forma un precipitato colorato, che viene sviluppato ed amplificato nei passaggi successivi. Dopo la colorazione, le sezioni sono state montate su vetrini portaoggetto. Successivamente i vetrini contenenti le sezioni sono stati passati in etanolo, etanolo/xilene e xilene ed infine sono stati rivestiti con il vetrino coprioggetto attraverso l'uso di DPX.

Stima stereologica del numero delle cellule ChAT-positive e del loro volume

Le sezioni istologiche sono state analizzate in luce visibile mediante un microscopio Olympus BH-2, implementato con un software di analisi stereologica dell'immagine (Computer Assisted Stereological Toolbox, CAST) e una videocamera digitale. Per l'analisi le cellule ChAT positive sono state quantificate al microscopio mediante il software CAST, contandole su 4 sezioni per ogni animale. Dal numero di cellule contate è stato quindi estrapolato il numero totale di motoneuroni a livello del midollo spinale lombare attraverso una formula matematica.

Sempre con software CAST e mediante una formula matematica, è stato calcolato anche il volume dei motoneuroni nella regione lombare.

Densitometria

Le sezioni colorate per i processi AChE-positivi sono state osservate al microscopio e fotografate tutte nella stessa sessione avendo cura di mantenere il più possibile costanti le condizioni di luce all'interno della stanza. Le fotografie così ottenute sono poi state utilizzate per l'analisi

densitometrica delle arborizzazioni dendritiche, mediante il software Scion Image. Tali software permettono di ottenere una stima numerica di densità ottica nella zona che si desidera analizzare rispetto ad una densità di background. Per ogni sezione si sono effettuate quattro misurazioni a livello della sostanza bianca, da utilizzare come valore di riferimento, e quattro misurazioni all'interno della zona popolata dai motoneuroni. I dati così ottenuti sono stati analizzati calcolando la differenza tra la densità ottica dei processi e quella della sostanza bianca, e successivamente utilizzati per le analisi statistiche.

Analisi statistiche

I dati delle analisi derivanti dai test motori, dalla conta delle cellule, dal calcolo del volume cellulare e dalle densità ottiche sono stati processati statisticamente con test di analisi della varianza (ANOVA), fattoriali (one-way ANOVA) o per misure ripetute (repeated measures ANOVA). Le analisi sono state condotte in Statview 4.0 per Macintosh e le differenze sono state ritenute significative per $p < 0.05$.

2.1.4. Trapianto spinale di precursori immortalizzati

I topi utilizzati per il trapianto con precursori neuronali umani immortalizzati, all'età di 1 mese sono stati anestetizzati con una soluzione di avertina-xilazina (100 μ l/10g) per via intraperitoneale e posizionati sull'apparato stereotassico dotato di adattatore per topi. La metodica prevede che, una volta individuato il tratto T13-L1 (corrispondente alla porzione spinale L1-L2), la colonna vertebrale venga immobilizzata e l'iniezione praticata nello spazio intervertebrale nel lato destro del midollo spinale, a 0,4 mm dall'arteria centrale e 0,8 mm al di sotto della dura. Dopo aver caricato 1 μ l della sospensione cellulare, pari a 10^5 cellule, si inserisce la siringa, si aspetta un minuto e successivamente si inietta metà della

sospensione cellulare alla velocità di 1 μ l/min. Si attende un altro minuto prima di procedere all'iniezione della sospensione rimanente e infine, dopo ulteriori 3 minuti, si estrae lentamente la siringa. Gli animali infine vengono suturati e, per evitare eventuali infezioni batteriche, si somministra un'iniezione di antibiotico per via intraperitoneale (Enrofloxacin 5% alla dose 5-10mg/kg).

Al fine di evitare prevedibili fenomeni di rigetto, sono stati utilizzati 2 diversi protocolli di immunosoppressione. Nel primo di questi la Ciclosporina (15 mg/100g) è stata sciolta nell'acqua da bere e somministrata agli animali a partire da una settimana prima della procedura fino al termine dell'esperimento. Nel secondo protocollo la Ciclosporina è stata somministrata alla medesima concentrazione, ma per via intraperitoneale.

2.2. RATTI: INDUZIONE DELLA LESIONE E TRAPIANTO SPINALE

Sono stati utilizzati complessivamente 40 ratti Wistar, tutti lesionati a 24 ore dalla nascita (PD1) mediante iniezione intramuscolare di Volkensina.

I ratti sono stati suddivisi in 4 gruppi in base al momento in cui è stato effettuato il trapianto, al tipo di cellule impiantate e al tempo di processamento.

2.2.1. Induzione della lesione spinale

Le lesioni sono state effettuate su animali neonati al primo giorno di vita post-natale (PD1). Gli animali, anestetizzati tramite ipotermia profonda, sono stati iniettati con 2 μ l di soluzione di Volkensina (1ng/ μ l) diluita in PBS

sterile (phosphate buffer saline), dose sufficiente per ottenere una degenerazione massiva dei motoneuroni che proiettano al sito di iniezione (51,70). Una volta inserito l'ago all'interno del muscolo gastrocnemio destro (Fig. 2.2), si è atteso un intervallo di un minuto; quindi, dopo aver iniettato la soluzione ad una velocità di circa 1 μ l/min, si sono attesi 2 ulteriori minuti prima di estrarre la siringa, al fine di facilitare la dispersione della soluzione nel tessuto muscolare.



Fig. 2.2 Iniezione intramuscolare di Volkensina nel ratto neonato.

Terminata l'operazione, gli animali sono stati posti sotto una fonte di calore per facilitare l'aumento della temperatura corporea; quindi, una volta risvegliati, sono stati restituiti alla madre.

Per accertare la deplezione motoneuronale operata dalla Volkensina sono state applicate sui midolli le metodiche in grado di rilevare specificatamente la presenza di motoneuroni e fibre colinergiche già descritte nel paragrafo 2.1.3.

2.2.2. Trapianto spinale di neuroblasti e precursori immortalizzati

Gli animali sono stati suddivisi in 2 gruppi, oggetto di un diverso protocollo sperimentale: al primo è stato effettuato un trapianto di neuroblasti estratti da midollo spinale di ratto al dodicesimo giorno di vita embrionale (E 12), mentre al secondo gruppo sono state trapiantati precursori neuronali umani immortalizzati. Ciascun gruppo è stato ulteriormente suddiviso in 2 sottogruppi: gli animali del primo sottogruppo sono stati trapiantati da neonati (PD8), mentre quelli del secondo sono stati trapiantati da adulti (PD60) (Tab. 1). Gli animali trapiantati con le cellule immortalizzate e con i neuroblasti sono stati sacrificati a 1 ed 8 mesi dal trapianto, rispettivamente.

<i>Gruppo</i>	<i>N° animali</i>	<i>Lesione</i>	<i>Trapianto</i>	<i>Sacrificio</i>	<i>Tipo di cellule</i>
1	8	PD1	PD8	8 mesi	Neuroblasti spinali
2	13	PD1	PD8	1 mese	Precursori immortalizzati
3	7	PD1	PD 60	8 mesi	Neuroblasti spinali
4	12	PD1	PD60	1 mese	Precursori immortalizzati

Tab 1: suddivisione in 4 gruppi dei ratti sottoposti a trapianto spinale.

Neonati

Gli animali trapiantati a P8D sono stati nuovamente anestetizzati tramite ipotermia profonda in ghiaccio e posti su un sistema stereotassico dotato di adattatore per neonati, mantenuto costantemente refrigerato per evitare il risveglio degli animali (Fig. 2.3). Incisa la cute ed individuato il tratto T13-L1, corrispondente ai segmenti spinali L3-L5, si sono discostati i muscoli e si è sollevato il processo spinoso per esporre il midollo spinale.

Si sono quindi bucate le meningi a livello dell'arto posteriore destro e si è iniettata la sospensione cellulare, ovvero, 10^4 cellule nel caso dei neuroblasti

(2 μ l) e 10⁵ cellule nel caso delle cellule immortalizzate (1 μ l), utilizzando una siringa Hamilton da 10 μ l.

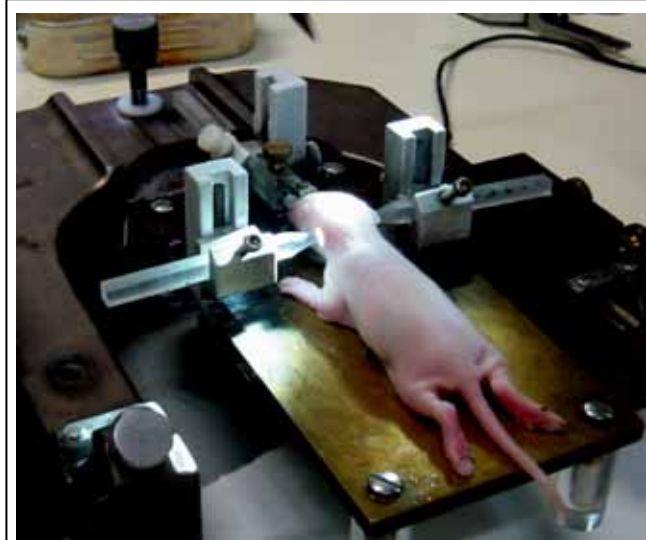
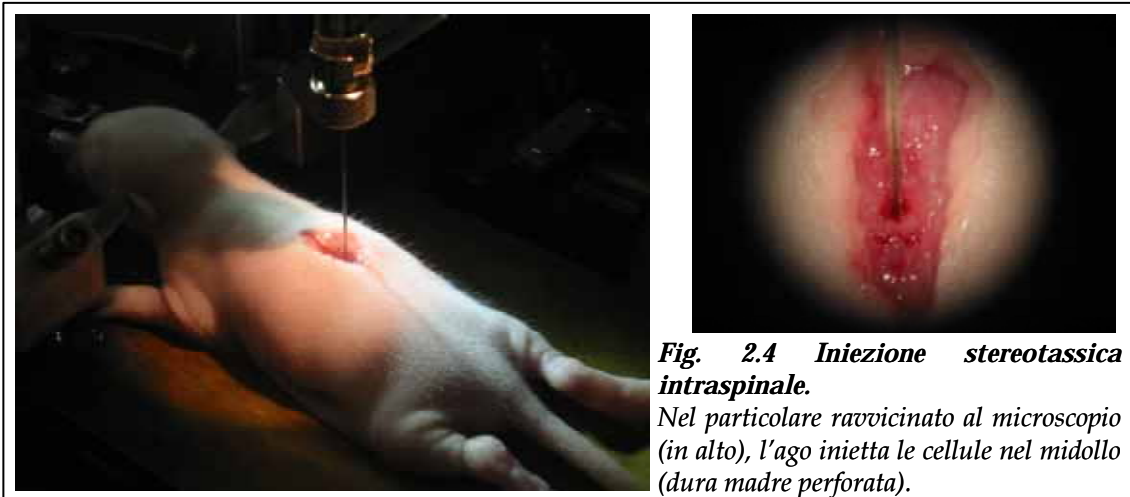


Fig. 2.3 Posizionamento del ratto sul sistema stereotassico

L'iniezione è stata effettuata alle coordinate 0,4 mm laterale e 0,8 mm di profondità, prendendo come riferimenti l'arteria sagittale e la dura madre (Fig. 2.4). Le cellule sono state mantenute in ghiaccio fino al momento dell'utilizzo, e la loro vitalità è stata verificata eseguendo un test con Trypan Blue prima e dopo la sessione di trapianto. Dopo aver inserito la siringa si è aspettato un minuto; quindi, si è iniettata metà della sospensione cellulare alla velocità di 1 μ l/min. Si è aspettato un altro minuto prima di procedere all'iniezione della sospensione rimanente e, infine, dopo aver atteso ulteriori 3 minuti, si è lentamente estratta la siringa.

Gli animali sono stati suturati e posti sotto una fonte di calore fino al risveglio, in seguito al quale sono stati nuovamente restituiti alla madre.



Adulti

Gli animali sono stati anestetizzati mediante la somministrazione intraperitoneale di cloralio idrato 5% (7 ml/kg) e posti sull'apparato stereotassico. Una volta esposta, la colonna vertebrale è stata immobilizzata e posta in tensione; è stato quindi inserito l'ago di una siringa Hamilton nello spazio intervertebrale a livello del midollo lombare destro senza creare danno alla struttura ossea. Si proceduto con l'iniezione delle sospensioni cellulari, ovvero, a seconda del gruppo, 10^5 cellule immortalizzate (in un volume di $1\mu\text{l}$) o 10^4 neuroblasti (in un volume di $2\mu\text{l}$). La somministrazione, effettuata a 0,6mm e 1,6mm rispetto alle coordinate viste sopra, è stata eseguita in modo graduale, rispettando gli intervalli temporali in precedenza descritti. Anche in questo caso gli animali trapiantati sono stati sottoposti ad un regime antibiotico (Enrofloxacin 5% somministrato per via intraperitone-ale) nei primi 3 giorni post-operatori.

Agli animali trapiantati da adulti è stato associato un trattamento con Ciclosporina (15mg/100g) sciolta nell'acqua da bere. Tale protocollo, cominciato 3 giorni prima del trapianto, è stato eseguito per tutta la durata dell'esperimento.

2.3. LE CELLULE: NEUROBLASTI E PRECURSORI UMANI IMMORTALIZZATI

2.3.1. Neuroblasti

In una parte dei ratti sono stati trapiantati neuroblasti omotipici. Dieci animali al dodicesimo giorno di vita embrionale (E12), dopo essere stati estratti dalla madre, hanno subito l'estrazione del midollo spinale. I midolli, separati il più accuratamente possibile dai tessuti circostanti per ottenere una coltura arricchita di cellule motoneuronali, sono stati triturati meccanicamente e posti in una soluzione di tripsina 0,05% e DNAsi 0,05% in DMEM-F12. I frammenti di tessuto sono stati mantenuti in soluzione per 20' a 37°C, per facilitare l'azione degli enzimi digestivi. A questo medium è stato aggiunto Fast Blue (0,001%, Sigma), un colorante che permette di individuare le cellule una volta trapiantate nel tessuto ospite. I tessuti precipitati sono stati lavati 2 volte con DMEM-F12 contenente DNAsi 0,05%. Si è proceduto quindi a centrifugare i campioni 5 minuti a 10.000 rpm e ad eliminare il surnatante; i pellett così ottenuti sono stati risospesi in un volume finale di 50 µl di DMEM-F12 e DNAsi. La sospensione cellulare finale è stata sottoposta a conta e saggio di vitalità effettuato con Trypan blue.

Le cellule sono state poi poste in coltura utilizzando un terreno di base arricchito con glutammina (100X), penstrep (100X), N2 (100X) e FBS 10%, sostituito dopo 5 giorni con FBS 0,5%. Questi neuroblasti, piastrati con una densità di 30.000 cell/2cm² su vetrini appositi, sono stati divisi in due parti e mantenuti in coltura per un tempo relativamente breve, pari a 5 e 12 giorni.

