

UNIVERSITA' DEGLI STUDI MILANO~BICOCCA

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dottorato in Neuroscienze

XXII ciclo



CELLULE STAMINALI NEURONALI E MICROGLIA:
CROSS-TALK IN UN MODELLO *IN VITRO* DI
NEUROINFIAMMAZIONE

Coordinatore: Prof. Giovanni TREDICI

Tutore: Prof. Vittorio LOCATELLI

Tesi di:

Simona CAPORALI

Matr. 028759

Anno Accademico

2008-2009

Indice

<i>Riassunto</i>	3
<i>Introduzione</i>	
L'infiammazione	9
La neuroinfiammazione	12
Le cellule della neuroinfiammazione	14
Le molecole della neuroinfiammazione	17
L'ischemia cerebrale	24
Il dolore neuropatico	27
Il ruolo di ATP nella neuroinfiammazione	29
Le cellule staminali	34
<i>Scopo della tesi</i>	45
<i>Materiali e metodi</i>	48
<i>Risultati</i>	61
<i>Discussione</i>	89
<i>Bibliografia</i>	95

RIASSUNTO

L'ischemia cerebrale è una condizione patologica indotta da un'interruzione assoluta o parziale del flusso ematico in un'area del cervello. Le cellule dell'area colpita, vengono così private di ossigeno e nutrienti e vanno incontro a morte o a danni di diversa entità. La sofferenza e la morte neuronale instaurano il processo di neuroinfiammazione, il cui scopo primario è quello di proteggere i neuroni sopravvissuti; tuttavia, se l'entità del fenomeno infiammatorio supera una certa soglia, può produrre effetti negativi e peggiorare il danno neuronale.

Nelle zone lesionate vi è una massiva liberazione di diversi mediatori, tra cui ATP, nello spazio extracellulare da parte dei neuroni e delle cellule gliali coinvolte. E' stato dimostrato che un'elevata concentrazione di ATP nello spazio extracellulare esercita un effetto tossico sia sui neuroni che sulle cellule gliali circostanti e che attiva le cellule microgliali mediante stimolazione di specifici recettori purinergici. Le cellule della microglia sono, a loro volta, responsabili dell'amplificazione e del mantenimento dello stato neuroinfiammatorio mediante la produzione di molecole pro-infiammatorie quali citochine e chemochine. Poiché un'attivazione microgliale prolungata e incontrollata è dannosa per i neuroni l'inibizione dello stato neuroinfiammatorio costituisce oggi un target d'elezione per limitare il danno provocato dall'ischemia.

Numerosi studi hanno ampiamente esaminato il trapianto cerebrale di cellule staminali neuronali (NSC) come mezzo per ripristinare le reti neurali danneggiate in diversi modelli animali di ischemia cerebrale.

Diversamente da quanto veniva generalmente accettato, le più recenti evidenze sperimentali dimostrano che l'effetto positivo esercitato dalle cellule staminali sarebbe dovuto principalmente al rilascio di fattori solubili, e non unicamente a processi di proliferazione e differenziamento neuronale.

Lo scopo principale di questa ricerca è stato di accertare *in vitro* se le NSC possano inibire l'attivazione microgliale provocata dall'ATP, tramite il rilascio di fattori solubili.

Per verificare tale ipotesi, è stato utilizzato come modello una coltura di cellule N9, una linea immortalizzata di microglia murina coltivata in presenza di terreni di coltura condizionati da NSC, provenienti da topi neonati di ceppo CD1.

E' noto che lo stimolo dell'ATP, quando applicato a diverse linee cellulari, determina un immediato incremento dei livelli citoplasmatici di Ca^{2+} mediante l'attivazione dei recettori purinergici della famiglia P2.

In una prima serie di esperimenti dose-risposta è stata individuata, mediante saggio fluorimetrico, la concentrazione minima di ATP in grado di provocare riproducibilmente il massimo rilascio di Ca^{2+} all'interno delle cellule N9.

Successivamente, le cellule N9 sono state pre-incubate per 1 ora o 3 ore, prima della stimolazione con ATP (0,1 mM), con terreni condizionati dalle NSC a diversi passaggi di

coltura (P2, P5 e P8). Come controllo sono state utilizzate cellule N9 pre-incubate in terreno per cellule staminali neuronali non condizionato (TNC).

I risultati ottenuti dimostrano che la pre-incubazione per 1 ora delle cellule N9 nei terreni condizionati da NSC era in grado di diminuire significativamente la liberazione di Ca^{2+} indotta dalla stimolazione con ATP ($29.54\% \pm 5.2$ di riduzione massima della mobilizzazione del Ca^{2+} intracellulare osservata $p < 0,05$)

Inoltre, l'effetto risultava ancora più evidente se la pre-incubazione veniva effettuata per 3 ore ($90.9\% \pm 4.9$ di riduzione massima, $p < 0,05$).

Durante l'evento ischemico le cellule microgliali rilasciano numerose citochine pro-infiammatorie, che concorrono a esacerbare il danno. Si è quindi voluto indagare, mediante RT-PCR quantitativa, se nelle cellule N9 attivate con ATP si verificasse una variazione dell'espressione genica di alcune molecole infiammatorie. Il trattamento delle N9 con ATP 1 mM per 3 ore è stato in grado di aumentare significativamente l'espressione dell'mRNA per TNF- α , IL-10 e COX-2. Abbiamo quindi verificato la capacità dei terreni condizionati da NSC di modificare la stimolazione da parte dell'ATP. L'effetto dell'ATP risultava significativamente ridotto se le cellule N9 venivano contemporaneamente incubate in terreni condizionati da NSC a diversi passaggi di coltura. La riduzione massima risultava del 58.6% per il TNF- α , il 48.09% per IL-10 e il 38.34% per COX-2 ($p < 0,05$).

Successivamente, con l'intento di valutare se i fattori liberati dalle NSC potessero avere un effetto protettivo anche sulla sopravvivenza cellulare, è stata studiata l'azione citotossica dell'ATP sulle cellule N9, mediante un saggio di vitalità cellulare con MTT. Il trattamento con ATP per 24 ore, alla concentrazione di 3 mM, determina una mortalità cellulare prossima al 90%. Queste condizioni sono state quindi utilizzate negli esperimenti successivi per valutare l'eventuale azione protettiva dei terreni condizionati da NSC. Le N9 sono state pre-incubate con terreni condizionati delle NSC per zero, tre o 24 ore, prima della stimolazione con ATP. La pre-incubazione di 24 ore proteggeva efficacemente le N9 dall'effetto citotossico dell'ATP, in quanto la sopravvivenza cellulare passava dal $5,16\% \pm 0,84$ al $30,69\% \pm 3,13$ ($p < 0,05$).

Poiché l'effetto citotossico di ATP nell'ambito dell'ischemia cerebrale si ripercuote anche sulle cellule neuronali cerebrali, abbiamo testato l'azione protettiva dei terreni condizionati da NSC verso la tossicità da ATP anche su una popolazione neuronale; le cellule di neuroblastoma Neuro2A.

La pre-incubazione per 24 ore delle Neuro2A in terreno condizionato P10 è stata in grado di aumentare la sopravvivenza delle Neuro2A stimulate con ATP 3mM per 24 ore dal $13.6\% \pm 0.65$ al $47.7\% \pm 2.39$ ($p < 0.001$). Questi risultati indicano che l'azione protettiva dei terreni

condizionati da NSC verso l'azione tossica di ATP non è specifica per le cellule microgliali, ma è attiva anche per i neuroni.

Sulla base dei risultati ottenuti, abbiamo voluto verificare se gli effetti antiinfiammatori osservati per la microglia valessero anche per altre cellule dell'infiammazione sensibili all'azione dell'ATP.

Anche in caso di danno ai nervi periferici occorre, infatti, la liberazione massiccia di ATP da parte del nervo lesa e s'innescano un'immediata risposta infiammatoria. Le cellule di Schwann, che compongono la guaina mielinica dei nervi periferici, subiscono la stimolazione da parte di ATP e tale stimolo concorre all'instaurarsi del dolore neuropatico.

Il dolore neuropatico è una patologia cronica caratterizzata da una forte componente infiammatoria e che non risponde alle terapie analgesiche. Recenti evidenze dimostrano che le cellule di Schwann rivestono un ruolo importante, insieme alla microglia, rispondendo allo stato infiammatorio con la produzione di mediatori. Abbiamo quindi deciso di verificare se anche in questo tipo cellulare i terreni condizionati avessero il medesimo effetto nella stimolazione della liberazione di Ca^{2+} intracitoplasmatico.

A questo scopo abbiamo utilizzato una linea di cellule di Schwann murine immortalizzate, le IMS32, e abbiamo evidenziato che, anche in queste cellule, l'esposizione ad ATP 0.1mM è in grado di attivare un'immediata liberazione di Ca^{2+} .

Analogamente a quanto osservato nelle cellule N9 i terreni condizionati da NSC hanno ridotto l'aumento di calcio intracitoplasmatico indotto da ATP. La riduzione massima, del 40%, è stata osservata dopo 24 ore di pre-incubazione con il terreno delle NSC.

Nell'ultima parte della nostra ricerca abbiamo invece studiato la capacità della microglia in influenzare il comportamento migratorio delle cellule staminali neuronali. Diverse evidenze sperimentali attestano che le NSC, in seguito a trapianto, sono capaci di migrare all'interno del parenchima cerebrale, in direzione del sito della lesione ischemica. In tale processo le cellule microgliali potrebbero rivestire un ruolo determinante, anche se non ancora del tutto chiarito.