Immunocitochimica

Le cellule, piastrate su vetrini appositi, sono state fissate con PFA 4% in tampone fosfato 0,1M a pH 7,4. Successivamente si è proceduto al bloccaggio

dei legami aspecifici incubando le cellule un'ora a temperatura ambiente con una soluzione contenente BSA 5%, siero 10% (diverso a seconda dell'anticorpo secondario utilizzato) e Triton 0,25%. Le cellule sono quindi state fatte incubare over night a 4°C con una soluzione uguale a quella di bloccaggio in cui è stato aggiunto l'anticorpo primario secondo la diluizione riportata in tabella 2. Dopo aver lavato più volte le cellule, si è proseguito con l'incubazione, 2 ore a temperatura ambiente, con soluzione di bloccaggio in cui sono stati aggiunti gli anticorpi secondari diluiti 1:200.

<i>Antigene</i>	<i>Origine</i>	<i>Diluizione</i>	<i>Casa produttrice</i>	<i>Secondario</i>
GFAP	topo	1:400	Immunological Sciences (MAB16117)	Cavallo
BtubIII	topo	1:350	Sigma (T8660)	Cavallo
ChAT	capra	1:400	Chemicon (AB 144P)	Coniglio

Tab. 2. Anticorpi primari per l'immunocitochimica.

Dopo ulteriori lavaggi le cellule sono state fatte incubare un'ora a temperatura ambiente in una soluzione contenente BSA 5%, siero 10%, DAPI (1:1000) ed il fluorocromo Alexa 488 (Molecular Probes) coniugato con streptavidina. Successivamente le cellule sono state lavate e coperte con vetrini coprioggetto montati con DABCO® (Sigma) e polivinil-alcool (PVA - Sigma).

2.3.2. Precursori umani immortalizzati

Per una parte degli esperimenti sono stati utilizzati precursori neuronali umani immortalizzati, isolati da Cacci e collaboratori (24) e resi disponibili al laboratorio, provenienti da corteccia cerebrale fetale ed ingegnerizzati per l'espressione di GFP. Le cellule sono state coltivate in Dulbecco's Modified

Eagle Medium (DMEM-/F12), al quale sono stati aggiunti Albumax 0,5% e glucosio 0,6%. A questo terreno di base si sono inoltre addizionati N2 supplement 100X, epidermal growth factor umano ricombinante (rhEGF) 20 ng/ml, fibroblast growth factor 2 umano ricombinante (rhFGF2) 20 ng/ml, antibiotico (PenStrep) e glutammina (100X), ottenendo così il terreno di coltura. Le cellule sono state coltivate all'interno di flask la cui superficie è stata sottoposta ad un processo di coating con poli-d-lisina per facilitarne l'adesione; mantenute in condizioni controllate di temperatura ed umidità (37°C e CO₂ 5%), le cellule sono state passate mediamente 2 volte alla settimana. Le cellule a semiconfluenza sono state tripsinizzate, raccolte con medium di base e centrifugate. Il pellet è stato risospeso in 1 ml di terreno di coltura e le cellule sono state sottoposte a conta e test di vitalità con Trypan Blue. Determinato il numero totale, le cellule sono state centrifugate nuovamente e risospese nel volume di terreno di coltura necessario per ottenere una concentrazione pari a 100.000 cellule/ μ l e mantenute in ghiaccio fino al momento dell'utilizzo.

2.4. SACRIFICIO E PROCESSAMENTO DEI MIDOLLI IMPIANTATI

Il sacrificio degli animali è stato eseguito seguendo lo stesso protocollo sia per i topi che per i ratti sottoposti a trapianto.

Una settimana prima del sacrificio gli animali sono stati lievemente anestetizzati con CO₂ e sottoposti ad iniezione di FluoroGold a livello del muscolo soleo destro, al fine di visualizzare i pool motoneuronali corrispondenti ed avere anche una stima della deplezione arrecata dalla volkensina. Inoltre, un'eventuale colocalizzazione di FluoroGold con GFP o con Fast Blue, indicherebbe la capacità delle cellule trapiantate di crescere ed innervare la zona lesionata. Dopo una settimana gli animali sono stati

sottoposti ad anestesia terminale con cloralio idrato 5% utilizzando una dose superiore a 10 ml/Kg. Si è quindi proceduto con l'estrazione dei midolli, successivamente fissati in paraformaldeide al 4% e mantenuti in immersione a 4°C over night. Il giorno successivo la soluzione di fissazione è stata sostituita con saccarosio 20% in tampone fosfato fino al momento del taglio (24-48 ore). Utilizzando un microtomo congelatore sono state realizzate sezioni del piano orizzontale (rostro-caudale) ottenendo per ciascun campione 5 serie di fettine da 30 µm di spessore a partire dalla superficie dorsale fino a quella ventrale. Per ciascun animale le fettine di una serie sono state immediatamente montate su vetrini gelatinizzati e successivamente coperte con i vetrini coprioggetto; queste sezioni sono state osservate al microscopio per verificare l'eventuale presenza delle cellule trapiantate, rese visibili dal Fast Blue (neuroblasti) o dall'espressione di GFP (cellule immortalizzate) Le rimanenti serie sono state poste in soluzione di criopreservazione (tampone fosfato, glicerolo, etilenglicole) e mantenute a -20°C fino al momento del processamento.

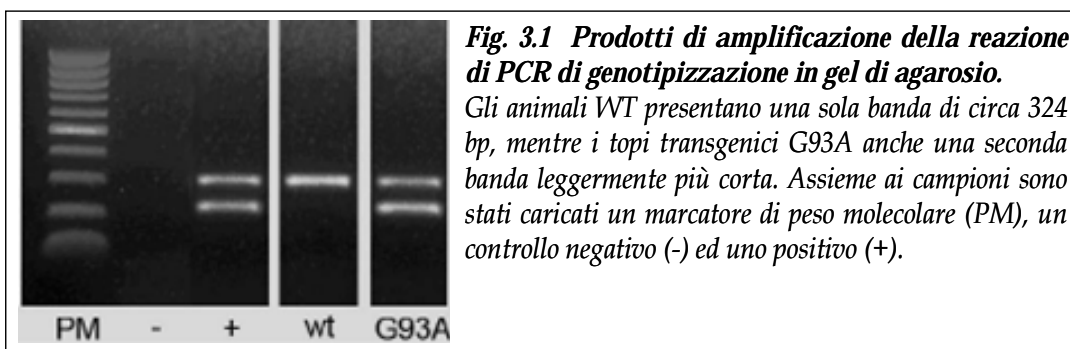
3. RISULTATI

3.1. TOPI G93A

I topi WT, non mostrando differenze comportamentali ed anatomiche tra il gruppo a 2 e quello a 4 mesi, sono stati riuniti in un unico gruppo.

3.1.1. Genotipizzazione

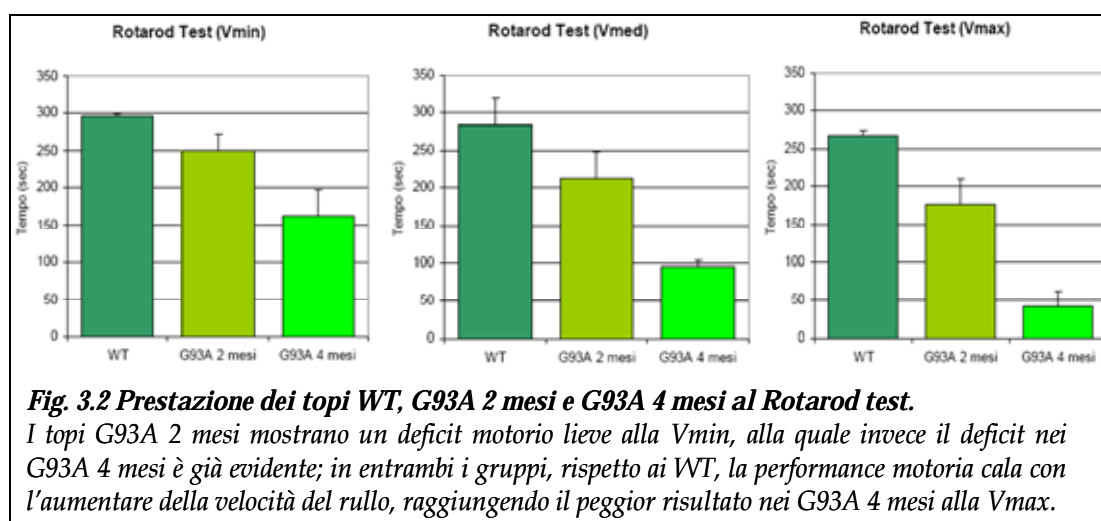
Dalla lettura dei campioni sottoposti all'analisi di genotipizzazione si sono ottenute una sola banda negli animali WT, e due nei topi transgenici, la prima delle quali corrisponde all'amplificazione di un frammento lungo 324 bp del gene wild type per SOD1, mentre la seconda, leggermente più corta, rappresenta un frammento del gene umano corrispondente recante la mutazione G93A (Fig. 3.1).



Da un totale di 70 animali si sono ottenuti 37 WT e 33 G93A: per la caratterizzazione del modello sono stati usati 16 WT e 18 G93A, mentre per i trapianti 21 WT e 15 G93A.

3.1.2. Caratterizzazione funzionale del modello

Il rotarod test è stato effettuato con due gruppi di animali, il primo composto da 5 WT e 7 G93A, il secondo formato da 11 WT e 11 G93A; il comportamento motorio di questi 2 gruppi è stato analizzato rispettivamente fino a 2 e 4 mesi di vita. Dai dati ottenuti (Fig. 3.2) si osserva come, a tutte le velocità testate, gli animali G93A presentino capacità motorie inferiori rispetto ai topi WT. Già alla velocità minima (5 giri/minuto) si osserva nei G93A una riduzione della performance pari al 15% a 2 mesi e al 45% a 4 mesi, percentuali che alla velocità media (10 giri/minuto) aumentano ulteriormente al 25% e al 65% rispettivamente. Questa progressiva perdita funzionale si ritrova, ancora più accentuata, alla velocità massima (14 giri/minuto), dove la prestazione dei topi G93A a 2 mesi si riduce del 30%, mentre a 4 mesi scende addirittura dell'80%.



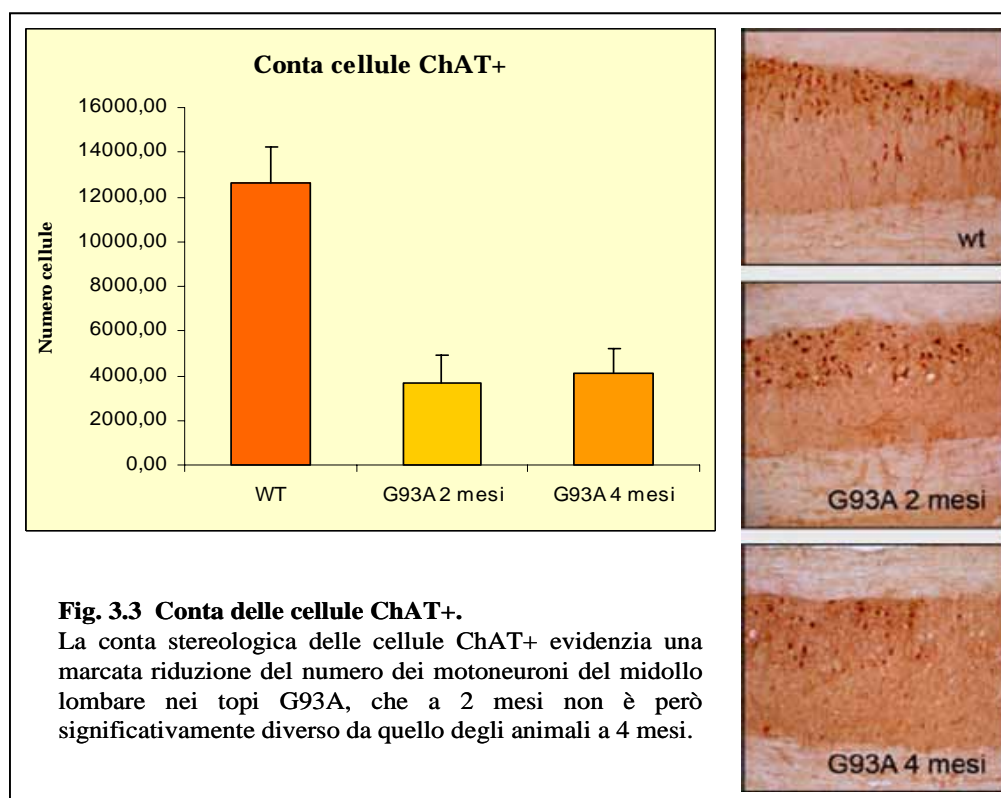
3.1.3. Caratterizzazione anatomica del modello

Le sezioni osservate dopo le procedure di immunistochemica e colorazione istochimica evidenziano come negli animali G93A, rispetto ai WT, si verifichi una netta diminuzione del numero di cellule positive per ChAT, dato confermato dai tessuti sottoposti a colorazione per AChE, nei quali si

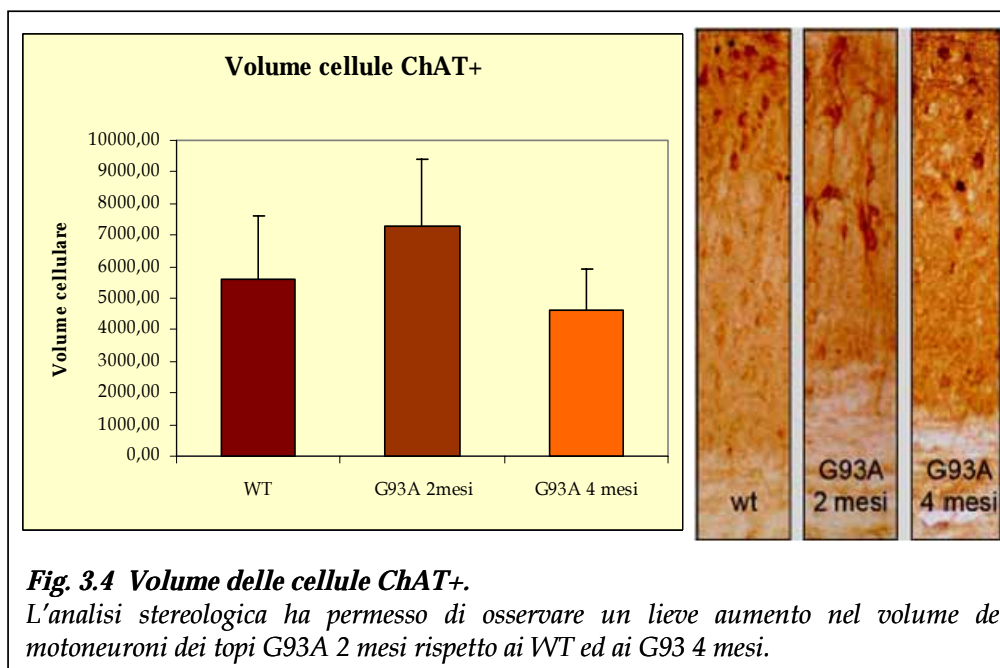
denota un evidente decremento nella densità dei processi colinergici. Analogamente a quanto osservato con il test motorio, le analisi istopatologiche, in particolar modo quelle densitometriche, rivelano un peggioramento progressivo della patologia che, benché presente nei topi G93A già a 2 mesi, diventa più evidente a 4 mesi.

Stima stereologica del numero delle cellule ChAT-positive e del loro volume

Per quanto riguarda il numero di motoneuroni, nei topi G93A è stata osservata una drammatica e significativa riduzione (di circa il 75-80%, $p < 0.01$) che è evidente già a 2 mesi e rimane pressoché invariata anche a 4 mesi (Fig. 3.3)

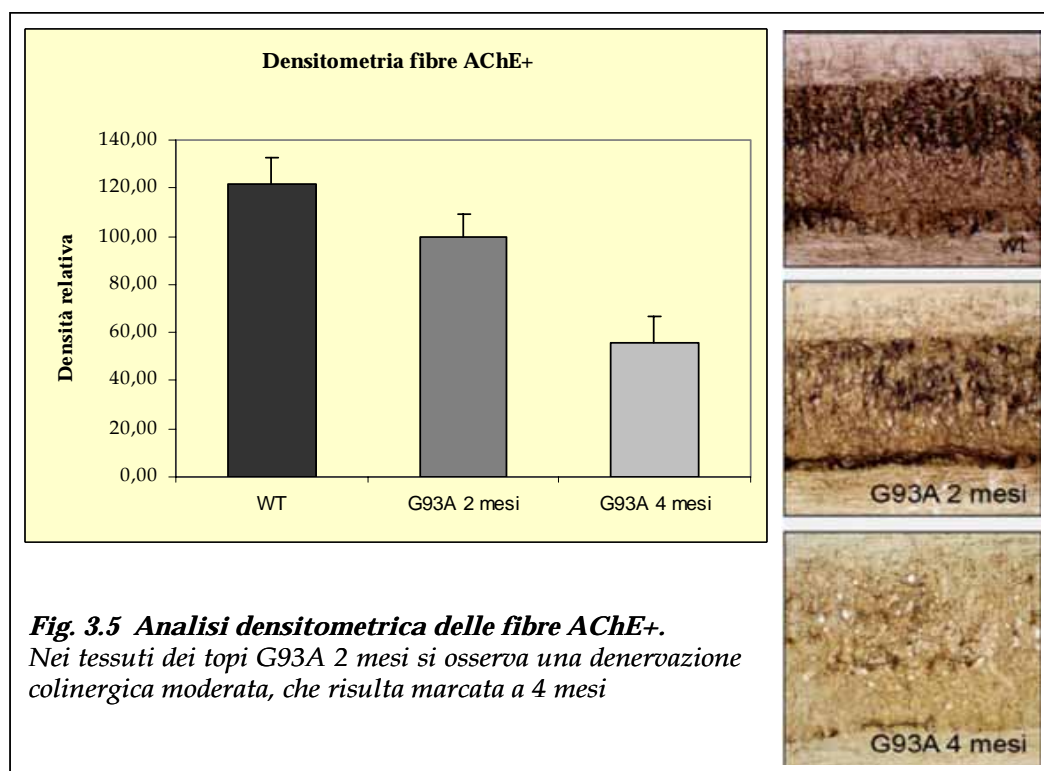


È interessante notare come negli animali G93A a 2 mesi, rispetto agli stessi G93A a 4 mesi e ai WT, vi sia un moderato (~25%) aumento del volume dei motoneuroni presenti a livello lombare, che non risulta però statisticamente significativo ($p > 0.05$) (Fig. 3.4).



Densitometria

Dai risultati ottenuti (Fig. 3.5) si può verificare come la patologia determini una drammatica deplezione di processi colinergici nei topi recanti il transgene G93A, ma che questa si manifesti in maniera differenziata sul piano temporale.



La densità delle fibre colinergiche dei G93A a 4 mesi, infatti, scende di quasi il 60% rispetto a quella dei WT, mentre nei G93A a 2 mesi la densità dei processi colinergici appare ridotta solo del 15% ($p < 0.01$).

3.1.4. Trapianto spinale

Tutti gli animali sono sopravvissuti all'intervento mostrando capacità di ripresa ottime in tempi estremamente ridotti (nell'arco di un'ora dal risveglio erano capaci di arrampicarsi sulla gabbia). In nessuno dei due gruppi, né nei topi WT né nei transgenici G93A, nonostante il diverso protocollo di immunosoppressione, si sono potuti osservare trapianti con esiti favorevoli. Nei tessuti infatti, benché la sede in cui è stato effettuato il trapianto fosse visibile, le cellule non sono sopravvissute. Al contrario, si sono riscontrate zone di necrosi ed aree cicatriziali con cellule non vitali (Fig. 3.6).

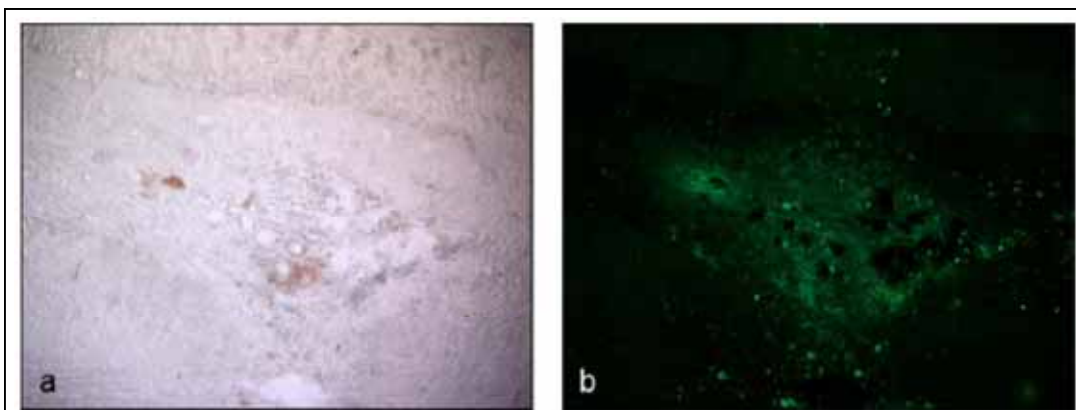
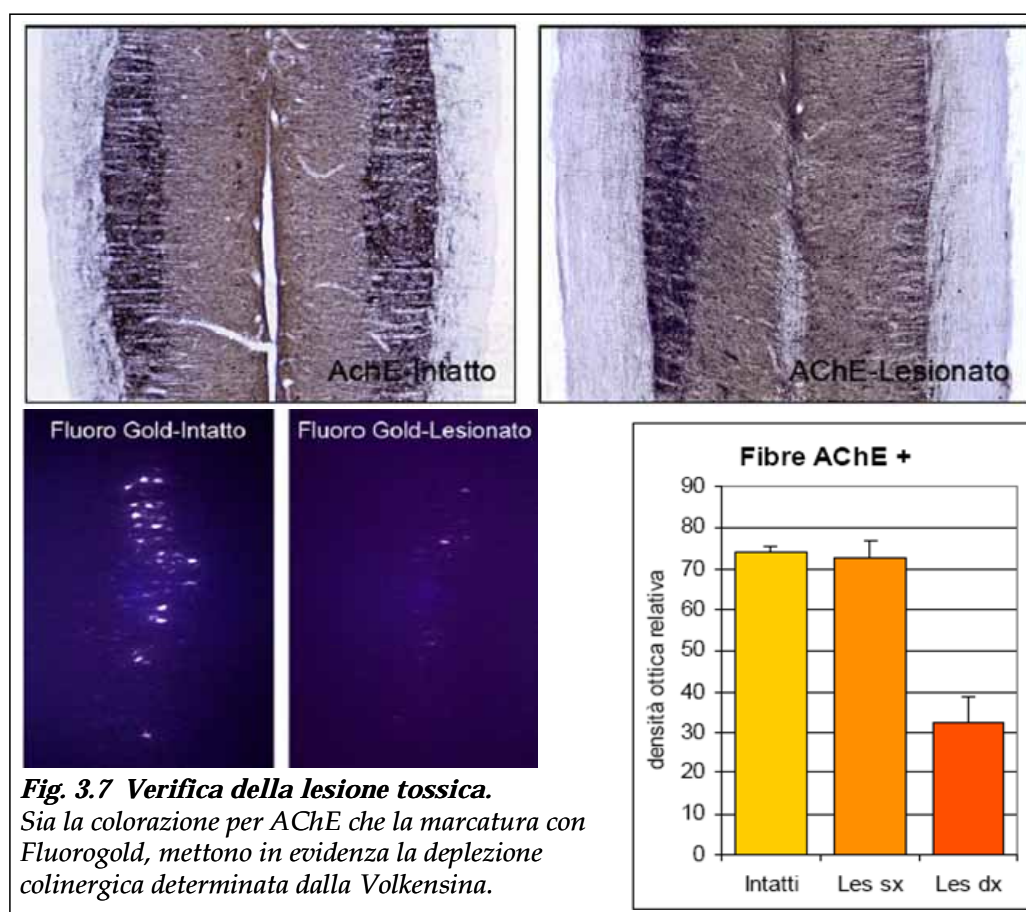


Fig. 3.6 *Visualizzazione del trapianto degenerato.*
Il trapianto non vitale, fotografato in luce visibile (a) ed in fluorescenza (b), mostra zone di necrosi, aree cicatriziali e detriti cellulari.

3.2. RATTI LESIONATI

3.2.1. Effetto della lesione

Tutti gli animali sottoposti alla somministrazione di Volkensina sono sopravvissuti alla lesione. In accordo con quanto osservato in letteratura (51,70) e sulla base di nostri studi pilota, questa dose risulta sufficiente per determinare una deplezione massiccia e selettiva dei neuroni colinergici, resa clinicamente evidente dall'ipotrofia muscolare omolaterale alla lesione con conseguente difficoltà, 3-4 settimane dopo la lesione, sia nella statica che nella marcia. In contrasto, negli studi pilota dosi più alte, superiori a 10 ng, sono risultate fatali per i soggetti trattati.

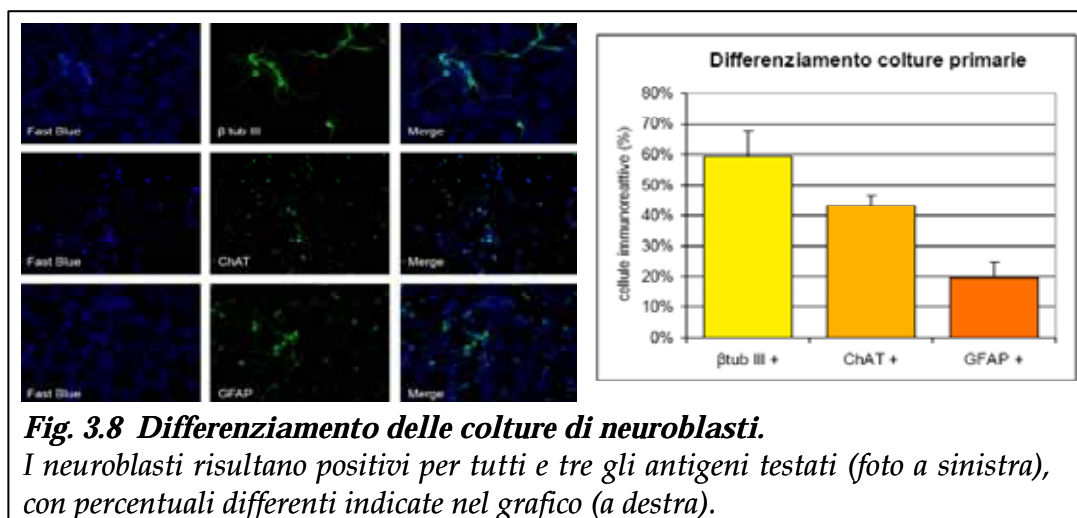


Negli animali lesionati l'innervazione colinergica nel tratto corrispondente a L3-L5 risulta nettamente inferiore se confrontata con quella presente

nell'animale sano; tale dato è confermato dall'analisi densitometrica delle sezioni sulle quali è stata effettuata una colorazione per l'AChE (Fig. 3.7), in cui vi è una perdita di fibre superiore al 65%. Allo stesso modo, mediante i dati ottenuti a seguito della somministrazione di Fluoro Gold, si può constatare come il numero di motoneuroni che proiettano al sito in cui è stata effettuata la lesione risulti nettamente inferiore nell'animale lesionato rispetto a quello di controllo.

3.2.2. Colture cellulari di neuroblasti

I neuroblasti ottenuti da embrioni di ratto (E12) sono stati cresciuti come colture primarie e fissati a 5 e 12 giorni dal momento dell'isolamento. Per ciascuna di queste due condizioni sono state eseguite colorazioni immunocitochimiche dirette contro gli antigeni GFAP, β tubIII e ChAT. Fra le cellule cresciute nei due diversi intervalli temporali non si sono osservate differenze. Le cellule risultano positive per tutti e 3 i marker testati e, più precisamente, la positività risulta maggiore per ChAT (43%) e β tubIII (60%), marcatori neuronali, mentre GFAP, marcatore gliale, appare meno espresso (20%) (Fig. 3.8).



3.2.3. Trapianto spinale di neuroblasti

I campioni osservati con il microscopio a fluorescenza rivelano la presenza di cellule colorate con Fast Blue; tali cellule risultano morfologicamente diverse e possono essere classificate in 3 popolazioni in base alle dimensioni del corpo cellulare e al numero di prolungamenti emessi. Si riconoscono così cellule gliali, piccole e rotondeggianti, alcune cellule di dimensioni medie distribuite in tutta la zona del trapianto e, inoltre, cellule multipolari dai corpi cellulari piuttosto voluminosi, identificabili come motoneuroni (Fig. 3.9). Poiché nessuna di queste cellule colocalizza con il Fluoro Gold, si può affermare che le cellule trapiantate, benché abbiano assunto un fenotipo motoneuronale, non hanno emesso prolungamenti sufficientemente lunghi da raggiungere il sito in cui è stata effettuata la lesione.

L'analisi dei campioni colorati con AChE disegna un quadro dell'integrazione anatomica che si verifica tra le cellule trapiantate ed il tessuto ospite. Il trapianto risulta generalmente ben inserito e confinato nella sostanza grigia del midollo spinale, sebbene a volte si possa notare la formazione di un rigonfiamento che espande i confini della stessa.

Nei tessuti osservati, solo una piccola parte presenta un aspetto gliale, mentre gran parte del trapianto è costituito da cellule neuronali; più precisamente, si può fare un'ulteriore distinzione tra cellule colinergiche di piccole dimensioni che permeano l'intero trapianto, e cellule più grandi e scure che, invece, sono confinate ai bordi del trapianto stesso.