Al fine quindi di individuare le molecole chemiotattiche prodotte dalle N9, abbiamo analizzato le variazioni dell'espressione dell'mRNA per alcune chemochine che sono indotte dalla stimolazione con ATP. Tra le chemochine analizzate, abbiamo osservato un aumento dell'espressione dell'mRNA per la monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), l'Interferon-Inducible Protein 10 (IP-10) e il Platelet Derived Growth Factor-b (PDGF-b).

Sulla base di questi dati, abbiamo pertanto voluto indagare il ruolo di MCP-1, poiché è dimostrato in precedenti studi, essere coinvolto con la chemoattrazione di cellule staminali.

A tale scopo, è stata messa a punto la tecnica dell'RNA interference, che consente di “spegnere” l'espressione genica per un target specifico. Dopo aver ottenuto una significativa riduzione (83%) dell'espressione dell'mRNA per MCP-1, abbiamo testato la capacità delle N9 silenziate per MCP-1 di aumentare l'entità di migrazione delle NSC in vitro.

A tale scopo è stato effettuato un esperimento di trasmigrazione in cui le NSC sono state caricate su una membrana porosa che permette il passaggio delle cellule in attiva trasmigrazione. Sul fondo della piastra contenente la membrana sono state seminate le cellule N9. Esse sono state stimulate con ATP 1mM e la piastra è stata incubata a 37°C per 4 ore per permettere alle NSC di trasmigrare attraverso la membrana porosa. I risultati da noi ottenuti confermano che la stimolazione delle N9 con ATP è in grado di aumentare (+ 86%) la trasmigrazione delle NSC; tale effetto può essere quasi completamente antagonizzato dal preventivo silenziamento genico di MCP-1 nelle cellule N9.

Questo risultato è indicativo del ruolo cruciale di MCP-1 nella stimolazione della migrazione delle cellule staminali neuronali da parte della microglia.

In conclusione i risultati di questa ricerca dimostrano che i terreni condizionati dalle NSC sono in grado di modulare la suscettibilità delle cellule N9 al trattamento con ATP in termini di liberazione del Ca^{2+} intracellulare, secrezione di molecole infiammatorie e citotossicità, confermando l'ipotesi del cross-talk tra i due tipi cellulari mediato da fattori solubili.

La chemochina MCP-1 riveste un ruolo importante nel meccanismo di richiamo da parte delle cellule microgliali, attivate con ATP, verso le cellule staminali neuronali.

Questi dati contribuiranno a chiarire quali sono le vie di comunicazione tra questi due tipi cellulari, cruciali per la comprensione dei meccanismi alla base della potenzialità terapeutica delle NSC nel cervello affetto da neurodegenerazione.

Inoltre è stata dimostrata la capacità dei terreni condizionati di migliorare la sopravvivenza cellulare verso la tossicità da ATP sia per le cellule microgliali che per le cellule neuronali. Ulteriori studi sono necessari per chiarire quali siano i fattori solubili responsabili di tali effetti.

INTRODUZIONE

L'INFIAMMAZIONE

L'inflammation è un meccanismo di difesa non specifico, innato, che costituisce una risposta protettiva dell'organismo conseguente all'azione dannosa di agenti fisici, chimici e biologici, e il cui obiettivo finale è l'eliminazione della causa iniziale di danno cellulare o tissutale. È caratterizzata dai classici segni di *rubor* (rossore), *calor* (calore), *tumor* (gonfiore), *dolor* (dolore) e *functio lesa* (compromissione funzionale), che originano dalle modificazioni presenti nelle strutture cellulari della zona colpita per arginare e riparare il danno.

Nonostante l'inflammation sia un processo localizzato, l'organismo partecipa *in toto* alla risposta, sia con modificazioni neuro-ormonali sia con l'attivazione del sistema linfo-reticolare; ciò comporta un aumento della flogosi e della produzione di anticorpi.

Il sistema immunitario è il sistema dell'organismo responsabile della risposta infiammatoria, ed è costituito da diversi tipi cellulari, tessuti e organi immunitari. Il sistema immunitario è formato da due componenti principali, una non specifica (immunità innata) e una adattativa (immunità acquisita). L'immunità innata è la prima ad attivarsi nel caso d'insulto e può difendere l'organismo in modo aspecifico da qualsiasi agente patogeno. La risposta adattativa, invece, difende l'organismo in maniera specifica da un singolo patogeno, si innesca più lentamente, e spesso richiede una seconda esposizione al medesimo antigene per essere attivata. La coordinazione e l'interazione tra queste due componenti immunitarie garantiscono il successo della risposta difensiva dell'organismo.

La risposta infiammatoria normale è un processo acuto che si risolve dopo la rimozione dello stimolo che la ha causata. Al contrario, quando la risposta infiammatoria progredisce, sia a causa di esposizione reiterata a uno stimolo, sia quando l'agente eziologico non è opportunamente rimosso, il processo diventa cronico.

A seconda del tessuto e della fase dell'inflammation in cui esso si trova, si ha l'attivazione di diversi tipi cellulari. Nei primi momenti dell'inflammation acuta si osserva una massiccia infiltrazione di granulociti neutrofili, che vengono poi rapidamente sostituiti dai monociti, cellule dotate di una maggiore capacità di sopravvivenza. I neutrofili costituiscono circa il 50-70% del numero totale di globuli bianchi; sono caratterizzati da un nucleo a forma di ferro di cavallo, segmentato in diversi lobi (caratteristica che li rende facilmente identificabili al microscopio). La loro azione consiste nel fagocitare i microorganismi patogeni che si possono insinuare negli spazi interstiziali, per impedire il diffondersi all'esterno del focolaio dell'inflammation; sono le prime cellule a penetrare nel tessuto infetto e spesso muoiono dopo aver compiuto un singolo evento fagocitico. Gli enzimi lisosomiali rilasciati dai neutrofili uccidono i microorganismi, ma possono causare danno tissutale e inflammation.

Nella fase successiva intervengono i macrofagi, che sono cellule mononucleate dotate di attività fagocitaria. Si distinguono i monociti (fagociti mononucleati del sangue) e i macrofagi (fagociti mononucleati residenti nei tessuti). Oltre alla capacità di fagocitare microorganismi patogeni, queste cellule sono importanti perché svolgono un ruolo nell'attivazione della risposta adattativa; in particolare sono in grado di presentare l'antigene alle cellule linfocitarie di tipo T, che sono responsabili della risposta citotossica contro l'agente patogeno e del mantenimento della memoria immunitaria.

I **macrofagi** derivano da cellule indifferenziate del midollo osseo, le cellule staminali emopoietiche, che, attraverso lo stadio di monoblasti e pro-monociti, si differenziano in monociti e, come tali, entrano nel circolo sanguigno. Nell'arco di 36-48 ore queste cellule migrano nei tessuti e nelle cavità sierose per diventare macrofagi fissi e macrofagi mobili. Oltre alle funzioni fagocitiche, i macrofagi possiedono una fondamentale funzione secretiva: sono, infatti, in grado di secernere diverse molecole con scopi differenti: 1) enzimi, tra cui collagenasi, elastasi, proteasi lisosomiali, attivatori del plasminogeno, che digeriscono le proteine extracellulari che compongono la matrice e sono essenziali per permettere la mobilità del macrofago; 2) sostanze coinvolte nei processi difensivi, come componenti del complemento, interferoni, lisozima; 3) fattori che regolano l'attività delle altre cellule del sistema immunitario, quali le citochine, che hanno il ruolo di attivazione cellulare e le chemochine che fungono da chemoattrattori per richiamare in loco altre cellule.

I fagociti mononucleati hanno nomi diversi e sono caratterizzati da piccole differenze, a seconda del tessuto di residenza. Tra questi, ci sono: 1) elementi di localizzazione endoteliale, come le cellule del Kupffer dei sinusoidi del fegato, le cellule che rivestono i seni linfatici dei linfonodi e i seni venosi della milza e del midollo osseo; 2) cellule reticolari dei tessuti linfatici; 3) cellule sparse nei tessuti di tipo connettivale, come le cellule migranti a riposo di Maximow e le cellule di Marchand (situate nella tonaca avventizia dei vasi); 4) macrofagi alveolari dei polmoni; 5) cellule della microglia nel sistema nervoso centrale; 6) macrofagi liberi nelle cavità sierose (nella pleura e nel peritoneo); 7) monociti del sangue, i precursori diretti dei macrofagi tissutali. Normalmente, i macrofagi dei tessuti non si moltiplicano, se non in condizioni di sovrastimolazione; essi hanno una durata di vita piuttosto lunga (anche più di 100 giorni) (Ekdahl, Claasen et al. 2003).

Una caratteristica importante dei macrofagi è la loro capacità di fagocitare corpi estranei. La captazione di materiale extracellulare può avvenire in due modi: a) attraverso la chemiotassi, i fagociti assumono una morfologia ameboide che permette loro di migrare verso le particelle da fagocitare, nelle zone ad alta concentrazione di fattori chemotattici rilasciati dai tessuti (come chinine, istamina e leucotrieni); b) attraverso il contatto casuale dei macrofagi residenti fissi con le particelle presenti nel circolo sanguigno e linfatico.

L'endocitosi del materiale avviene attraverso una trasformazione della membrana esterna del macrofago, che comprende l'emissione di estroflessioni digitiformi tentacolari, i cosiddetti pseudopodi, che sono in grado di circondare il materiale da fagocitare e successivamente di fondersi, formando vescicole (chiamate fagosomi) entro cui viene a trovarsi imprigionata la particella estranea. A questo punto, i granuli del macrofago (chiamati lisosomi) convergono sul fagosoma in formazione, si fondono con esso e scaricano il loro contenuto enzimatico nel lume del vacuolo contenente la particella.

Durante la fagocitosi i macrofagi vanno incontro ad un fortissimo aumento dell'attività metabolica: il consumo di ossigeno raddoppia e aumenta la formazione di perossido di idrogeno (H_2O_2) e ossigeno in forma anionica (O_2^-).

Il significato funzionale dell'aumento dell'attività respiratoria risiede nella reattività dei prodotti intermedi della riduzione dell'ossigeno che si formano nei macrofagi, tra cui principalmente si trovano i due composti sopracitati, il radicale idrossilico libero ($OH\cdot$) e l'ossigeno radicalico. L'effetto principale della presenza di queste specie reattive dell'ossigeno è la loro azione microbica, che si va a sommare all'azione degli enzimi idrolitici del fagosoma.

LA NEUROINFIAMMAZIONE

La neuroinfiammazione è un processo infiammatorio “citochina-mediato” che può essere provocato da un danno tissutale sistemico o, più spesso, associato a un danno diretto a carico del sistema nervoso centrale (SNC).

La neuroinfiammazione si differenzia dall'infiammazione per la scarsa presenza di vasi linfatici all'interno del parenchima cerebrale, per la mancanza di cellule endogene capaci di presentare l'antigene e per la presenza della barriera emato-encefalica, che riduce gli scambi di cellule immunitarie e mediatori dell'infiammazione con il circolo sanguigno. La persistenza nel SNC dei processi infiammatori può causare gravi danni al complesso neuronale fino a comprometterne l'integrità funzionale.

La neuroinfiammazione può avere diverse origini, sia **biologiche**, come l'ischemia, le infezioni batteriche, e il deposito di materiale biologico, sia **traumatiche**, come il trauma cranico. Tutte queste condizioni sono in grado di attivare nel SNC la risposta immunitaria innata.

L'ischemia è rappresentata da un'improvvisa riduzione di apporto di ossigeno e sostanze energetiche, causata da un trombo o da un embolo occlusivo in un'arteria che irrorava il cervello. Questo evento induce necrosi neuronale nella zona colpita che, a sua volta, attiva le cellule immunitarie residenti e le induce a richiamare leucociti dal circolo; queste cellule rimuovono il materiale necrotico e contribuiscono allo stato infiammatorio mediante la produzione di mediatori dell'infiammazione.

Il sommarsi di stimoli infiammatori a una condizione di necrosi può, da una parte, proteggere i neuroni sopravvissuti grazie all'azione fagocitica dei macrofagi residenti e periferici; ma può anche aggravare la situazione, a causa della forte presenza di stimoli neurotossici prodotti dalle cellule immunitarie stesse, che innescano un processo di stress ossidativo e portano a morte neuronale. Inoltre, nell'ischemia, si può verificare un evento emorragico nel parenchima cerebrale, in cui si riversano residui cellulari e proteici provenienti dal circolo, che sono in grado di stimolare la risposta immune.

Un'altra causa di neuroinfiammazione sono le infezioni batteriche o virali. Ad esempio, l'infezione da HIV è stata associata all'insorgenza di demenza, disordini cognitivi minori nell'adulto ed encefalopatia progressiva nel bambino. Nel cervello il retrovirus HIV infetta i macrofagi residenti, in primo luogo la sottopopolazione dei macrofagi perivascolari (Gartner and Liu 2002)

L'infezione può portare all'insorgenza di encefaliti, leucoencefalopatie, danno assonale, infezioni opportunistiche e morte neuronale. Tali eventi possono prescindere dall'espressione del genoma retrovirale nel cervello, mentre sembra predominante il ruolo svolto dall'attivazione della microglia e degli astrociti. Tale attivazione è conseguenza sia

dell'infezione acuta del virus, sia dello stato infiammatorio cronico sistemico e quindi dell'aumentato numero di macrofagi attivati, che penetrano dal circolo sanguigno del parenchima cerebrale.

Anche nell'infezione da proteina prionica (PrPsc) si osserva la presenza di microglia attivata intorno alle placche di precipitati di PrPsc. Il ruolo della microglia è tutt'ora oggetto di studio per fare luce sull'instaurarsi della malattia prionica e delle sue drammatiche conseguenze (Marella and Chabry 2004).

Il trauma cranico, dovuto ad un incidente o come esito di un intervento chirurgico, può generare uno stato infiammatorio che può risultare pericoloso per la sopravvivenza neuronale. Si distinguono due tipi di insulti da trauma cranico: l'insulto primario, causato dal trauma stesso, che è imprevedibile e causa danni cerebrali di solito irreversibili, e quello secondario, costituito da un processo reversibile che inizia dopo il trauma e che coinvolge l'azione del sistema immunitario, ma che può tuttavia essere previsto e modulato al fine di limitare i danni (Graham, Adams et al. 1995).

LE CELLULE DELLA NEUROINFIAMMAZIONE

Microglia

Le cellule microgliali rappresentano il 5-10% della popolazione cellulare totale del cervello. È una popolazione di derivazione ematopoietica: durante l'embriogenesi, infatti, una sottopopolazione di monociti migra nel sistema nervoso e si differenzia in macrofagi residenti. Le cellule di microglia sono costituite da un piccolo corpo cellulare e da lunghi processi affusolati dotati di lamellipodi che gli conferiscono una morfologia ramificata. Sono diffuse omogeneamente nel parenchima cerebrale e possono ritrovarsi adese ai neuroni, ma anche in corrispondenza di vasi sanguigni e libere nella materia grigia. Queste cellule sono interne alla barriera ematoencefalica e pertanto sono pronte a recepire e rispondere a eventuali danni alla barriera stessa.

La microglia è normalmente quiescente nel SNC, il soma cellulare resta immobile mentre le ramificazioni si muovono in continuo per monitorare l'ambiente circostante.

Il verificarsi di modificazioni dell'omeostasi nell'ambiente, come aumento delle proteine sieriche, tossicità da glutammato, aumento di purine (ATP, ADP) oppure presenza di lipopolisaccaride (molecola presente sulla membrana dei batteri GRAM-negativi) sono tutti stimoli in grado di attivare la microglia, mediante recettori e vie del segnale differenti.

Le cellule della microglia presenti nelle aree perivascolari esercitano inoltre la funzione di cellule presentanti l'antigene (APC) sulle cellule T mielina-specifiche, che si sono infiltrate nel SNC e che possono dare inizio così ai processi infiammatori. (Ransohoff and Perry 2009). Quando la microglia si attiva, passa da una morfologia ramificata ad una ameboide, i lamellipodi si ritraggono e la cellula assume capacità fagocitica, volta a eliminare eventuali residui di cellule morte o fagocitare batteri e virus. La microglia attivata ha come ruolo principale quello di promuovere e sostenere lo stato infiammatorio mediante la produzione di citochine, intermedi reattivi dell'ossigeno, proteinasi, fattori del complemento e chemochine. Tali mediatori infiammatori promuovono l'infiltrazione di cellule del sistema immunitario dal circolo ematico, il richiamo di altre cellule microgliali dalle aree circostanti e l'attivazione degli astrociti. Quando lo stimolo infiammatorio che ha scatenato l'attivazione viene a mancare, la microglia partecipa ai processi di soppressione dello stato infiammatorio con la produzione di citochine immunomodulatorie, come IL-15, e anti-infiammatorie, come IL-10; ritorna poi in stato di inattivazione, oppure va incontro ad apoptosi (Lee, Nagai et al. 2002; Garden and Moller 2006).

La microglia possiede anche una proprietà trofica, utile allo scopo di proteggere le cellule neuronali. Tale azione è mediata dalla produzione di fattori di crescita come GDNF, BDNF e NGF (Coull, Beggs et al. 2005).

L'attivazione microgliale e gli eventi neuroinfiammatori che ne conseguono sono indirizzati alla neuroprotezione e all'eliminazione della causa della mancata omeostasi. In realtà sia nelle malattie neurodegenerative a carattere cronico che negli eventi traumatici, come l'ischemia, un'incontrollata e persistente attivazione microgliale può avere effetti neurotossici e concorrere ad esacerbare il danno neuronale. Il bilancio tra azione neuroprotettiva e neurotossica della microglia è determinato da numerosi fattori, tra cui la natura dello stimolo scatenante e le interazioni che si instaurano tra la microglia, le altre cellule del sistema immunitario e la rete neuronale, per cui risulta troppo semplicistico categorizzare il ruolo della microglia in modo assoluto e sono certamente necessari ulteriori studi per far luce sui meccanismi che regolano questo duplice ruolo (Harry and Kraft 2008).

Numerose evidenze hanno dimostrato che la modulazione dell'attivazione microgliale, ed in generale dello stato infiammatorio nel cervello, sono in grado di migliorare la sintomatologia di molte condizioni patologiche e di diminuire il fenomeno della neurodegenerazione (Morganti-Kossmann, Rancan et al. 2002; McGeer and McGeer 2007; Gonsette 2008; Shie, Nivison et al. 2009). Sulla base di tali osservazioni l'attivazione microgliale rappresenta un potenziale target farmacologico per la cura delle malattie neurodegenerative.