Queste grosse cellule, che ricordano a tutti gli effetti il fenotipo motoneuronale, sono inoltre circondate da una rete di fibre colinergiche provenienti dai motoneuroni del tessuto ospite; tali fibre, inoltre, terminano sul soma delle cellule trapiantate originando numerosi bottoni sinaptici.

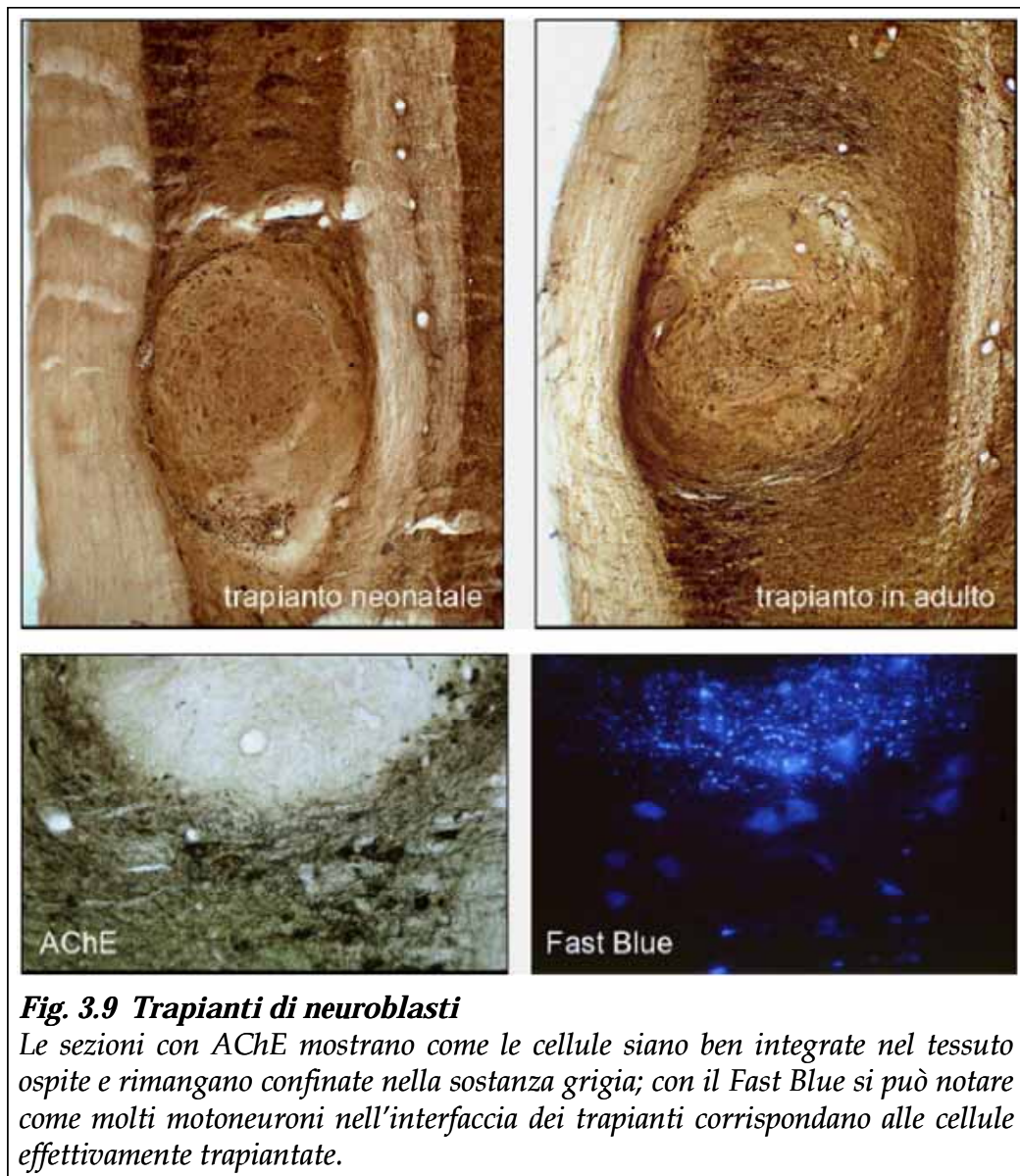
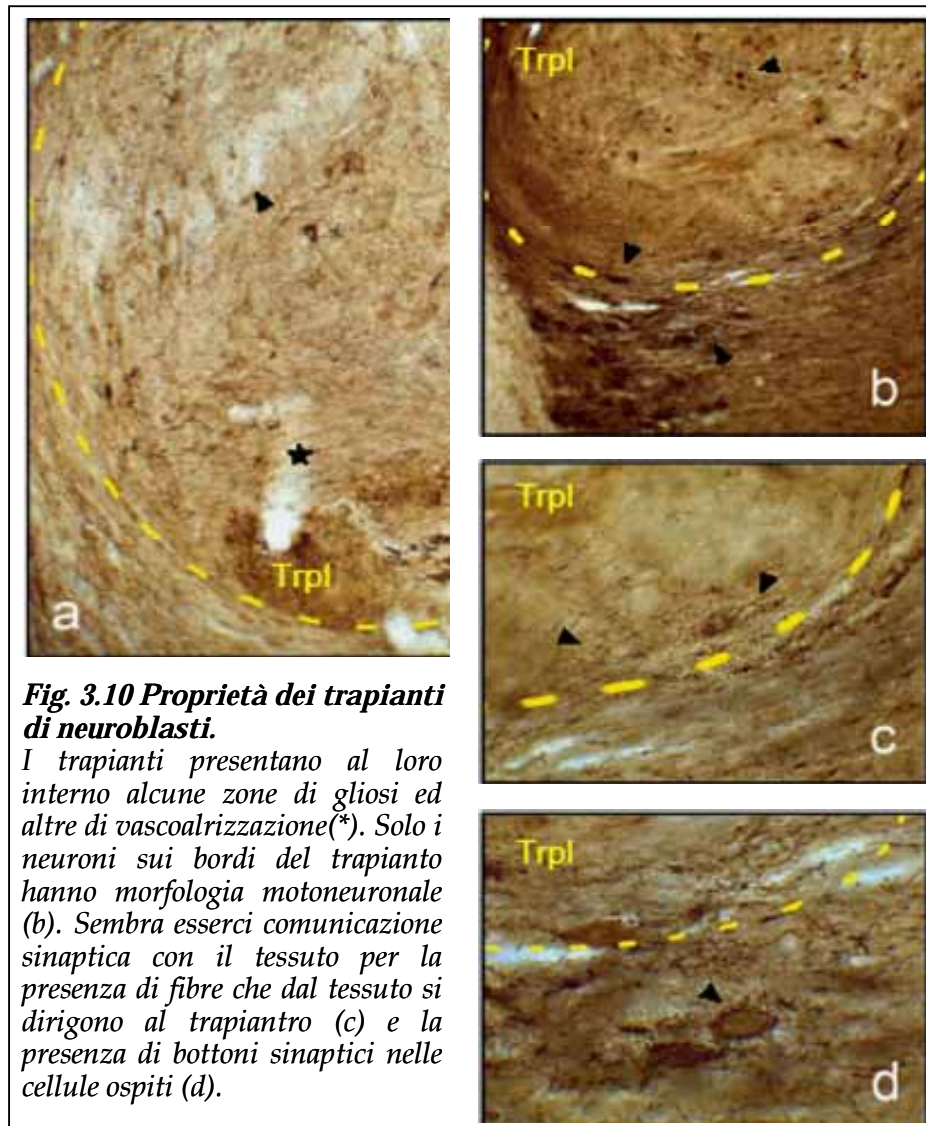


Fig. 3.9 *Trapianti di neuroblasti*

Le sezioni con AChE mostrano come le cellule siano ben integrate nel tessuto ospite e rimangano confinate nella sostanza grigia; con il Fast Blue si può notare come molti motoneuroni nell'interfaccia dei trapianti corrispondano alle cellule effettivamente trapiantate.

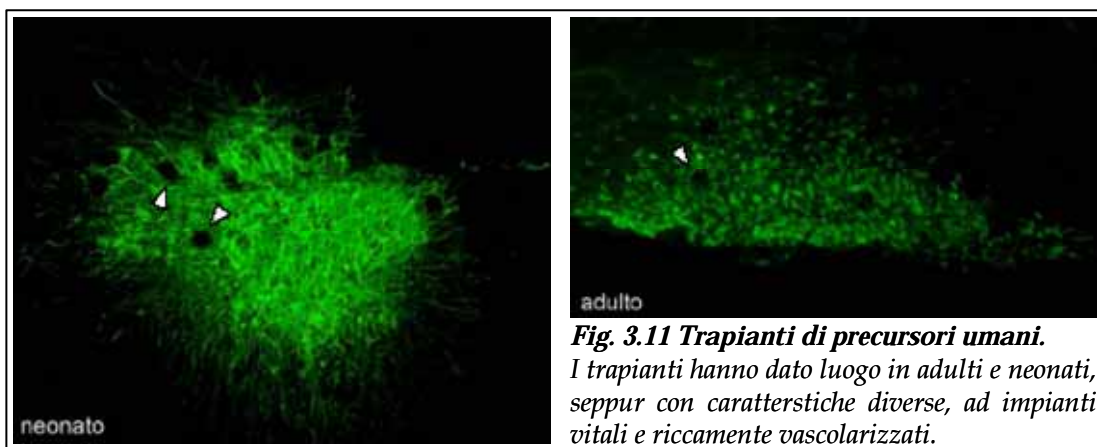
All'interno del trapianto si rileva inoltre la presenza di numerosi vasi sanguigni, i quali permettono alle cellule trapiantate di ricevere ossigeno e sopravvivere (Fig. 3.10).



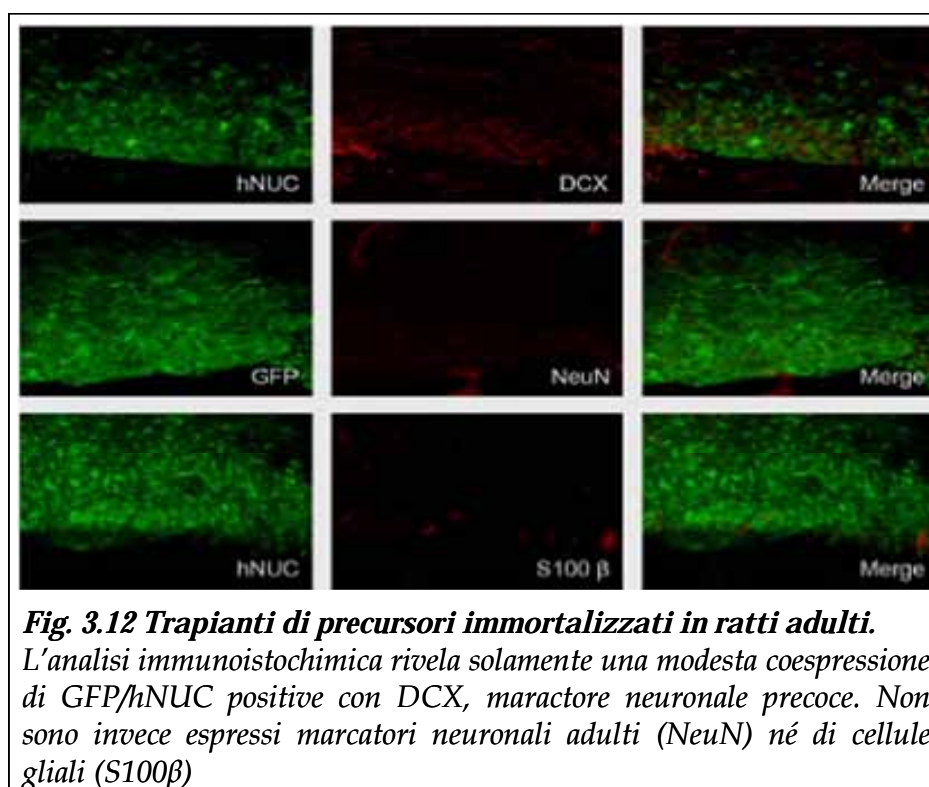
3.2.4. Trapianto spinale di cellule immortalizzate

Gli animali trapiantati con le cellule neuronali umane immortalizzate, sono stati sacrificati ad un mese dall'intervento. Per testare il grado di differenziamento delle cellule e determinare verso quale fenotipo neurale fossero indirizzate, sono state eseguite alcune colorazioni immunoistochimiche contro i marcatori NeuN, DCX e S100 β . Inoltre, benché le cellule trapiantate fossero ingegnerizzate per l'espressione di GFP, è stato

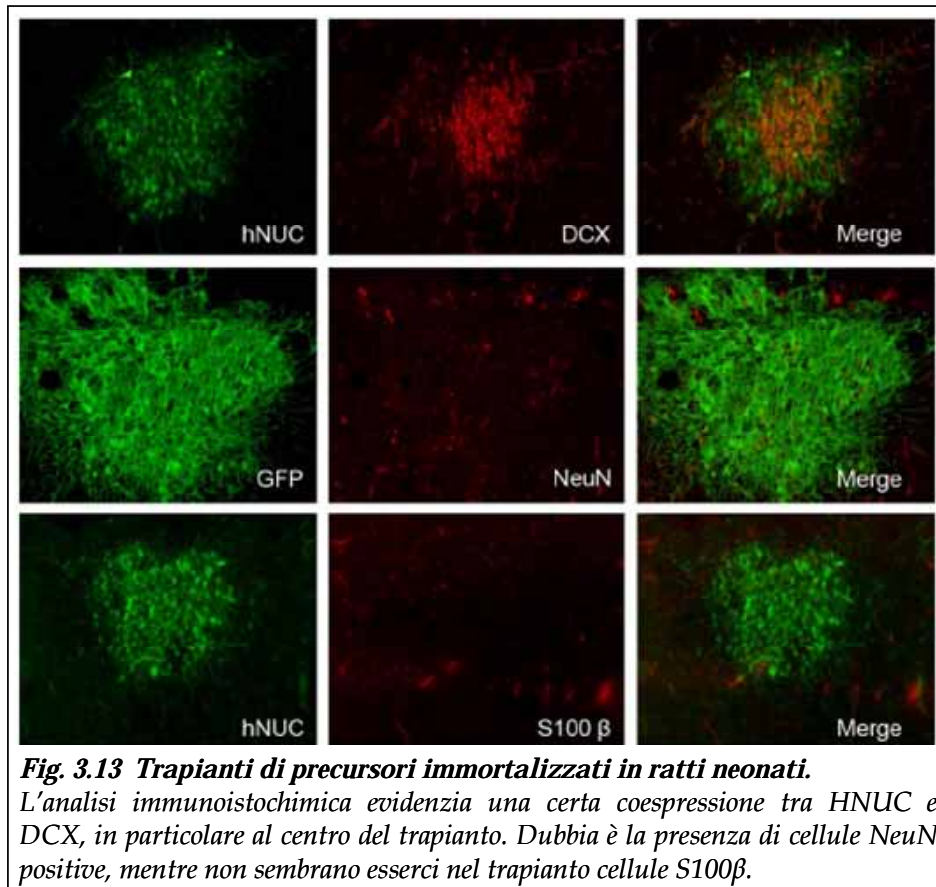
necessario ricorrere ad una colorazione immunohistochimica per evidenziare la presenza del marcatore fluorescente o di hNUC.



I risultati ottenuti dimostrano come le cellule sopravvivano e, soprattutto nei neonati, tendano ad addensarsi in prossimità del sito in cui è stato effettuato l'intervento (Fig. 3.11).



Le dimensioni cellulari, così come l'aspetto morfologico, appaiono generalmente omogenee, sebbene in alcuni casi si possano notare cellule più voluminose ed apparentemente differenziate.



Le analisi immunocistochimiche non permettono di avere un chiaro quadro della situazione; sia negli adulti che nei neonati, infatti, le cellule sembrano non esprimere S100β, marcatore degli astrociti (Fig. 3.12 e 3.13). Allo stesso modo, in particolare negli adulti, non si nota la presenza di cellule positive per NeuN, marcatore neurale; per quanto riguarda DCX, marcatore neurale più precoce rispetto al precedente, si può osservare una modesta positività nei neonati, in particolare a livello delle cellule che si trovano nel centro del trapianto, mentre negli adulti sembra non esserci positività per questo marcatore.

4. DISCUSSIONE

Il problema di ottenere validi modelli animali di patologie umane, siano esse di natura traumatica o degenerativa è preminente nel campo della ricerca medica. Lo scopo finale, che è in tutti i casi quello di testare dei protocolli terapeutici, richiede naturalmente caratterizzazioni approfondite di modelli il più possibile specifici, vicini al tipo di patologia umana che si desidera ricreare, nonché riproducibili.

Ciò è tanto più importante, quanto minori sono le capacità del tessuto colpito di provvedere autonomamente ad un certo grado di riparazione.

Le disfunzioni midollari spinali, indipendentemente dalla loro eziologia, rappresentano spesso una condizione grave ed irreversibile di invalidità permanente proprio a causa della limitata capacità rigenerativa di cui dispone il SNC. Le ricerche condotte negli anni hanno portato allo sviluppo di terapie chirurgiche, farmacologiche, neuroprotettive e di sostituzione cellulare, mirate a rallentare i fenomeni degenerativi e permettere il ripristino delle capacità funzionali.

La scelta dei modelli studiati in questa tesi si è basata su diversi fattori. Innanzitutto lo scopo finale dello studio dei modelli era quello di tentare successivamente un approccio terapeutico di sostituzione cellulare, come sperimentato in modo assolutamente preliminare nella seconda fase dello studio che descrivo. Ci servivano quindi dei modelli che permettessero deplezione motoneuronale massiccia ma allo stesso tempo specifica, il più possibile conservativa dell'ambiente circostante e dei tipi cellulari di sostegno. Ciò non è ottenibile con i modelli traumatici, siano essi di tipo contusivo o di transezione (completa o parziale), e non del tutto nemmeno con altre metodiche come il danno del nervo sciatico o l'iniezione di tossine aspecifiche. Abbiamo preferito non adottare un modello traumatico anche

perchè non è trascurabile la sofferenza indotta agli animali e la difficoltà della loro gestione dopo l'induzione della lesione.

Uno dei due modelli da noi utilizzati è stato quello neurotossico nel ratto, in quanto ci pareva rispettare abbastanza fedelmente i criteri sopra esposti, come già dimostrato in precedenti lavori (51,70).

La Volkensina è una tossina appartenente alle RIPs (Ribosome Inactivating Proteins), famiglia di proteine capaci di provocare morte cellulare a seguito del blocco della sintesi proteica secondaria a inibizione dei ribosomi. La scelta della Volkensina quale mezzo di lesione si basa sia su valutazioni di ordine pratico, come il fatto che le proprietà neurotossiche di questa molecola sono già state studiate nel nostro ed in altri laboratori (51,70,87), sia su considerazioni di natura tecnica. Come già ricordato (parag. 1.4.), la Volkensina, iniettata a livello muscolare, viene trasportata in modo retrogrado fino al corpo cellulare dei motoneuroni che proiettano al sito di iniezione. Ne deriva una lesione che manifesta la sua selettività non tanto a livello muscolare, dove probabilmente determina una morte cellulare aspecifica a causa della sua diffusione locale, ma, piuttosto, a livello spinale, dove viene mantenuta l'integrità anatomica del tessuto nonostante si assista ad una notevole deplezione motoneuronale. Non si verificano infatti eventi di tossicità aspecifica dovuti ad una diffusione transinaptica della tossina o alla sua dispersione dopo la morte cellulare. In questo modo vengono conservate sia le fibre discendenti che le fibre ascendenti, e gran parte dei circuiti locali. Questo rappresenta un grande vantaggio rispetto ad altri protocolli di lesione, come quelli di contusione o transezione già menzionati: modelli validi, ma decisamente più adatti a studiare le conseguenze derivanti da eventi di natura traumatica piuttosto che da situazioni di degenerazione motoneuronale. Anche nel rapporto con altre neurotossine usate al medesimo scopo, per esempio le eccitotossine e le tossine monoaminergiche, la volkensina si è dimostrata superiore, per efficienza e

specificità (132). Nel nostro esperimento, la verifica della deplezione motoneuronale è stata effettuata mediante analisi densitometrica dei campioni colorati per AChE, la quale ha evidenziato come la densità di fibre colinergiche presenti nel tessuto lesionato sia pari a circa il 25% di quella rilevata negli animali intatti, differenza molto simile a quella che si riscontra confrontando, nello stesso animale, il lato lesionato con quello sano. Un'ulteriore conferma, sebbene semi-quantitativa, deriva dalle immagini ottenute con il Fluoro Gold, un tracciante che, iniettato a livello muscolare, risale fino ai corpi cellulari dei neuroni che raggiungono la zona in cui è stata eseguita l'iniezione. Anche in questo caso risulta evidente come negli animali lesionati il numero di motoneuroni lombari marcati con FluoroGold (e quindi attivi e vitali) sia nettamente inferiore a quello presente negli animali intatti o nella porzione controlaterale. Questi risultati trovano ulteriore appoggio in un recente lavoro in cui è stato dimostrato come la lesione con Volkensina comporti una riduzione dell'85% nel rilascio di ACh, indice di una drastica riduzione della popolazione motoneuronale (51). Non si è ritenuto necessario eseguire una caratterizzazione funzionale di tutti gli animali in quanto le difficoltà motorie manifestate risultano facilmente visibili (l'arto lesionato appare vistosamente paralizzato con muscolatura atrofica).

Il modello neurotossico presenta quindi, a nostro parere, delle caratteristiche molto adatte ad un approccio terapeutico di "cell replacement".

Come secondo modello abbiamo scelto quello degenerativo transgenico del topo G93A, il quale riproduce una malattia che, più di tutti gli altri modelli, si avvicina dal punto di vista clinico-patologico alla sclerosi laterale amiotrofica (SLA) umana.

La SLA è tra le più comuni patologie neurodegenerative che affliggono il sistema nervoso centrale, e colpisce sia il primo che il secondo motoneurone. La perdita selettiva dei motoneuroni si manifesta sottoforma di un

progressivo indebolimento muscolare che nell'arco di 2-5 anni porta il paziente a morte per paralisi dei muscoli respiratori. Le conoscenze sempre più approfondite provenienti dalla biologia molecolare, associate alle moderne tecniche dell'ingegneria genetica, consentono oggi la fondamentale produzione di modelli animali in cui ricreare le condizioni patologiche che si riscontrano in molte malattie umane.

In un lavoro di Rosen et al. del 1993 venne riportato per la prima volta il legame genetico tra la SLA familiare ed il gene che codifica l'enzima citosolico Cu/Zn superossido dismutasi tipo 1 (SOD1), ed identificate 11 differenti mutazioni "missense" in 13 diverse famiglie (104).

Il passo fondamentale verso la sperimentazione animale fu compiuto dall'anno successivo, quando il gruppo condotto da Gurney creò un topo transgenico che esprimeva forme wild-type o mutanti di SOD umana, in particolare il topo G93A, portatore della sostituzione Gly⁹³→Ala (53). I topi che esprimevano la SOD umana wild-type non mostravano segni della malattia, mentre i G93A sviluppavano una sindrome stereotipata suggestiva di malattia motoneuronale: intorno ai 3-4 mesi di vita cominciarono ad evidenziare segni di debolezza agli arti inferiori con progressivo deterioramento della marcia, divenendo completamente paralizzati tra il 5° ed il 6° mese.

Dal Canto e Gurney proseguirono con la caratterizzazione del modello, facendo un'analisi anatomo-patologica del topo G93A (34,35). Dimostrarono innanzitutto la massiccia perdita di cellule ChAT positive, ossia motoneuroni, nelle corna anteriori del midollo spinale. La gran parte dei motoneuroni contenevano materiale neurofibrillare, che appariva essere composto da neurofilamenti fosforilati. Le modificazioni più pronunciate si osservarono a carico del midollo anteriore, con importante perdita di grossi assoni mielinizzati nelle radici anteriori, mentre quelle posteriori apparivano relativamente risparmiate. Gli Autori esaminarono anche il muscolo gluteo degli animali, che mostrò massiccia perdita di assoni dal nervo e

conseguente reinnervazione di fibre muscolari da parte di “primarily nodal sprouts” che probabilmente compensavano la perdita di motoneuroni fino a stadi avanzati della malattia.

In sostanza questa è stata la prima caratterizzazione istopatologica dello sviluppo di una degenerazione neuronale in un modello animale ottenuto dall'espressione transgenica di un gene umano alterato, che sia stata associata alla SLA familiare.

Buona parte del nostro lavoro si è focalizzata sullo studio funzionale ed anatomo-patologico dei topi G93A, avendo come controllo animali dello stesso ceppo non mutanti, cioè wild-type (WT). Il fine è stato, oltre quello di confermare i dati ottenuti in precedenti lavori, studiare in modo approfondito e preciso le correlazioni esistenti tra la perdita di funzione e la degenerazione cellulare nei diversi stadi temporali della malattia.

Il comportamento motorio di tutti gli animali è stato osservato in open field, ma testato quantitativamente attraverso il Rotarod, uno strumento che registra la capacità degli animali di mantenere l'equilibrio e muovere gli arti in modo coordinato quando posti sopra un cilindro ruotante. Il Rotarod dimostra una sensibilità maggiore rispetto ad altri test motori, quali il test su griglie o l'open field test, dove la valutazione delle capacità motorie è spesso influenzata dalla soggettività dell'operatore.

I dati ottenuti dimostrano come già a 2 mesi dalla nascita i topi G93A manifestino sotto sforzo i primi problemi motori, non invece evidenziabili osservandoli durante la marcia comune. I disturbi motori si accentuano con il progredire dell'età e delle difficoltà dei tasks (aumento delle velocità di rotazione del cilindro) a cui vengono sottoposti. Questo calo funzionale rappresenta la manifestazione macroscopica della graduale perdita di neuroni e fibre colinergiche a livello del midollo spinale lombare, come evidenziato dalle analisi densitometriche e stereologiche.

Nei topi G93A di 2 mesi, l'analisi stereologica del numero dei motoneuroni nella regione lombare del midollo ha rivelato un calo di questa popolazione già massimale all'età di 2 mesi, senza ulteriori variazioni nel gruppo di 4 mesi. Un dato interessante, sebbene non abbia raggiunto la significatività statistica, deriva anche dalla stima dei volumi cellulari: si è osservato infatti come nei topi G93A a 2 mesi vi sia un aumento del volume dei motoneuroni di circa il 25% rispetto ai topi sani WT ed ai topi G93A di 4 mesi.

Risultati a nostro parere ancor più degni di attenzione sono scaturiti dalla lettura dei preparati con colorazione istochimica per le fibre AChE-positive.

Nel gruppo di topi G93A a 2 mesi infatti, in contrasto con la perdita massiccia di motoneuroni, la densità delle fibre colinergiche è pari a circa l'80% di quelle presenti nei topi WT, mentre la densità scende al 45% del normale negli animali G93A di 4 mesi. A parità di numero di motoneuroni quindi, i topi di 2 mesi presentano una densità di fibre di circa il 45% maggiore rispetto ai topi di 4 mesi. Tale risultato è compatibile con il peggioramento delle performance al rotarod test nell'arco di due mesi.

Il punto importante della discussione è quindi il seguente: i 3 parametri studiati, ossia il numero di motoneuroni, il loro volume e la densità dei processi colinergici, sono associati tra loro e più in generale con la graduale perdita di funzione motoria? L'interpretazione dei risultati ci porta ad ipotizzare l'instaurarsi di eventi compensatori nelle fasi iniziali del danno: i motoneuroni superstiti aumentano di volume in quanto incrementano la loro attività al fine di compensare le funzioni delle cellule degenerate. Allo stesso tempo mantengono o incrementano la densità dei loro processi colinergici. Tali eventi si potrebbero interpretare come fenomeni compensatori che permetterebbero di contenere il deficit funzionale nei primi stadi della malattia, prima che il danno divenga troppo esteso e quindi irreversibile.

E' lecito pensare che la performance motoria degli animali e la densità dei processi AChE-positivi, il numero e il volume delle cellule ChAT-positive a

livello dei segmenti lombari del midollo spinale, siano parametri correlati tra loro. Il sistema gode di una certa capacità di compensazione, espressione di plasticità, che permette nelle fasi iniziali (vedi i topi a 2 mesi) di sopperire al drammatico calo di motoneuroni e manifestare deficit motori rilevabili solo con tasks motori piuttosto estremi. Quando il danno si estende e supera le capacità di compensazione del sistema, la performance motoria crolla (vedi i topi a 4 mesi) e nelle successive 3-4 settimane si assiste ad una paralisi completa.

In conclusione la caratterizzazione dei deficits anatomico-funzionali effettuata sul modello transgenico G93A dimostra che questo modello è un buon punto di partenza per lo studio della SLA e di eventuali approcci terapeutici, sia di ripristino cellulare ma anche di neuroprotezione, sfruttando una plasticità che sembra in qualche grado intrinseca.

La caratterizzazione anatomo-funzionale di questo modello permette di delineare un quadro oggettivo delle condizioni fisio-patologiche da cui partire e a cui far riferimento per valutare gli effetti di un possibile intervento terapeutico. Negli ultimi 20 anni numerosi studi hanno portato allo sviluppo di terapie farmacologiche, mirate non solo a bloccare i meccanismi patologici, ma anche a stabilire un ambiente capace di favorire la rigenerazione neuronale. Sono nati così farmaci capaci di contrastare l'infiammazione, l'eccitotossicità da glutammato, il danno ossidativo, oltre a molecole quali i fattori di crescita e neurotrofici. Nessuna di queste strategie terapeutiche, però, sembra in grado di ripristinare la funzionalità dei motoneuroni in via di degenerazione. È proprio alla luce di tale considerazione che si fa sempre più concreta la possibilità di affrontare con approcci di terapia cellulare patologie in cui si verifica la perdita di una popolazione cellulare ben definita, come avviene, appunto, nei nostri 2 modelli.