Astrociti

Gli astrociti sono cellule caratterizzate da elaborate ramificazioni a simmetria radiale che conferiscono loro una forma stellata. Possono essere di tre tipi: **fibrosi**, localizzati soprattutto nella sostanza bianca e caratterizzati da processi lunghi e sottili; **protoplasmatici**, localizzati prevalentemente nella sostanza grigia e dotati di processi brevi e ramificati; **radiali**, disposti perpendicolarmente all'asse dei ventricoli. Una delle principali funzioni degli astrociti consiste nella costituzione della barriera ematoencefalica mediante l'avvolgimento con i loro processi dei capillari cerebrali. Essi contribuiscono all'integrità strutturale della barriera e partecipano agli scambi tra circolo sanguigno e parenchima cerebrale.

Gli astrociti sono importanti per le interazioni con i neuroni adiacenti, essi, infatti, rivestono le terminazioni sinaptiche, assicurando una normale eccitabilità neuronale grazie al mantenimento dell'omeostasi ionica extracellulare (Nagele, Wegiel et al. 2004).

Anche gli astrociti hanno la capacità di rispondere alle condizioni patologiche; in tali condizioni mettono in atto una serie di cambiamenti funzionali e strutturali che prendono il

nome di *astrogliosi*. Gli astrociti sono attivati dalle citochine prodotte dalla microglia e sono in grado a loro volta di produrre molecole pro-infiammatorie. In seguito dell'attivazione, gli astrociti cessano di esercitare le loro funzioni fisiologiche, esempio tra cui il tamponamento del rilascio neuronale di glutammato e potassio nello spazio extracellulare, una condizione che favorisce la depolarizzazione neuronale, un eccessivo influsso cellulare di calcio e quindi danno neuronale da eccitotossicità.

LE MOLECOLE DELLA NEUROINFIAMMAZIONE

Le citochine

Le citochine sono una classe di molecole a basso PM (8-80 kDa) che agiscono in modo integrato nella comunicazione cellulare. Oltre al ruolo principale di stimolare il fenomeno infiammatorio, hanno un ruolo nella promozione della crescita, sopravvivenza e differenziamento cellulare. Nel cervello sono espresse dalla microglia e dagli astrociti in seguito ad un insulto. Successivamente all'insulto ischemico, e allo stato infiammatorio che ne consegue, si osserva un aumento significativo della concentrazione di citochine pro e anti-infiammatorie volte a proteggere le reti neuronali dal danno cellulare. La loro azione però non sempre è positiva, e il loro ruolo in questo particolare tipo di insulto è ancora oggetto di studio (Wang, Tang et al. 2007).

Le IL-1 (*interleuchine-1*) sono tra le principali molecole effettrici dell'infiammazione, esse, infatti, rispondono a diversi stimoli infiammatori e sono presenti anche nelle patologie a carattere autoinfiammatorio. La famiglia delle Interleuchine 1 conta ben 11 ligandi attivi su diversi recettori specifici. Tra le diverse IL-1 ve ne sono alcune, come IL-1 β , che agiscono su recettori trans membrana e altre, come IL-33, che mediano risposte a livello nucleare agendo direttamente da fattori di trascrizione.

Le interleuchine capostipiti di questa sottofamiglia sono IL-1 α e IL-1 β . Esse sono sintetizzate da molti tipi cellulari tra cui monociti, neutrofili, epatociti e macrofagi tissutali, e la microglia. IL-1 α è sintetizzata nel citoplasma a partire da un precursore attivo, e una volta matura resta per la maggior parte legata alla membrana plasmatica. Una frazione è presente a livello nucleare dove agisce in modo autocrino.

IL-1 β , la più studiata che questa famiglia, si distingue dal tipo α perché è sintetizzato come pro-peptide inattivo ed immagazzinato in vescicole. Gli stimoli infiammatori, come lipopolisaccaride (LPS) e ATP, determinano la maturazione del pro-peptide ad opera dell'enzima ICE (interleukin converting enzyme, chiamato anche *Caspasi-1*) e la secrezione di IL-1 β riveste quindi un ruolo cruciale nella risposta rapida. IL-1 β subisce inoltre una significativa induzione dell'espressione genica. IL-1 β nel cervello è coinvolta nel meccanismo di induzione della febbre, insieme alla IL-6, e nell'attivazione di cellule T, macrofagi e astrociti. Nel SNC IL-1 β può mediare gli effetti neurotossici dovuti all'induzione di i-NOS e quindi di NO e di specie radicaliche dell'ossigeno.

La terza principale citochina di questa famiglia è IL-1Ra, essa lega i recettori per IL-1 β (IL-1R tipo I e II), ma non è in grado di attivarli, quindi agisce come inibitore specifico.

Nell'ischemia si osserva un rapido aumento di IL-1 β , sia per avvenuta liberazione delle vescicole sia per induzione della sua espressione (Wang, Tang et al. 2007). L'overespressione di IL-1Ra indotta in modelli animali ha evidenziato una riduzione della zona infartuata (Yang, Zhao et al. 1997; Mulcahy, Ross et al. 2003); inoltre, topi con bassa produzione di questa citochina mostrano un drammatico aumento del danno ischemico (Pinteaux, Rothwell et al. 2006). In accordo con questi dati, il trattamento con IL1beta ha indotto un peggioramento del danno. Tali osservazioni indicano chiaramente che IL1beta ha un ruolo importante nel determinare la gravità del danno ischemico. Tali risultati positivi hanno permesso l'inizio di trial clinici sul trattamento con IL-1Ra di pazienti affetti da ischemia cerebrale (Arend, Palmer et al. 2008; Dinarello 2009).

Il **tumor necrosis factor- α (TNF- α)** è considerato una citochina fondamentale nel processo infiammatorio; viene prodotto dai monociti-macrofagi, dalle cellule dendritiche e dai linfociti; nel cervello è prodotto da microglia e astrociti ed esercita un ruolo fondamentale nel dirigere la risposta immune. Esiste sia in forma transmembranaria che solubile, dopo il taglio da parte dell'enzima TACE (**TNF- α converting enzyme**). Il bilancio tra forma di membrana e solubile dipende dallo stato di attivazione della cellula ed è cruciale per la sua attività. TNF- α solubile agisce su recettori transmembrana (TNFR1 e TNFR2) che attivano diverse vie del segnale, tra cui la principale effettrice è quella che coinvolge il fattore di trascrizione NF- κ B, il quale regola positivamente la trascrizione di numerosi geni pro-infiammatori.

Nel sistema nervoso TNF- α media importanti funzioni tra cui l'attivazione della microglia e degli astrociti, la regolazione della permeabilità della barriera ematoencefalica, l'induzione dello stato febbrile, la trasmissione glutammatergica e la plasticità sinaptica (McCoy and Tansey 2008).

La sovraespressione di TNF- α ha effetti neurotossici: sono stati, infatti, misurati alti livelli di TNF- α nel siero di pazienti affetti da Alzheimer Disease, morbo di Parkinson e sclerosi multipla (Fillit, Ding et al. 1991).

Nell'ischemia cerebrale il TNF- α subisce un aumento di espressione, ma il suo ruolo in questo insulto è ancora oggetto di dibattito: evidenze ottenute in modelli animali dimostrano che il trattamento con farmaci inibitori del recettore TNFR1 determina una riduzione del danno ischemico, mentre altri studi hanno evidenziato che il trattamento con anticorpi anti-TNF- α , che non discriminano l'attività sui diversi recettori, porta ad una ridotta neurogenesi a livello

ippocampale. Tali osservazioni suggeriscono un diverso ruolo dei recettori per TNF- α . (McCoy and Tansey 2008).

IL-6 è anch'essa una citochina pro-infiammatoria prodotta da macrofagi, microglia, astrociti, linfociti T, fibroblasti, cellule endoteliali e cheratinociti.

Tra le sue principali funzioni vi sono l'induzione dello stato febbrile, la generazione e la coordinazione della risposta immunitaria. Inoltre, IL-6 è in grado di attivare i linfociti B e indurli a sintetizzare anticorpi. A differenza della IL-1, IL-6 possiede anche delle funzioni anti-infiammatorie, in particolare inibisce la sintesi di TNF- α e induce la sintesi dei recettori solubili per IL-1 e TNF- α , i quali diminuiscono la quota di citochine disponibili. Alti livelli serici di IL-6 sono stati misurati in pazienti affetti da ischemia acuta, e nei modelli animali, IL-6 è indotta in seguito a insulto ischemico nel SNC, in particolare nella regione periferica della zona ischemica. Essa ha un duplice ruolo: infatti, concorre sia al danno cerebrale sia a meccanismi riparativi che si esplicano mediante il legame di IL-6 con il recettore gp130, comune ad altre citochine con funzione neurotrofica (LIF). Sebbene nell'animale KO per IL-6 non sia stato osservato un significativo miglioramento del danno ischemico, altri studi riportano che l'iniezione diretta di IL-6 dopo l'induzione di ischemia determina una riduzione del danno. Queste osservazioni suggeriscono quindi un ruolo protettivo di IL-6 nell'ischemia cerebrale (Clark, Rinker et al. 2000; Suzuki, Tanaka et al. 2009).

IL-10 è una potente citochina anti-infiammatoria, prodotta prevalentemente da monociti-macrofagi, microglia e, anche se in minore quantità, dai linfociti. E' in grado di inibire l'espressione di citochine pro-infiammatorie, come TNF- α , INF- γ , IL-2 e IL-3. Nel cervello svolge un ruolo importante nel controllo dello stato neuroinfiammatorio. Si trova up-regolata dopo l'ischemia, prodotta dalla glia, ed esercita un'azione neuroprotettiva.

Gli animali KO per IL-10 sottoposti a ischemia focale mostrano una zona infartuata più ampia, e altri studi riportano che la somministrazione di IL-10 o la sua overespressione causa una riduzione del volume dell'infarto e dell'infiammazione (Planas, Gorina et al. 2006; de Bilbao, Arsenijevic et al. 2009).

Un'importante classe di mediatori della risposta infiammatoria è costituita dai *prostanoidi* (prostaglandine, prostaciclina e tromboassano), molecole che derivano dall'acido arachidonico. La loro sintesi avviene ad opera della *cicloossigenasi (COX)* o PGH-sintasi.

Esistono due isoforme di questo enzima: COX-1 e COX-2; esse mediano la stessa funzione catalitica, ma hanno ruoli fisiologici diversi. Infatti, l'enzima COX-1 è espresso

costituitivamente in molte cellule dell'organismo, tra cui neuroni, microglia e linfociti e svolge funzioni di mantenimento dell'omeostasi. COX-2 è invece espresso in modo inducibile in seguito ad uno stimolo pro-infiammatorio. Questi enzimi sono il principale target dei farmaci antiinfiammatori non steroidei (FANS).

L'espressione di COX-2 è indotta nell'ambito di molte patologie a carattere neuroinfiammatorio. Anche in seguito all'evento ischemico si osserva un aumento dell'espressione di COX-2 sia nella zona colpita da infarto che in regioni distali. Il ruolo di questi enzimi è principalmente protettivo, ma a lungo termine l'eccessiva produzione di prostaglandine ha effetti deleteri sul sistema nervoso centrale.

Recenti studi suggeriscono che il recettore della prostaglandina EP1 ha un ruolo nella neurotossicità indotta da ischemia. Inoltre numerose evidenze hanno dimostrato che il trattamento con inibitori di COX-2 migliora la sintomatologia dopo insulto ischemico. L'attività delle COX porta alla produzione di specie reattive dell'ossigeno, anch'esse accusate di peggiorare il danno, anche se recenti evidenze hanno mostrato che il ruolo negativo delle COX sia da imputare principalmente alle prostaglandine. (Miettinen, Fusco et al. 1997; Wang, Tang et al. 2007; Ahmad, Zhang et al. 2009)

Le chemochine

Le chemochine (chemotactic citokines) sono citochine a funzione prevalentemente chemotattica; fanno parte di una superfamiglia di proteine a basso PM (6-14 kDa), attive nel richiamo di varie popolazioni cellulari che partecipano alla risposta immune, come granulociti neutrofili ed eosinofili, monociti e linfociti, oltre che nei processi di migrazione cellulari che hanno luogo durante l'embriogenesi.

La famiglia delle chemochine può essere distinta in tre sottofamiglie caratterizzate da 2-4 residui cisteinici altamente conservati nella sequenza della molecola

Le famiglie principali di chemochine sono rappresentate dalle: **α -chemochine** (o CXC chemochine), che hanno i due residui cisteinici NH₂-terminali tra loro separati da un aminoacido non conservato (X); **β -chemochine** (o CC chemochine), che presentano due residui cisteinici giustapposti; e **δ -chemochine** (CX3C chemochine), che mostrano i due residui cisteinici separati da tre residui aminoacidici.

Le chemochine sono prodotte da una grande varietà di tipi cellulari, generalmente coinvolti nelle risposte flogistiche. Esse agiscono su più tipi cellulari, svolgendo numerose azioni descritte *in vitro* quali la chemiotassi, il rilascio di enzimi su depositi cellulari, la formazione di radicali dell'ossigeno, la formazione di mediatori lipidici e l'induzione dell'adesione all'endotelio o alla matrice extracellulare. (Rebenko-Moll, Liu et al. 2006)

Nei tessuti ischemici, diverse vie di segnale (come quella delle specie reattive dell'ossigeno, quella delle citochine, la cascata del complemento e il sistema di NF- κ B) possono regolare la sintesi delle chemochine, determinando un rapido aumento della loro concentrazione, seguito da infiltrazione leucocitaria e risposta infiammatoria immediata (Frangianni 2007).

Una delle chemochine più studiate appartiene alla famiglia delle CC chemochine ed è la **Monocyte Chemoattractant Protein-1** MCP-1/CCL2. CCL2 ha un ruolo fondamentale nell'attrazione dei monociti, delle cellule T e delle cellule NK; inoltre è implicata nelle malattie caratterizzate da infiltrazione monocitica. La sua espressione è stata documentata in molte malattie, come l'aterosclerosi, la sclerosi multipla, l'artrite reumatoide e la nefrite (Rollins 1996).

MCP-1 risulta avere anche effetti importanti nell'infarto, sull'attivazione e sul reclutamento dei macrofagi, sulla sintesi di citochine e sull'accumulo dei miofibroblasti. Questa chemochina può quindi esercitare i suoi effetti nelle prime ore dopo l'infarto attraverso meccanismi distinti, come il reclutamento dei monociti nel miocardio ischemico e la modulazione della differenziazione dei macrofagi, dell'attivazione dei fagociti e dell'espressione delle citochine (Chen, Hallenbeck et al. 2003).

L'up-regulation di MCP-1/CCL2 è stata osservata in associazione con risposte neuroinfiammatorie in modelli animali di ischemia cerebrale e nei tessuti del miocardio (Kakio, Matsumori et al. 2000; Che, Ye et al. 2001).

MCP-1 è responsabile della migrazione dei leucociti nel SNC in diverse condizioni patologiche. La sintesi di MCP-1 da parte degli astrociti e della microglia nel SNC regola l'aumento dell'influsso dei leucociti, che si verifica in seguito a danno assonale oppure in associazione a malattie neuroinfiammatorie, come l'encefalopatia autoimmune, un modello di sclerosi multipla indotta nel ratto (Huang, Han et al. 2000).

La famiglia delle CXC chemochine svolge invece un ruolo fondamentale nella regolazione della chemiotassi e nell'attivazione dei neutrofilii nei tessuti ischemici; ma sono comunque importanti nell'infiammazione indotta da infiltrazione di cellule Th1. Inoltre le CXC presentano effetti angiostatici ed effetti inibitori sulla migrazione dei fibroblasti (Waeckel, Mallat et al. 2005).

RANTES (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted oppure CCL-5) fa parte della famiglia delle CC-chemochine, viene prodotto da linfociti T circolanti CD8+, cellule endoteliali, fibroblasti, piastrine e nel cervello da microglia e astrociti. La sua funzione principale è il reclutamento dei leucociti nei siti infiammatori; attiva inoltre il rilascio, da parte degli eosinofili, delle proteine cationiche eosinofile. RANTES aumenta, inoltre, l'aderenza dei

monociti alle cellule endoteliali e supporta selettivamente la migrazione dei monociti e dei linfociti T che esprimono sulla superficie i marcatori CD4. Infine attiva i basofili e causa il rilascio di istamina.

L'aumento di espressione di RANTES è associato a moltissime patologie infiammatorie, e sembra avere un ruolo importante nella risposta antivirale (Appay and Rowland-Jones 2001). In seguito a stato infiammatorio a livello cerebrale, tra cui quello che si instaura durante l'ischemia cerebrale, RANTES viene contribuisce al reclutamento di cellule infiammatorie nel parenchima (Bona, Andersson et al. 1999) .

Il ***Platelet Derived Growth Factor (PDGF)*** è una chemochina isolata dalle piastrine e sintetizzata dai megacariociti come un fattore di crescita per il tessuto connettivo e le cellule gliali; la proteina biologicamente attiva è un dimero composto da due polipeptidi collegati chiamati A e B. Gli eterodimeri di PDGF sono espressi da una varietà di tipi cellulari, come macrofagi, cellule endoteliali, fibroblasti e cellule muscolari lisce. Il PDGF si lega alle proteine plasmatiche ed è coinvolto nei processi di riparazione delle ferite e nell'angiogenesi. Il PDGF stimola inoltre la proliferazione degli astrociti ed inibisce la prematura differenziazione delle cellule progenitrici; è inoltre coinvolto nello sviluppo del sistema nervoso centrale in quanto i recettori dell'isoforma PDGF-b sono espressi in molte aree del cervello. PDGF ha un ruolo nell'attivazione delle cellule staminali mesenchimali. Il PDGF-B e il suo recettore PDGFR- β sono espressi anche a livello neuronale, e un aumento di espressione di queste proteine è stato rilevato in cervelli post mortem di pazienti con ischemia. Il PDGF ha un ruolo nell'indirizzare e regolare il differenziamento di diverse cellule staminali, tra cui le cellule staminali neuronali presenti nella zona subventricolare e subgranulare, (Renner, Tsimpas et al. 2003; Andrae, Gallini et al. 2008; Schmidt, Koeder et al. 2009)

L'Interferon Inducible Protein (IP-10 o CXCL10) è un membro della famiglia delle chemochine CXC. L'IFN- γ induce l'espressione di IP-10 in diversi tipi cellulari, come monociti, cellule endoteliali, cheratinociti, fibroblasti e microglia.