Le frontiere aperte dalla sperimentazione scientifica sembrano indicare la terapia cellulare come un promettente mezzo per raggiungere la meta prestabilita, attraverso vie che possono essere differenti a seconda della patologia da studiare e del modello che si ha a disposizione. Mediante questa strategia terapeutica si può quindi pensare di ristabilire circuiti neuronali funzionali, di promuovere la rimielinizzazione degli assoni o la loro ricrescita, o di fornire al tessuto una fonte di fattori di crescita o di neuroprotezione capaci di sostenere la plasticità delle cellule endogene.

Per quanto attiene alle patologie midollari traumatiche, che esulano dal nostro lavoro ma non possono non essere menzionate per la loro incidenza nella popolazione e per i numerosi filoni di ricerca su modelli animali, non esiste a tutt'oggi una terapia capace di garantire un recupero funzionale soddisfacente, nonostante la clinica metta a disposizione farmaci atti a contrastare come detto alcuni degli effetti secondari della lesione stessa (infiammazione ed edema in primis). Per questo la ricerca attuale è maggiormente indirizzata alla riparazione del danno primario, che nel caso dei traumi è prevalentemente di tipo assonale. La quantità di motoneuroni danneggiati da un trauma vertebro-midollare grave, essendo limitata alla zona sede della lesione e non inizialmente diffusa a monte ed a valle della stessa, si può infatti considerare quasi trascurabile rispetto alla distruzione di fibre della sostanza bianca delle vie lunghe (47). In questo senso, i tentativi di terapia cellulare atti al ripristino dei motoneuroni perduti, appaiono forse meno adatti rispetto a quelli di rigenerazione assonale e mielinica (81bis).

Un parametro importante da cui può dipendere la riuscita dei trapianti, è l'intervallo di tempo che trascorre tra il momento della lesione e quello del trapianto stesso. Numerosi studi condotti su modelli diversi di lesione spinale, con cellule staminali neurali sia di origine embrionale che adulta, suggeriscono, infatti, come nel midollo lesio si instauri un ambiente ostile, in

cui il differenziamento verso un fenotipo gliale viene decisamente favorito a scapito di quello neuronale. Si possono riconoscere così 3 fasi cronologicamente distinte nello sviluppo della risposta al danno, ovvero una fase acuta in cui si ha un forte aumento di citochine infiammatorie che raggiungono il picco massimo dopo 6-12 ore dalla lesione, una fase subacuta che comincia circa una settimana dopo la lesione, in cui le stesse citochine assumono una funzione neurotrofica, ed una fase cronica in cui si assiste alla formazione di una componente cicatriziale che potrebbe ostacolare la migrazione cellulare così come la rigenerazione degli assoni (92).

Sulla base di queste osservazioni, nel nostro modello di degenerazione neurotossica abbiamo deciso di eseguire i trapianti di precursori umani immortalizzati nei ratti (lesionati al primo giorno di vita) in due finestre temporali diverse, ovvero dopo una settimana dalla lesione per quanti riguarda i neonati, e dopo 60 giorni per quanto riguarda gli adulti, scelta intrapresa per poter verificare se l'eventuale differenziamento delle cellule immortalizzate fosse avvenuto in base agli stimoli ambientali, o se avesse seguito un programma intrinseco alle cellule stesse. Per uniformità procedurale gli stessi intervalli sono stati rispettati anche con il trapianto del secondo tipo cellulare, i neuroblasti, sebbene in questo caso le cellule fossero ormai indirizzate verso un preciso fenotipo. Le cellule utilizzate in questi trapianti, infatti, sono state isolate da ratti al dodicesimo giorno di vita embrionale (E12), periodo in cui a livello del midollo spinale non si trovano più cellule dalle proprietà pienamente staminali ma, piuttosto, progenitori gliali e neuronali (71). Per testare le capacità differenziative della popolazione cellulare isolata, si sono eseguite alcune colorazioni immunoistochimiche *in vitro* su aliquote della sospensione cellulare utilizzata per l'impianto. Questo ha permesso di rilevare la presenza di antigeni gliali come GFAP, antigeni neurali precoci come β tubIII, e tardivi come ChAT. Come ci si aspettava, le cellule hanno dimostrato positività per

l'espressione di entrambi i marcatori neuronali, confermando come al dodicesimo giorno di vita embrionale, nel ratto siano presenti neuroblasti dal destino differenziativo ormai ben delineato. Nello stesso campione cellulare si sono riscontrate, sebbene in misura minore, anche cellule GFAP positive, le quali evidenziano come nella popolazione di partenza fosse compresa anche una certa componente gliale. La presenza di quest'ultima può dare origine a fenomeni cicatriziali (glial scar) che si opporrebbero alla crescita delle fibre. D'altra parte, le cellule gliali potrebbero favorire la creazione di una nicchia protettiva capace di mimare il microambiente presente a livello spinale, favorendo così la migrazione, la sopravvivenza ed il differenziamento cellulare (71).

I risultati ottenuti *in vivo* rivelano la presenza di trapianti vitali e generalmente ben integrati dal punto di vista anatomico, sia nei neonati che negli adulti, esiti che fanno ritenere come i protocolli di lesione e trapianto adottati siano efficaci e ripetibili. Le cellule trapiantate sono circondate da vasi sanguigni, elemento fondamentale per garantire il trofismo e la sopravvivenza nel tessuto ospite. Inoltre, come risulta dalle immagini ad ingrandimento maggiore, risulta spesso difficile distinguere il confine tra il trapianto ed il tessuto ospite, fatta qualche rara eccezione in cui, soprattutto negli adulti, si osserva la presenza, seppur minima, di tessuto derivante da proliferazione gliale. Poiché le caratteristiche fenotipiche delle cellule utilizzate erano già state confermate dalla analisi *in vitro*, si è deciso di eseguire una colorazione per AChE, per evidenziare l'eventuale presenza di cellule colinergiche. Dalle analisi microscopiche, si può osservare come ai margini del trapianto si localizzino numerose cellule AChE positive, di grandi dimensioni, identificabili come motoneuroni. Questo indica una modesta capacità migratoria per queste cellule che appaiono spesso circondate da una rete di fibre colinergiche provenienti presumibilmente dal tessuto ospite.

Poiché ai fini di questa tesi lo scopo dei trapianti con neuroblasti era quello di fornire un modello procedurale con eventuali risultati solamente preliminari, non si è proceduto ad un'analisi funzionale del trapianto, aspetto che comunque è già stato analizzato in un recente lavoro, dove si dimostra come il rilascio di acetilcolina aumenti in modo significativo in seguito all'intervento: questo suggerisce il ripristino della neurotrasmissione colinergica locale ad opera dei neuroblasti impiantati (51).

Sempre nel modello neurotossico, anche i trapianti di precursori umani immortalizzati hanno fatto registrare trapianti vitali, sebbene in questo caso, dato il minor intervallo di tempo trascorso fino al momento del sacrificio (un mese), le cellule siano risultate meno differenziate. Così come si può osservare con i neuroblasti, anche in questo caso le cellule trapiantate risultano per lo più addensate in prossimità del sito di iniezione, mostrando anch'esse qualche capacità migratoria. Le analisi immunostochimiche non permettono di trarre conclusioni riguardo al destino differenziativo di queste cellule: fatta eccezione per una modesta positività all'antigene DCX nei trapianti effettuati nei neonati, infatti, non si può affermare se queste cellule vanno incontro ad un differenziamento gliale o neuronale.

Questi risultati incerti sono da attribuire probabilmente al fatto che gli animali sono stati sacrificati ad un mese dal trapianto, intervallo forse troppo breve per assistere ad un differenziamento di queste cellule, in particolare se si considera l'origine umana della linea da noi utilizzata.

Paragonando i due trapianti effettuati nel modello neurotossico (neuroblasti omotipici e precursori umani immortalizzati), si può concludere che entrambe le popolazioni cellulari sono in grado di sopravvivere e dare inizio a differenziamento; in nessuno dei due casi, tuttavia, le cellule trapiantate hanno assimilato il Fluoro Gold, iniettato nella sede terminale una settimana prima del sacrificio, indicando come, sebbene capaci di emettere prolungamenti, questi non riescono ad uscire dal midollo spinale per andare ad innervare il muscolo lesionato. Risultati simili sono stati riscontrati anche

da altri gruppi. In diversi studi, infatti, nonostante si fosse ottenuto un evidente differenziamento motoneuronale ed un parziale recupero motorio, i trapianti non apparivano aver dato luogo a proiezioni lunghe formanti placche neuromuscolari funzionanti (136).

Per quanto riguarda il modello transgenico G93A, in letteratura sono stati testati protocolli di trapianto con cellule murine di origine gliale (12), ematopoietica (30) o con cellule del Sertoli (58) così come con cellule umane derivate da sangue del cordone ombelicale (48). Più recentemente, inoltre, sono state trapiantate cellule staminali neurali umane nel topo G93A (136). In quest'ultimo caso gli Autori hanno utilizzato un protocollo immunosoppressivo con FK-506 (1mg/kg al giorno per via intraperitoneale) che, a differenza di quanto ottenuto da noi con la Ciclosporina, è stato in grado di prevenire fenomeni di rigetto. Nel loro complesso, i risultati ottenuti da tali studi hanno dimostrato come la terapia cellulare consenta di ottenere un parziale recupero motorio. Tuttavia, data la rapidità con cui si manifesta, tale miglioramento funzionale sembra dipendere non tanto dalla capacità delle cellule trapiantate di differenziare e sostituire i motoneuroni persi ma, più probabilmente, dalla loro possibile attitudine a rilasciare fattori trofici e neuroprotettivi che supporterebbero la ripresa delle cellule in via di degenerazione (136).

Nel nostro lavoro, topi G93A WT sono stati sottoposti a trapianto spinale con cellule umane immortalizzate provenienti dalla corteccia fetale e trattati con due differenti protocolli immunosoppressivi che hanno previsto la somministrazione di Ciclosporina per via orale o per via intraperitoneale. In tutti i casi si è assistito alla degenerazione dei trapianti: in prossimità del sito di impianto si è osservata la formazione di una zona cicatriziale e la presenza di detriti e cellule degenerate. Possibili cause della mancata sopravvivenza delle cellule potrebbero essere legate a problemi tecnici, come la preparazione non ottimale delle sospensioni cellulari. Questo appare

tuttavia poco probabile alla luce della buona sopravvivenza dimostrata dalle stesse cellule quando impiantate nel modello neurotossico di ratto. In alternativa, i trapianti nei topi potrebbero essere degenerati a causa della scarsa efficacia dei protocolli immunosoppressivi adottati. Tale eventualità appare riflettere suscettibilità differenziali, in specie diverse, all'azione della ciclosporina, le quali spiegherebbero come mai nessuno dei topi (né i G93A, né i WT) abbiano presentato impianti intatti. Il prossimo obiettivo consisterà, quindi, nel ripetere il protocollo di trapianto spinale sui topi G93A e sui WT utilizzando un diverso trattamento immunosoppressivo basato sull'impiego di dosi maggiori di ciclosporina capace di far sopravvivere le cellule impiantate ed, eventualmente, valutare le variazioni anatomico-funzionali che ne possono derivare.

Inoltre, sono in corso studi nei quali si intende promuovere neuroprotezione e/o ritardare il decorso degli eventi neurodegenerativi attraverso procedure ex-vivo di impianto di cellule ingegnerizzate, ovvero l'infusione locale di molecole ad azione neurotrofica.

5. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

I due modelli scelti ci sembrano adatti allo scopo di prefissatoci di perseguire sulla strada della terapia cellulare.

Il modello transgenico G93A che riproduce una malattia molto simile alla SLA umana, da noi approfonditamente caratterizzato dal punto di vista funzionale in relazione all'istopatologia nei vari stadi della malattia, potrebbe essere adatto, oltre che ad un approccio di ripristino cellulare come da noi tentato, anche ad uno di neuroprotezione, considerate le caratteristiche di plasticità che sembra mantenere inizialmente nonostante la degenerazione. Tra le cose che ci proponiamo di fare, la prima sarà verificare se la deplezione neuronale che abbiamo osservato nei topi G93A comincia prima dei 2 mesi di vita, valutando quindi il quadro anatomico già all'età di un mese. Ci sembra inoltre opportuno allargare la casistica degli animali in cui è stata effettuata la conta neuronale, per verificare se i dati ottenuti, in particolare quelli riguardanti l'aumento del volume cellulare siano riproducibili ed acquistino forza statistica. Per quanto riguarda i trapianti, essi verranno ripetuti testando nuovi protocolli di immunosoppressione, sfruttando l'associazione di diversi farmaci o, più semplicemente, aumentando la concentrazione della ciclosporina A.