L'IP-10 ha attività chemoattrattrice per i monociti e le cellule T nell'uomo e promuove l'adesione delle cellule T alle cellule endoteliali; inoltre *in vivo* è in grado di inibire l'angiogenesi e *dimostra* attività antitumorale (Dufour, Dziejman et al. 2002).

Nel cervello viene prodotto soprattutto dalla microglia e concorre a esacerbare lo stato infiammatorio e la sua neutralizzazione o deplezione risulta essere neuroprotettiva (Nie, Bernard et al. 2009).

La Neural Regeneration Protein (NRP) è una chemochina espressa nelle cellule staminali e nelle cellule gliali. Può indurre migrazione e proliferazione cellulare, promuovere la sopravvivenza neuronale e aumentare lo sviluppo dei neuriti; induce inoltre la differenziazione delle cellule staminali neuronali in neuroni. NRP esercita i suoi effetti sulla sopravvivenza neuronale attraverso la fosforilazione di ERK 1 e ERK 2, due chinasi citosoliche (Gorba, Bradoo et al. 2006).

L'ISCHEMIA CEREBRALE

Nel mondo occidentale, l'ictus cerebrale rappresenta la seconda causa di morte dopo l'infarto miocardico (10-12% dei casi), mentre risulta la causa principale di invalidità con notevoli costi sanitari e sociali. La popolazione più colpita è quella al di sopra dei 65 anni di età. L'ictus cerebrale può essere di tipo emorragico o ischemico, e quest'ultima tipologia comprende l'80% dei casi. L'ischemia cerebrale è originata da una diminuzione del flusso sanguigno al SNC, e può essere dovuta a eventi vascolari, come l'ipoperfusione da deficit di pompa cardiaca, o più spesso dall'occlusione di un vaso cerebrale a causa di un ateroma, embolizzazione e trombi. La regione del cervello colpita da ictus ischemico solitamente è localizzata in un singolo emisfero, quindi anche i sintomi sono lateralizzati: emiplegia, emianestesia, emianopsia, e afasia se risulta interessato l'emisfero dominante.

La zona immediatamente a valle dell'occlusione, chiamata **core**, presenta fenomeni di morte neuronale per necrosi nell'arco di pochi minuti, e negli ultimi anni sono stati evidenziati anche fenomeni di apoptosi e autofagia.

I neuroni sono molto sensibili alle variazioni di perfusione e ossigenazione. Un'irrorazione sanguigna insufficiente determina carenza di ossigeno all'interno delle cellule, perdita di fosforilazione ossidativa e diminuzione della produzione di adenosina trifosfato (ATP). Il calo di ATP, a sua volta, porta al blocco della pompa sodio-potassio, perdita di K⁺ e accumulo di Na⁺, con conseguente ritenzione idrica e edema cellulare.

Nelle ore successive all'insulto, l'applicazione di tecniche di neuroimaging (PET e risonanza magnetica) ha permesso di individuare, intorno alla zona del core, una zona di tessuto danneggiato a livello funzionale, ma non a livello strutturale. Questa zona è la cosiddetta **penumbra** ischemica, una regione vulnerabile dove si verifica ulteriore perdita neuronale nelle ore e nei giorni successivi all'evento. La penumbra rappresenta il *target* terapeutico principale di tutti gli interventi medici successivi all'insulto, essendo stato osservato che un'efficace neuroprotezione e il ripristino della funzionalità neuronale in questa zona sono direttamente correlati alla ripresa delle funzionalità motorie e cognitive.

L'approccio terapeutico nell'ischemia cerebrale anticoagulante prevede la somministrazione di tPA ricombinante, da effettuarsi il più precocemente possibile nei momenti successivi all'ischemia; altre terapie sono attualmente oggetto di sperimentazione in fase preclinica e clinica e sono indirizzate soprattutto a contrastare efficacemente la perdita neuronale nella penumbra (Donnan, Fisher et al. 2008).

L'importanza del ruolo dell'infiammazione nell'ischemia cerebrale è ampiamente dimostrata. La risposta infiammatoria nella zona della penumbra si instaura immediatamente in seguito all'insulto ischemico e permane per alcuni giorni (Fig.1).

La riperfusione dei tessuti, dovuta alla circolazione collaterale o al trattamento trombolitico, porta sangue ossigenato e causa la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) da parte delle cellule del sistema immunitario attivate. Tali specie reattive dell'ossigeno stimolano la produzione di citochine e chemochine, amplificando ulteriormente la risposta infiammatoria e quindi esacerbando la tossicità dell'ambiente extracellulare grazie alla di numerosi fattori, tra cui: molecole di adesione (ICAM-1), metalloproteasi (MMPs), nitrossido (NO), ROS, chemochine e citochine. Tutte queste sostanze contribuiscono al peggioramento del danno cellulare e pregiudicano l'integrità della barriera ematoencefalica (Wang, Tang et al. 2007; Kaushal and Schlichter 2008).

La necrosi presente nel core è il primo stimolo ad innescare tale risposta infiammatoria. La microglia, in particolare, si attiva a causa di una massiva liberazione di ATP e glutammato da parte delle cellule danneggiate o morenti.

Lo stato infiammatorio rappresenta uno dei principali target per la cura del danno post ischemico, poiché numerose evidenze hanno dimostrato che il trattamento con agenti antiinfiammatori, come la minociclina, determina una riduzione del volume della zona infartuata e migliorano i sintomi del danno neuronale (Tang, Wang et al. 2007; Morales, Ballesteros et al. 2008; Abulafia, de Rivero Vaccari et al. 2009).

In base a queste osservazioni sono stati sviluppati diversi modelli in vitro di privazione di glucosio e ossigeno (oxygen and glucose deprivation) volti allo studio dell'attivazione microgliale. Altri modelli utilizzano l'ATP come stimolo infiammatorio, allo scopo di chiarire i meccanismi coinvolti, i potenziali target per la cura dell'ischemia e di altre patologie neurodegenerative in cui si osserva liberazione di ATP (Suzuki, Hide et al. 2004; Chock and Giffard 2005).

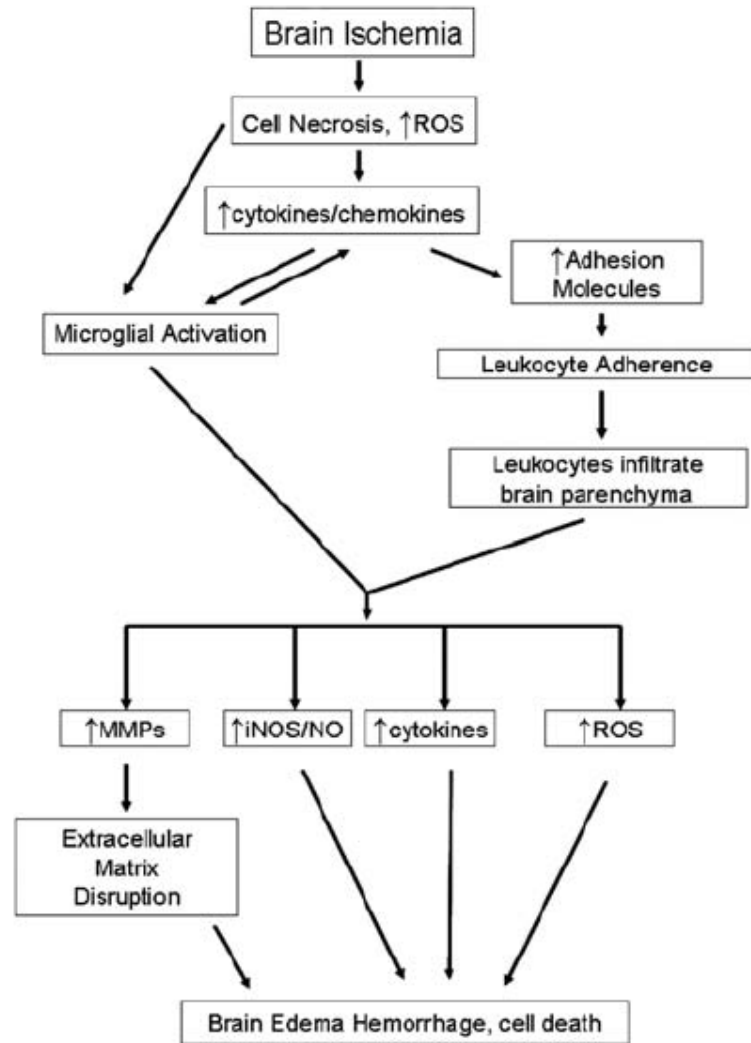


Fig.1 Meccanismi infiammatori nell'ischemia cerebrale (Wang, 2007 Journal of Neuroimmunology)

IL DOLORE NEUROPATICO

Il **dolore neuropatico** è una patologia del sistema nervoso periferico a carattere infiammatorio che si sviluppa in seguito a lesione dei nervi periferici a causa di interventi chirurgici, diabete, neoplasie o infezioni.

Il sintomo principale è un dolore patologico la cui caratteristica peculiare è di essere refrattario ai trattamenti farmacologici palliativi, come farmaci antidolorifici, antiinfiammatori e oppiacei. Il dolore neuropatico è spesso persistente, ha la tendenza a cronicizzare, e può portare a deficit senso-motori come *iperalgisia*, ovvero una percezione dolorosa esagerata rispetto alla normale percezione di uno stimolo doloroso, e *allodinia*, la percezione dolorosa in seguito ad uno stimolo normalmente non doloroso (Martucci, Trovato et al. 2008).

La terapia odierna è basata sulla somministrazione di farmaci antidepressivi, come i triciclici e gli inibitori selettivi del reuptake di serotonina (SSRI), e di farmaci oppioidi, come la lidocaina, che determinano però l'insorgenza di reazioni avverse ed effetti collaterali significativi. Queste terapie hanno esiti ancora del tutto insoddisfacenti (Freyenhagen and Bennett 2009).

Negli ultimi anni sono stati condotti numerosi studi basati su modelli sperimentali animali per cercare di meglio comprendere i meccanismi alla base di questa patologia, allo scopo di individuare nuovi e specifici interventi farmacologici. I risultati ottenuti indicano il coinvolgimento di elementi sia periferici che centrali nel mantenimento del dolore neuropatico (Sommer and Kress 2004).

Le cellule di Schwann, i macrofagi e le cellule gliali attivate hanno un ruolo fondamentale nell'istaurarsi del dolore neuropatico. Queste cellule sono in grado di istaurare lo stato infiammatorio mediante produzione, periferica e centrale di nitrossido (NO) e liberazione di citochine infiammatorie in seguito al danno ai nervi periferici. Queste molecole sono coinvolte in una cascata di eventi neuropatologici che ha origine nel sito di lesione periferico, per poi propagarsi verso il sistema nervoso centrale. L'infiammazione raggiunge, infatti, i gangli dorsali, con coinvolgimento dei neuroni DRG e della glia locale, fino a raggiungere il corno posteriore del midollo spinale e il talamo contro laterale, laddove terminano i nervi sensoriali secondari (Martucci, Trovato et al. 2008).

Un recente studio ha permesso di individuare una molecola, FP-1, con attività antagonista per il recettore toll-like di tipo 4 (TLR-4) espresso a livello microgliale. Questo recettore è il principale responsabile dell'attivazione del fattore trascrizionale NF- κ B, che promuove l'espressione di geni pro-infiammatori. L'utilizzo di FP-1 in un modello murino di dolore neuropatico ha significativamente migliorato l'iperalgisia termica e l'allodinia meccanica negli animali, gettando luce su un futuro utilizzo di FP-1 in terapia (Bettoni, Comelli et al. 2008).

Le **cellule di Schwann**, che costituiscono la guaina mielinica dei nervi periferici, rivestono un ruolo importante nella genesi del dolore neuropatico. La risposta immediatamente successiva alla lesione del nervo è mediata dalle cellule del sistema immune, in particolare da macrofagi residenti e circolanti. I granulociti neutrofili sono attratti da molecole chemoattrattive e si infiltrano nel sito di lesione. I macrofagi attivati e le cellule di Schwann denervate producono e secernono metalloproteasi che intaccano la lamina basale dei vasi endoneurali, provocando un'interruzione nella barriera che separa il nervo dal circolo ematico (Scholz and Woolf 2007). Inoltre, in seguito al danno del nervo le cellule di Schwann vanno incontro a dedifferenziamento e proliferazione, e producono citochine proinfiammatorie come IL-1, IL-6 e TNF- α (Watkins and Maier 2002; Adler, Nico et al. 2009).

IL RUOLO DI ATP NELL'INFIAMMAZIONE

L'adenosina trifosfato (ATP) è un nucleotide formato da uno zucchero pentoso, il ribosio, la base azotata adenina e tre gruppi fosfato. L'ATP svolge un ruolo fondamentale nella maggioranza delle reazioni metaboliche del corpo umano, in cui ha la principale funzione di molecola di scambio energetico. L'ATP esercita anche altre funzioni oltre quella energetica: agisce, infatti, come mediatore cellulare. Il concetto di signalling purinergico è stato proposto per la prima volta nel 1972 (Burnstock).

Nel cervello l'ATP agisce principalmente come neurotrasmettitore inibitorio sui recettori pre- e post-sinaptici di tipo P1 (A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃).

In condizioni di danno tissutale, l'ATP è rilasciato massivamente nel parenchima cerebrale dalle cellule danneggiate o morenti, tra cui i neuroni, le cellule gliali e le cellule endoteliali. Altri meccanismi sottendono il rilascio/trasporto di ATP al di fuori della cellula e sono ancora oggi argomento di dibattito. Tale rilascio produce un aumento della concentrazione di ATP nello spazio extracellulare nell'ordine del mM.

Le attività biologiche dell'ATP rilasciato nello spazio extracellulare sono molte e comprendono la stimolazione mitogenica, la trasmissione eccitatoria, l'induzione della morte cellulare, la regolazione della secrezione ormonale e la neuroinfiammazione. Recenti evidenze hanno inoltre dimostrato il suo ruolo nella proliferazione, differenziamento e morte cellulare (Burnstock 2008; Tu and Wang 2009).

L'alterata secrezione di ATP stimola le cellule della microglia a rilasciare citochine pro-infiammatorie, che esercitano effetti tossici sui neuroni. Alcuni studi riportano che nella microglia e nei neuroni l'ATP abbia un ruolo come attivatore della cascata del segnale della mitogen-activated-protein (MAP) chinasi. Questa via di segnale stimola la produzione, da parte della microglia, di citochine pro-infiammatorie e promuove la sopravvivenza cellulare ed il differenziamento in neuroni (Streit, Mrazek et al. 2004; Potucek, Crain et al. 2006).

I recettori purinergici

Gli effetti dell'ATP sulla microglia sono il risultato dell'attivazione dei recettori purinergici di tipo P2. Questi recettori sono presenti sia a livello centrale che periferico e sono espressi sia dai neuroni che dalle cellule gliali anche se in misura diversa.

Si individuano due principali famiglie di recettori P2: **P2Y**, recettori metabotropi a 7 domini transmembrana accoppiati a proteine G, e **P2X**, recettori-canale non selettivi (Inoue 1998).

Nei mammiferi sono presenti 8 recettori metabotropici P2Y (P2Y_{1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14}) accoppiati a proteine G di tipo Gi, G_{q/11} e Gs. I recettori P2Y_{2, 4, 6 e 11} sono accoppiati a proteine G_q e attivano la fosfolipasi C, con conseguente liberazione di calcio dagli store intracellulari. I recettori P2Y_{2, 4, 12, 13 e 14} possono accoppiarsi anche alla proteina Gi e mediare l'inibizione dell'adenilato ciclasi. P2Y è invece l'unico recettore che lega la proteina Gs e quindi l'unico della famiglia capace di attivare la via dell'adenilato ciclasi.

Altre vie del segnale che possono essere attivate da questi recettori sono: fosfolipasi A2, canali sensibili alle variazioni di Ca²⁺, protein chinasi C, e MAP chinasi (Potucek, Crain et al. 2006). La via delle MAP chinasi è attivata, oltre che in altri tipi cellulari, anche nella microglia.

I recettori **P2X** (P2X₁₋₇) sono canali ionici non selettivi, che permettono l'entrata di Na⁺ e Ca²⁺ e la fuoriuscita di K⁺. La loro attivazione determina inoltre la depolarizzazione cellulare.

I recettori P2X sono costituiti da due subunità transmembranarie con un loop extracellulare e i domini N e C-terminali intracellulari. Il recettore P2X₇ si differenzia dagli altri in quanto possiede un dominio C-terminale più lungo ed una minore affinità per l'ATP; infatti la sua attivazione avviene con concentrazioni di ATP superiori all'1mM, a differenza degli altri sottotipi che si attivano a concentrazioni più basse (< 100μM) (McLarnon 2005).

Il principale effetto dell'attivazione dei recettori P2X microgliali è l'entrata di calcio extracellulare (Fig 2). Questa drammatica variazione dell'omeostasi ionica è in grado di attivare diverse cascate del segnale tra cui quella della MAP chinasi.

Alcune evidenze indicano l'attivazione della P38-MAP chinasi, ad esempio da parte del recettore P2X₄ nella microglia dei corni dorsali di ratto (Inoue, Tsuda et al. 2004). Molti degli effetti di attivazione sulla microglia da parte dell'ATP sono mediati dai recettori P2X e in particolare dal recettore P2X₇ (Potucek, Crain et al. 2006).

Recenti studi hanno analizzato il rilascio di citochine infiammatorie in seguito a stimolazione con ATP della microglia primaria di ratto. Concentrazioni di ATP inferiori a 100 μM di per sé non sono in grado di indurre un aumento di rilascio di queste molecole, se non successivamente ad una pre-attivazione della microglia con LPS. Altre evidenze hanno invece

dimostrato che l'attivazione del recettore P2X₇, con concentrazioni di ATP >1mM, è in grado di aumentare il rilascio e l'espressione di citochine tra cui TNF- α , confermando il ruolo fondamentale del recettore a bassa affinità P2X₇ (Ferrari, Villalba et al. 1996; Hide, Tanaka et al. 2000; Ogata, Chuai et al. 2003).

La liberazione di ATP che si osserva in seguito a ischemia o, in generale, a danno neuronale ha anche un'azione tossica per le cellule neuronali e gliali circostanti. Il ruolo dei recettori P2 nel mediare tale tossicità è stato dimostrato grazie all'utilizzo di agonisti specifici, che sono in grado di causare lesioni in diverse aree cerebrali, mentre il trattamento con un antagonista recettoriale, come la suramina, è stato efficace nel ridurre tali danni a livello neuronale sia in vivo che in vitro (Kharlamov, Jones et al. 2002; Volonte, Amadio et al. 2003; Suzuki, Hide et al. 2004).