Il modello neurotossico secondario ad iniezione intramuscolare di Volkensina ci appare ben riproducibile e, per la massiccia e molto selettiva capacità di creare deplezione motoneuronale, adatto per un approccio di ripristino cellulare. In riferimento ai trapianti, appurata la capacità delle cellule immortalizzate di sopravvivere in un ambiente apparentemente non ostile quale il midollo spinale lesionato con questa metodica, il passo successivo sarà verificare se tali trapianti possano rimanere vitali a lungo termine senza comportare eventi indesiderati (quali lo sviluppo di neoplasie), ma vedere verso quale fenotipo si indirizzino le cellule in questo

tipo di lesione. Un altro aspetto che intendiamo affrontare è rappresentato dal trapianto di queste stesse cellule sottoposte all'applicazione di protocolli di pre-differenziamento e differenziamento in vitro che si stanno ora testando nel nostro laboratorio al fine di indirizzarle verso un fenotipo colinergico. Alcuni studi dimostrano infatti come l'utilizzo di cellule il cui programma differenziativo ha già intrapreso un percorso definito favorisca ulteriormente la riuscita di trapianti vitali in un ambiente considerato poco permissivo come il midollo spinale. Un ulteriore obiettivo estremamente importante sarà verificare se questi trapianti eseguiti con le cellule immortalizzate, precedentemente differenziate o meno, saranno in grado di integrarsi al tessuto ospite in modo funzionalmente corretto, stabilendo cioè sinapsi colinergiche capaci di favorire, nella migliore delle ipotesi, il recupero motorio.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Akiyama, Y, Radtke, C, Honmou, O and Kocsis, JD. Remyelination of the spinal cord following intravenous delivery of bone marrow cells. *Glia* 39: 229-36, 2002
2. Albrecht, PJ, Murtie, JC, Ness, JK, Redwine, JM, Enterline, JR, Armstrong, RC and Levison, SW. Astrocytes produce CNTF during the remyelination phase of viral-induced spinal cord demyelination to stimulate FGF-2 production. *Neurobiol Dis* 13: 89-101, 2003
3. Al-Chalabi, A, Andersen, PM, Nilsson, P, Chioza, B, Andersson, JL, Russ, C, Shaw, CE, Powell, JF and Leigh, PN. Deletions of the heavy neurofilament subunit tail in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 8: 157-64, 1999
4. Alexianu ME, Kozovska M, Appel SH. Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression. *Neurology* 57:1282-1289, 2001
5. Alisky, JM and Tolbert. Differential labeling of converging afferent pathways using biotinylated dextran amine and cholera toxin subunit B *J Neurosci Methods* 52:143-8, 1994
6. Anderson, TE. A controlled pneumatic technique for experimental spinal cord contusion. *J Neurosci Methods.*, 6: 327-33, 1982
7. Aoki M, Kato S, Nagai M, Itoyama Y. Development of a rat model of amyotrophic lateral sclerosis expressing a human SOD1 transgene. *Neurophatology* 25:365-370, 2005
8. Barami K, Diaz FG. Cellular Transplantation and Spinal Cord Injury. *Neurosurgery* 47(3): 691- 700, 2001
9. Barbeau, H and Rossignol, S. Recovery of locomotion after chronic spinalization in the adult cat. *Brain Res* 412:84-95 122, 1987

10. Basso, DM, Beattie, MS and Bresnahan, JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma* 12:1-21, 1995
11. Beckman JS, Estèvez AG, Crow JP, Barbeito L. Superoxide dismutase and the death of motoneurons in ALS. *TINS* 24 Suppl 11:S15-S20, 2001
12. Beers, DR, Henkel, JS, Xiao, Q, Zhao, W, Wang, J, Yen, AA, Siklos, L, McKercher, SR and Appel, SH. Wild-type microglia extend survival in PU1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:16021-6, 2006
13. Bendotti C, Carrì MT. Lessons from models of SOD1-linked familial ALS. *Trends in Molecular Medicine* 10:393-399, 2004
14. Bennett, DJ, Sanelli, L, Cooke, CL, Harvey, PJ and Gorassini, MA. Spastic long-lasting reflexes in the awake rat after sacral spinal cord injury. *J Neurophysiol* 91: 2247-58, 2004
15. Bernstein-Goral, H and Bregman, BS. Spinal cord transplants support the regeneration of axotomized neurons after spinal cord lesions at birth: a quantitative double-labeling study. *Exp Neurol* 123:118-32,1993
16. Bernstein-Goral, H and Bregman, BS. Axotomized rubrospinal neurons rescued by fetal spinal cord transplants maintain axon collaterals to rostral CNS targets. *Exp Neurol* 148:13-25, 1997
17. Blumenkopf, B and Lipman, JJ. Studies in autotomy: its pathophysiology and usefulness as a model of chronic pain. *Pain* 45:203-9, 1991
18. Bregman, BS and Reier, PJ. Neural tissue transplants rescue axotomized rubrospinal cells from retrograde death. *J Comp Neurol* 244: 86-95, 1986
19. Bregman, BS, Kunkel-Bagden, E, Reier, PJ, Dai, HN, McAtee, M and Gao, D. Recovery of function after spinal cord injury: mechanisms underlying transplant-mediated recovery of function differ after spinal cord injury in newborn and adult rats. *Exp Neurol* 123: 3-16, 1993

20. Bruijn, LI, Becher, MW, Lee, MK, Anderson, KL, Jenkins, NA, Copeland, NG, Sisodia, SS, Rothstein, JD, Borchelt, DR, Price, DL and Cleveland, DW. ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron* 18: 327-38, 1997
21. Bruijn LI, Houseweart MK, Kato S, Anderson SD, Ohama E, Reaume AG, Scott RW, Cleveland DW. Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wildtype SOD1. *Science* 281:1851-1854, 1998
22. Buitrago, MM, Schulz, JB, Dichgans, J and Luft, AR. Short and long-term motor skill learning in an accelerated rotarod training paradigm *Neurobiol Learn Mem* 81:211-6, 2004
23. Bunge, MB. Transplantation of purified populations of Schwann cells into lesioned adult rat spinal cord. *J Neurol* 242:S36-9,1994
24. Cacci, E, Villa, A, Parmar, M, Cavallaro, M, Mandahl, N, Lindvall, O, Martinez-Serrano, A and Kokaia, Z. Generation of human cortical neurons from a new immortal fetal neural stem cell line. *Exp Cell Res* 313:588-601, 2007
25. Campos, L, Meng, Z, Hu, G, Chiu, DT, Ambron, RT and Martin, JH. Engineering novel spinal circuits to promote recovery after spinal injury. *J Neurosci* 24:2090-101, 2004
26. Cao, QL, Zhang, YP, Howard, RM, Walters, WM, Tsoulfas, P and Whittemore, SR. Pluripotent stem cells engrafted into the normal or lesioned adult rat spinal cord are restricted to a glial lineage. *Exp Neurol* 167:48-58, 2001
27. Castro, RF, Jackson, KA, Goodell, MA, Robertson, CS, Liu, H and Shine, HD. Failure of bone marrow cells to transdifferentiate into neural cells in vivo. *Science* 297:1299, 2002
28. Chyu AY, Zhai Ping, Dal Canto C, Peters TM, Kwon YW, Prattis SM, Gurney ME. Age-dependent penetrance of disease in a transgenic

- mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Cell Neurosci* 6:349-362, 1995
29. Corti, S, Locatelli, F, Donadoni, C, Strazzer, S, Salani, S, Del Bo, R, Caccialanza, M, Bresolin, N, Scarlato, G and Comi, GP. Neuroectodermal and microglial differentiation of bone marrow cells in the mouse spinal cord and sensory ganglia. *J Neurosci Res* 70, 721-33 (2002)
 30. Corti, S, Locatelli, F, Donadoni, C, Guglieri, M, Papadimitriou, D, Strazzer, S, Del Bo, R and Comi, GP. Wild-type bone marrow cells ameliorate the phenotype of SOD1-G93A ALS mice and contribute to CNS, heart and skeletal muscle tissues. *Brain* 127:2518-32, 2004
 31. Cova L, Ratti A, Volta M, Fogh I, Cardin V, Corbo M, Silani V. Stem cell therapy for neurodegenerative diseases: the issue of transdifferentiation. *Stem Cells Dev* 13: 121-131, 2004
 32. Cote, F, Collard, JF and Julien, JP. Progressive neuronopathy in transgenic mice expressing the human neurofilament heavy gene: a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cell* 73:35-46, 1993
 33. Cusick, CG, Wall, JT, Whiting, JH, Jr and Wiley, RG. Temporal progression of cortical reorganization following nerve injury. *Brain Res* 537:355-8, 1990
 34. Dal Canto MC, Gurney ME. Development of central nervous system pathology in a murine transgenic model of human amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol* 145:1271-1280, 1994
 35. Dal Canto MC, Gurney ME. Neuropathological changes in two lines of mice carrying a transgene for mutant Cu, Zn SOD, and in mice overexpressing wild type human SOD: a model of familial amyotrophic lateral sclerosis (FALS). *Brain Res* 676:25-40 1995
 36. Deng HX, Hentati A, Tainer JA, et al. Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *Science* 261:1047-1051, 1993

37. Desnuelle C, Garrel C, Favier A. A double-blind, placebo-controlled randomized clinical trial of *α*-tocopherol (vitamin E) in the treatment of ALS. *ALS Other Mot Neuron Disord* 2:9-18, 2001
38. Deshpande, DM, Kim, YS, Martinez, T, Carmen, J, Dike, S, Shats, I, Rubin, LL, Drummond, J, Krishnan, C, Hoke, A, Maragakis, N, Shefner, J, Rothstein, JD and Kerr, DA. Recovery from paralysis in adult rats using embryonic stem cells. *Ann Neurol* 60:32-44, 2006
39. DiStefano, PS, Schweitzer, JB, Taniuchi, M and Johnson, EM, Jr. Selective destruction of nerve growth factor receptor-bearing cells in vitro using a hybrid toxin composed of ricin A chain and a monoclonal antibody against the nerve growth factor receptor. *J Cell Biol* 101:1107-14, 1985
40. Drachman, DB, Frank, K, Dykes-Hoberg, M, Teismann, P, Almer, G, Przedborski, S, Rothstein, JD. Cyclooxygenase 2 inhibition protects motor neurons and prolongs survival in a transgenic mouse model of ALS. *Ann Neurol* 52:771-778, 2002
41. Eiklid, K, Olsnes, S and Pihl, A. Entry of lethal doses of abrin, ricin and modeccin into the cytosol of HeLa cells. *Exp Cell Res* 126:321-6, 1980
42. Elder, GA, Friedrich, VL, Jr, Margita, A and Lazzarini, RA. Age-related atrophy of motor axons in mice deficient in the mid-sized neurofilament subunit. *J Cell Biol* 146:181-92, 1999
43. Elliott, JL. Experimental models of amyotrophic lateral sclerosis . *Neurobiol Dis* 6:310-20, 1999
44. Figlewicz, DA, Krizus, A, Martinoli, MG, Meiningner, V, Dib, M, Rouleau, GA and Julien, JP. Variants of the heavy neurofilament subunit are associated with the development of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 3:1757-61 , 1994
45. Finkelstein, SD, Gillespie, JA, Markowitz, RS, Johnson, DD, Black, P. Experimental spinal cord injury: qualitative and quantitative histopathologic evaluation. *J Neurotrauma* 7:29-40, 1990

46. Fuchs, E, Tumber, T and Guasch, G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 116:769-78, 2004
47. Garbossa, D, Fontanella, M, Fronda, C, Benevello, C, Muraca, G, Ducati, A, Vercelli. A New strategies for repairing the injured spinal cord: the role of stem cells. *Neurol Res.* 28(5):500-4, 2006
48. Garbuzova-Davis, S, Willing, AE, Zigova, T, Saporta, S, Justen, EB, Lane, JC, Hudson, JE, Chen, N, Davis, CD and Sanberg, PR. Intravenous administration of human umbilical cord blood cells in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: distribution, migration, and differentiation. *J Hematother Stem Cell Res* 12:255-70, 2003
49. Gros-Louis, F, Gaspar, C and Rouleau, GA. Genetics of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1762:956-72, 2006
50. Gruner, JA. A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat. *J Neurotrauma* 9:123-6; discussion 126-8, 1992
51. Gulino, R, Cataudella, T, Casamenti, F, Pepeu, G, Stanzani, S and Leanza, G. Acetylcholine release from fetal tissue homotopically grafted to the motoneuron-depleted lumbar spinal cord An in vivo microdialysis study in the awake rat. *Exp Neurol* 204:326-38, 2007
52. Guo, Y, Follo, M, Geiger, K, Lubbert, M and Engelhardt, M. Side-population cells from different precursor compartments. *J Hematother Stem Cell Res* 12:71-82, 2003
53. Gurney, ME, Pu, H, Chiu, AY, Dal Canto, MC, et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264:1772-1775, 1994 [Erratum, *Science* 269:149, 1995]
54. Gurney, ME, Cutting, FB, Zhai, P, et al. Benefit of vitamin E, riluzole, and gabapentin in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 39:147-157, 1996

55. Han, SS, Kang, DY, Mujtaba, T, Rao, MS and Fischer, I. Grafted lineage-restricted precursors differentiate exclusively into neurons in the adult spinal cord. *Exp Neurol* 177:360-75, 2002
56. Hedreen, JC, Bacon, S, Price, D. A modified histochemical technique to visualize acetylcholinesterase-containing axons. *J Histochem Cytochem* 33:134-140, 1985
57. Helke, CJ, Charlton, CG and Wiley, RG. Suicide transport of ricin demonstrates the presence of substance P receptors on medullary somatic and autonomic motor neurons. *Brain Res* 328:190-5, 1985
58. Hemendinger, R, Wang, J, Malik, S, Persinski, R, Copeland, J, Emerich, D, Gores, P, Halberstadt, C and Rosenfeld, J. Sertoli cells improve survival of motor neurons in SOD1 transgenic mice, a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 196:235-43, 2005
59. Himes, BT and Tessler, A. Death of some dorsal root ganglion neurons and plasticity of others following sciatic nerve section in adult and neonatal rats. *J Comp Neurol* 284:215-230, 1989
60. Hirano, A. Cytopathology of amyotrophic lateral sclerosis. *Adv Neurol* 56:91-101, 1991
61. Horvat, J-C, Baillet-Derbin, C, Ye, JH, Rhrich, F and Affane, F. Co-transplantation of embryonic neural tissue and autologous peripheral nerve segments to severe spinal cord injury of the adult rat Guided axiogenesis from transplanted neurons. *Restor Neurol Neurosci* 2:289-298, 1991
62. Howard, MJ, Liu, S, Schottler, F, Joy Snider, B and Jacquin, MF. Transplantation of apoptosis-resistant embryonic stem cells into the injured rat spinal cord. *Somatosens Mot Res* 22:37-44, 2005
63. Iwanami, A, Kaneko, S, Nakamura, M, Kanemura, Y, Mori, H, Kobayashi, S, Yamasaki, M, Momoshima, S, Ishii, H, Ando, K, Tanioka, Y, Tamaoki, N, Nomura, T, Toyama, Y and Okano, H. Transplantation

- of human neural stem cells for spinal cord injury in primates. *J Neurosci Res* 80:182-90, 2005
64. Julien, JP, Kriz, J. Transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1762: 1013-1024, 2006
65. Karnowsky MJ, Roots L. A direct coloring thiocholine method for cholinesterase. *J Histochem Cytochem* 12:219-221, 1964
66. Klein, SM, Behrstock, S, McHugh, J, Hoffmann, K, Wallace, K, Suzuki, M, Aebischer, P and Svendsen, CN. GDNF delivery using human neural progenitor cells in a rat model of ALS. *Hum Gene Ther* 16:509-21, 2005
67. Kriz, J, Zhu, Q, Julien, JP and Padjen, AL. Electrophysiological properties of axons in mice lacking neurofilament subunit genes: disparity between conduction velocity and axon diameter in absence of NF-H. *Brain Res* 885:32-44, 2000
68. Kriz, J, Nguyen, MD, Julien, JP. Minocycline slows disease progression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 1:268-278, 2002
69. Kwon, BK, Oxland, TR and Tetzlaff, W. Animal models used in spinal cord regeneration research *Spine* 27:1504-10, 2002
70. Leanza, G, Stanzani, S. Extensive and permanent motoneuron loss in the rat lumbar spinal cord following neurotoxic lesion at birth: morphological evidence. *Neurosciences Letters* 244:89-92, 1998
71. Lepore, AC and Fischer, I. Lineage-restricted neural precursors survive, migrate, and differentiate following transplantation into the injured adult spinal cord. *Exp Neurol* 194:230-42, 2005
72. Lepore, AC, Neuhuber, B, Connors, TM, Han, SS, Liu, Y, Daniels, MP, Rao, MS and Fischer, I.(2006) Long-term fate of neural precursor cells following transplantation into developing and adult CNS. *Neuroscience* 142:287-304, 2006

73. Lieberman, AR. The axon reaction: a review of the principal features of perikaryal responses to axon injury. *Int Rev Neurobiol* 14:49-124, 1971
74. Liu, N, Han, S, Lu, PH and Xu, XM. Upregulation of annexins I, II, and V after traumatic spinal cord injury in adult rats. *J Neurosci Res* 77:391-401, 2004
75. Liu, S, Qu, Y, Stewart, TJ, Howard, MJ, Chakraborty, S, Holekamp, TF and McDonald, JW. Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6126-31, 2000
76. Llado, J, Haenggeli, C, Maragakis, NJ, Snyder, EY and Rothstein, JD. Neural stem cells protect against glutamate-induced excitotoxicity and promote survival of injured motor neurons through the secretion of neurotrophic factors. *Mol Cell Neurosci* 27:322-31, 2004
77. Lowrie, MB, Krishnan, S and Vrbova', G. Permanent changes in muscle and motoneurons induced by nerve injury during a critical period of development of the rat. *Dev Brain Res* 31:91-101, 1987
78. Lu, P, Jones, LL, Snyder, EY and Tuszynski, MH. Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury. *Exp Neurol* 181:115-29, 2003
79. Manetto, V, Sternberger, NH, Perry, G, Sternberger, LA and Gambetti, P. Phosphorylation of neurofilaments is altered in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 47:642-53, 1988
80. Mantyh, PW, Rogers, SD, Honore, P, Allen, BJ, Ghilardi, JR, Li, J, Daughters, RS, Lappi, DA, Wiley, RG and Simone, DA. Inhibition of hyperalgesia by ablation of lamina I spinal neurons expressing the substance P receptor. *Science* 278:275-9, 1997
81. McDonald, JW, Liu, XZ, Qu, Y, Liu, S, Mickey, SK, Turetsky, D, Gottlieb, DI and Choi, DW . Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat Med* 5:1410-2, 1999

- 81bis McKerracher L. Spinal cord repair: strategies to promote axon regeneration. *Neurobiol Dis* 8:11-18, 2001
82. Metz, GAS. Validation of the weight-drop contusion model in rats: a comparative study of human spinal cord injury. *J Neurotrauma* 17:1-17, 2000
83. Miller, R, Gelinas, D, Moore, D, et al. A phase III placebo-controlled trial of gabapentin in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 46:494, abstract, 1999
84. Mitsumoto, H and Bradley, WG. Murine motor neuron disease (the wobbler mouse): degeneration and regeneration of the lower motor neuron. *Brain* 105:811-34, 1982
85. Monani, UR. Spinal muscular atrophy: a deficiency in a ubiquitous protein; a motor neuron-specific disease. *Neuron* 48:885-96, 2005
86. Noble, LJ, and Wrathall, JR. Spinal cord contusion in the rat: morphometric analyses of alterations in the spinal cord. *Exp Neurol* 88:135-49, 1985
87. Nogradi, A and Vrbova', G. The use of a neurotoxic lectin, volkensin, to induce loss of identified motoneuron pools. *Neuroscience* 50:975-986, 1992
88. Nogradi, A and Vrbova', G. The use of embryonic spinal cord grafts to replace identified motoneuron pools depleted by a neurotoxic lectin, volkensin. *Exp Neurol* 129:130-141, 1994
89. Nothias, F, Horvat, J-C, Mira, J-C, Pe'cot-Devachassine, M and Peschanski, M. Double step neural transplants to replace degenerated motoneurons. *Prog Brain Res* 82:239- 246, 1990
90. Nothias, F, Cadusseau, J, Dusart, I and Peschanski, M, Fetal neural transplants into an area of neurodegeneration in the spinal cord of the adult rat. *Restor Neurol Neurosci*, 2:283-288, 1991
91. Noyes, DH. Electromechanical impactor for producing experimental spinal cord injury in animals. *Med Biol Eng Comput* 25:335-40, 1987

92. Okano, H, Ogawa, Y, Nakamura, M, Kaneko, S, Iwanami, A and Toyama, Y. Transplantation of neural stem cells into the spinal cord after injury. *Semin Cell Dev Biol* 14:191-8, 2003
93. Oudega, M. Schwann cell and olfactory ensheathing cell implantation for repair of the contused spinal cord. *Acta Physiol (Oxf)* 189:181-9, 2007
94. Pallini, R, Vitiani, LR, Bez, A, Casalbore, P, Facchiano, F, Di Giorgi Gerevini, V, Falchetti, ML, Fernandez, E, Maira, G, Peschle, C and Parati, E. Homologous transplantation of neural stem cells to the injured spinal cord of mice. *Neurosurgery* 57:1014-25; discussion 1014-25, 2005
95. Perez-Bouza, A, Glaser, T and Brustle, O. ES cell-derived glial precursors contribute to remyelination in acutely demyelinated spinal cord lesions. *Brain Pathol* 15:208-16, 2005
96. Pinzon, A, Calancie, B, Oudega, M and Noga, BR. Conduction of impulses by axons regenerated in a Schwann cell graft in the transected adult rat thoracic spinal cord. *J Neurosci Res* 64:533-41, 2001
97. Pluchino, S, Zanotti, L, Deleidi, M and Martino, G. Neural stem cells and their use as therapeutic tool in neurological disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 48:211-9, 2005
98. Ramon-Cueto, A and Santos-Benito, FF. Cell therapy to repair injured spinal cords: olfactory ensheathing glia transplantation. *Restor Neurol Neurosci* 19:149-56, 2001
99. Rao, MV, Houseweart, MK, Williamson, TL, Crawford, TO, Folmer, J and Cleveland, DW. Neurofilament-dependent radial growth of motor axons and axonal organization of neurofilaments does not require the neurofilament heavy subunit (NF-H) or its phosphorylation. *J Cell Biol* 143:171-81, 1998
100. Rapalino, O, Lazarov-Spiegler, O, Agranov, E, Velan, GJ, Yoles, E, Fraidakis, M, Solomon, A, Gepstein, R, Katz, A, Belkin, M, Hadani, M and Schwartz, M. Implantation of stimulated homologous

- macrophages results in partial recovery of paraplegic rats. *Nat Med* 4:814-21, 1998
101. Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, et al. Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet* 13:43-47, 1996
 102. Renoncourt, Y, Carroll, P, Filippi, P, Arce, V and Alonso, S. Neurons derived in vitro from ES cells express homeoproteins characteristic of motoneurons and interneurons *Mech Dev*, 79:185-97, 1998
 103. Rivlin, AS, Tator, CH. Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat. *Surg Neurol* 10:38-43, 1978
 104. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362:59-62, 1993
 105. Rothstein JD. Excitotoxicity and neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neurosci* 3:348-359, 1995
 106. Santos-Benito, FF and Ramon-Cueto, A. Olfactory ensheathing glia transplantation: a therapy to promote repair in the mammalian central nervous system. *Anat Rec B New Anat* 271:77-85 248, 2003
 107. Sasaki, M, Honmou, O, Akiyama, Y, Uede, T, Hashi, K and Kocsis, JD. Transplantation of an acutely isolated bone marrow fraction repairs demyelinated adult rat spinal cord axons. *Glia* 35:26-34, 2001
 108. Scadden, DT. The stem-cell niche as an entity of action *Nature* 441:1075-9 257, 2006
 109. Schmalbruch, H, Jensen, HJ, Bjaerg, M, Kamieniecka, Z and Kurland, L. A new mouse mutant with progressive motor neuronopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 50:192-204, 1991
 110. *Scienza e Tecnica*, mensile di informazione della Società italiana per il progresso delle Scienze, n420, Ago 2005

111. Sekhon LH, Fehlings LG. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine* 15(24 Suppl):2-12, 2001
112. Shea, TB, Jung, C and Pant, HC. Does neurofilament phosphorylation regulate axonal transport? *Trends Neurosci* 26:397-400, 2003
113. Shibata N. Transgenic mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis with superoxide dismutase-1 mutation. *Neuropathology* 21:82-92, 2001
114. Shihabuddin, LS, Horner, PJ, Ray, J and Gage, FH. Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus *J Neurosci* 20:8727-35, 2000
115. Siddique T, Figlewicz DA, Pericak-Vance MA, Haines JL, Rouleau GA, Jeffers AJ, Sapp P, et al. Linkage of a gene causing familial amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 21 and evidence of genetic-locus heterogeneity *N Engl J Med* 324:1381-1384, 1991
116. Silani, V, Cova, L, Corbo, M, Ciammola, A and Polli, E. Stem-cell therapy for amyotrophic lateral sclerosis *Lancet* 364:200-2, 2004
117. Smith, PM, Jeffery, ND. Histological and ultrastructural analysis of white matter damage after naturally-occurring spinal cord injury. *Brain Pathol* 16:99-109, 2006
118. Stieber A, Gonatas JO, Gonatas NK. Aggregates of mutant protein appear progressively in dendrites, in periaxonal process of oligodendrocytes, and in neuronal and astrocytic perikarya of mice expressing the SOD1^{G93A} mutation of familial amyotrophic lateral sclerosis *J Neurol Sci* 177: 114-123, 2000
119. Stirpe F, Barbieri L, Abbondanza A, Falasca AI, Brown AN, Sandvig K, Olsnes S, Pihl A. Properties of volkensin, a toxic lectin from *Adenia volkensii*. *J Biol Chem* 260(27):14589-14595, 1985

120. Stokes BT, Noeys DH, Behrmann DI. An electromechanical spinal cord injury device with dynamic sensitivity. *J Neurotrauma* 9:187-95, 1992
121. Stokes BT, Jakeman LB. A murine model for experimental spinal cord injury. *Spinal Cord* 40:101-9, 2002
122. Storkebaum E, Lambrechts D, Dewerchin M, Moreno-Murciano MP, Appelsman S, et al. Treatment of motoneuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of ALS, *Nat Neurosci* 8:85-92, 2004
123. Subramaniam, JR, Lyons, WE, Liu, J, Bartnikas, TB, Rothstein, J, Price, DL, Cleveland, DW, Gitlin, JD and Wong, PC. Mutant SOD1 causes motor neuron disease independent of copper chaperone-mediated copper loading *Nat Neurosci* 5: 301-7, 2002
124. Talac R, Friedman JA, Moore MJ, Lu L, Jabbari E, Windebank AJ, Currier BL, Yaszemski MJ. Animal models of spinal cord injury for evaluation of tissue engineering treatment strategies. *Biomaterials* 25:1505-1510, 2004
125. Tetzlaff, W, Alexander, SW, Miller, FD and Bisby, MA. Response of facial and rubrospinal neurons to axotomy: changes in mRNA expression for cytoskeletal proteins and GAP-43 *J Neurosci* 11:2528-44,1991
126. Vaccaro, AR, Ahmad, SS, Rauschnig, W, et al. Anatomy and pathophysiology of spinal cord injury In Levine, AM, Eismont, GJ, Garfin, RR and al, *Spine trauma* WB Saunders, Philadelphia:, pp 75-86, 1998
127. Wang, J, Slunt, H, Gonzales, V, Fromholt, D, Coonfield, M, Copeland, NG, Jenkins, NA and Borchelt, DR. Copper-binding-site-null SOD1 causes ALS in transgenic mice: aggregates of non-native SOD1 delineate a common feature. *Hum Mol Genet* 12:2753-64, 2003

128. Wiedau-Pazos M, Goto JJ, Rabizadeh S, Gralla ED, Roe JA, Valentine JS, Bredesen DE. Altered reactivity of superoxide dismutase in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 271:515-518, 1996
129. Wiley, RG, Blessing, WW and Reis, DJ. Suicide transport: destruction of neurons by retrograde transport of ricin, abrin, and modeccin. *Science* 216:889-90, 1982
130. Wiley, RG and Stirpe, F. Neuronotoxicity of axonally transported toxic lectins, abrin, modeccin and volkensin in rat peripheral nervous system. *Neuropathol Appl Neurobiol* 13:39-53, 1987
131. Wiley, RG, Stirpe, F, Thorpe, P and Oeltmann, TN. Neuronotoxic effects of monoclonal anti-Thy 1 antibody (OX7) coupled to the ribosome inactivating protein, saporin, as studied by suicide transport experiments in the rat. *Brain Res* 505:44-54, 1989
132. Wiley, RG and Kline, IR. Neuronal lesioning with axonally transported toxins *J Neurosci Methods* 103:73-82, 2000
133. Wong, PC, Pardo, CA, Borchelt, DR, Lee, MK, Copeland, NG, Jenkins, NA, Sisodia, SS, Cleveland, DW and Price, DL. An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria *Neuron* 14:1105-16, 1995
134. Wu, P, Tarasenko, YI, Gu, Y, Huang, LY, Coggeshall, RE and Yu, Y. Region-specific generation of cholinergic neurons from fetal human neural stem cells grafted in adult rat. *Nat Neurosci* 5:1271-8, 2002
135. Xu XM, Zhang SX, Li H, Aebischer P, Bunge MB. Regrowth of axons into the distal spinal cord through a Schwann-cell-seeded mini-channel implanted into hemisectioned adult rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 11:1723-40, 1999
136. Xu, L, Yan, J, Chen, D, Welsh, AM, Hazel, T, Johe, K, Hatfield, G and Koliatsos, VE. Human neural stem cell grafts ameliorate motor neuron disease in SOD-1 transgenic rats. *Transplantation* 82:865-75, 2006

137. Yan, J, Welsh, AM, Bora, SH, Snyder, EY and Koliatsos, VE. Differentiation and tropic/trophic effects of exogenous neural precursors in the adult spinal cord. *J Comp Neurol* 480: 101-14, 2004
138. Yan, J, Xu, L, Welsh, AM, Hatfield, G, Hazel, T, Johe, K and Koliatsos, VE. Extensive Neuronal Differentiation of Human Neural Stem Cell Grafts in Adult Rat Spinal Cord. *PLoS Med*, 4, e39, 2007
139. Young, W. Spinal cord contusion models. *Prog Brain Res* 137:231-55, 2002
140. Zompa, EA, Cain, LD, Everhart, AW, Moyer, MP, Hulsebosch, CE. Transplant therapy: recovery of function after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 14:479-506, 1997

RINGRAZIAMENTI

Un grazie sincero al Prof. Leanza per avermi permesso di svolgere questo periodo di Dottorato presso il Laboratorio da lui diretto all'Università di Trieste, ricco di indispensabili insegnamenti e costanti consigli, e a tutti gli studenti e dottorandi che lavorano con lui per il concreto aiuto fornitomi, in particolare Elena e Veronica.

Ringrazio il Prof. Longatti per avermi spronato ad intraprender la strada del Dottorato di Ricerca, ed il Prof. Angelini per la stima e la fiducia dimostratami in questi tre anni.

Grazie ai miei genitori e a mio fratello per avermi sostenuto costantemente in maniera impagabile in questa ennesima prova.

Il grazie più grande a mia moglie Barbara per l'amore che mi corrisponde quotidianamente e che in ogni momento vedo riflesso negli occhi del nostro splendido piccolo Pietro.