L'azione tossica dell'ATP sulla microglia è stata evidenziata dal gruppo di Di Virgilio. E' stato dimostrato che l'ATP esercita il suo effetto tossico ad alte concentrazioni (3 mM) sia sulla microglia primaria, sia su linee immortalizzate di microglia murina, e che P2X₇ ha un ruolo fondamentale in questo fenomeno (Ferrari, Chiozzi et al. 1997).

Questo recettore si distingue dagli altri recettori per la sua proprietà di formare un *poro* nella membrana plasmatica, che ne determina la depolarizzazione e la permeabilizzazione e quindi un disequilibrio nell'omeostasi e morte cellulare. Recenti evidenze hanno però messo in discussione queste osservazioni, mostrando che una volta attivato P2X₇ induce attivazione e proliferazione microgliale piuttosto che morte. Le condizioni che determinano il passaggio di P2X₇ dallo stato di canale a quello di poro non sono ancora state del tutto chiarite, così come resta da chiarire il significato del suo duplice ruolo (Ferrari, Villalba et al. 1996; Monif, Reid et al. 2009).

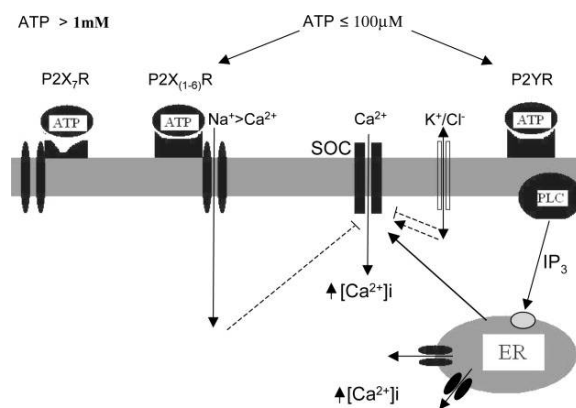


Fig.2 Schema della mobilizzazione del Ca²⁺ intracellulare da parte di ATP nella microglia umana (McLarnon 2005).

I recettori purinergici nell'ischemia cerebrale e nel dolore neuropatico

Negli ultimi anni l'interesse per il ruolo di ATP nell'**ischemia cerebrale** è andato sempre più crescendo. Alte concentrazioni di ATP, come già accennato, sono liberate dai neuroni danneggiati e tali concentrazioni hanno un'azione tossica sulla sopravvivenza neuronale. Nonostante le numerose evidenze raccolte negli ultimi anni, il ruolo dei recettori purinergici non è ancora stato del tutto chiarito.

Cavaliere riporta che in modelli animali modello di ischemia vi è un'associazione tra la morte neuronale e l'aumento di espressione dei recettori P2X₂ e P2X₄ nella corteccia cerebrale e nello striato, così come in colture di neuroni ippocampali. Inoltre, il trattamento con P2 antagonisti è in grado di prevenire la morte neuronale (Cavaliere, Florenzano et al. 2003).

E' stato dimostrato che l'ATP è in grado di attivare la microglia mediante il legame con i recettori purinergici di tipo P2 presenti sulla membrana plasmatica, e che questo fenomeno riveste un ruolo importante durante l'ischemia o in condizioni di deprivazione di ossigeno e glucosio (Cavaliere, Dinkel et al. 2005; Melani, Turchi et al. 2005).

Nel ratto sottoposto a occlusione dell'arteria mediana cerebrale (middle cerebral artery occlusion, MCAo) è stato osservato, dopo 24 ore dall'insulto, un aumento di espressione di P2X₇ sia nella microglia attivata nel sito del danno che nelle cellule microgliali reattive diffuse nel parenchima di entrambi i lobi cerebrali. Il trattamento con Reactive Blue-2, un antagonista P2 non selettivo, ha apportato miglioramenti dei sintomi deficitari. Inoltre ha aumentato l'espressione di P2X₇ nella microglia reattiva, lontana dal sito del danno primario, suggerendo un'azione protettiva di P2X₇ quando è espresso dalla microglia non ancora completamente attivata (Melani, Amadio et al. 2006).

Altri lavori mostrano che l'antagonismo specifico di P2X₇ con benzo-benzoil ATP causa l'esacerbazione del danno, suggerendo ancora una volta il ruolo protettivo di questo recettore (Yanagisawa, Kitamura et al. 2008).

Queste osservazioni contrastanti indicano che il ruolo dell'ATP e dei recettori purinergici nell'ischemia cerebrale non sia ancora stato completamente chiarito.

Il coinvolgimento della trasmissione purinergica nell'insorgenza del **dolore neuropatico**, ed in generale nella nocicezione, è stato ampiamente suggerito in questi ultimi anni.

I recettori purinergici coinvolti in questi fenomeni sono molteplici. Numerose evidenze indicano che l'attivazione del recettore P2X₄ ha un ruolo chiave nello sviluppo del dolore neuropatico.

In seguito a lesione periferica, l'espressione della proteina recettoriale è aumentata nella microglia spinale ma non in neuroni e astrociti; inoltre, l'eliminazione del gene mediante tecniche di knock-down ha portato ad un aumento dell'allodinia tattile.

Per contro, l'iniezione intratecale di microglia stimolata con ATP, che esprime i recettori purinergici, è in grado di produrre allodinia nel ratto sano (Inoue 2006).

Anche il recettore P2X₇ sembra essere direttamente coinvolto nella patogenesi del dolore neuropatico, così come in altre malattie infiammatorie. Chessell e collaboratori dimostrarono che, in topi KO per P2X₇, l'induzione del dolore neuropatico mediante legatura del nervo sciatico non provoca l'insorgenza di un'anormale risposta nocicettiva. Inoltre questi animali mostrano una compromissione nell'espressione di alcune citochine chiave come IL-1 β e IL-10, facendo pensare ad un ruolo chiave di P2X₇ nell'insorgenza del dolore patologico (Chessell, Hatcher et al. 2005).

Recenti evidenze indicano che il trattamento con il PPADS, un antagonista specifico dei recettori P2, in modelli animali di neuropatia, è efficace nel diminuire l'allodinia tattile e l'iperalgia termica in modo tempo e dose-dipendente. (Martucci, Trovato et al. 2008).

Anche i recettori metabotropi del tipo P2Y hanno un ruolo in questa patologia, sebbene la loro espressione sia localizzata soprattutto a livello dei neuroni DRG (Donnelly-Roberts, McGaraughty et al. 2008).

Pertanto la ricerca di strategie in grado di modulare il sistema purinergico al fine di bloccare lo stato neuroinfiammatorio nell'ischemia come nel dolore neuropatico è oggi molto attiva.

LE CELLULE STAMINALI

Con il termine cellula staminale si intende una cellula non specializzata e indifferenziata, capace di dare origine a cellule differenziate adulte. Le cellule staminali hanno la capacità di auto-rinnovarsi e di compiere un numero illimitato di cicli replicativi.

Le cellule embrionali, in particolare fino a 8 divisioni cellulari (stadio di morula), sono cellule staminali totipotenti, in quanto, possono originare tutti i tipi cellulari dei tessuti dell'organismo, compresa la placenta. Tuttavia la fonte di staminali embrionali (ES) maggiormente utilizzata è la blastocisti. In particolare, la massa interna della blastocisti contiene cellule staminali *pluripotenti* che, se prelevate e opportunamente coltivate, possiedono la potenzialità di generare tutti i tessuti dell'organismo adulto, meno l'organo placentare (Shannon 2001).

La possibilità di utilizzare queste cellule come risorsa per sostituire tessuti lesionati o deficitarii nell'organismo adulto ha generato molte speranze per la terapia di patologie gravi che oggi non hanno ancora cure risolutive, come ad esempio le lesioni spinali e le malattie neurodegenerative.

Esistono dei limiti di ordine tecnico per l'uso delle ES quali, in primo luogo, il rischio di produrre formazioni tumorali e il rigetto da parte del tessuto ospite (Loring, Porter et al. 2001). Tuttavia il maggiore limite per l'utilizzo di queste cellule è la questione etica: infatti, l'uso di ES implica necessariamente la distruzione di uno o più embrioni umani ed ha sollevato un grande dibattito sull'eticità del loro utilizzo. Ogni Paese ha adottato una propria legislazione a riguardo. In Gran Bretagna, ad esempio, la legislazione è più permissiva e la ricerca sulle cellule staminali embrionali umane è finanziata da fondi pubblici, mentre in altri Paesi come Germania, Austria e Italia questa pratica è vietata. In altri Paesi ancora, come l'Olanda, l'utilizzo di cellule staminali embrionali è permesso non solo a fini di sperimentazione, ma anche terapeutici.

Tali limiti hanno spinto verso la ricerca di nuove fonti di cellule staminali nell'adulto. Nonostante il differenziamento cellulare avvenga nel corso dello sviluppo embrionale, esso continua nel normale turnover cellulare e nei processi riparativi grazie all'esistenza delle cellule staminali adulte, che si ritrovano in diversi distretti dell'organismo. A differenza delle ES, le cellule staminali adulte hanno perso la caratteristica di pluripotenza: esse, infatti, sono "committed", ovvero indirizzate, attraverso la formazione di progenitori parzialmente differenziati, verso la generazione di cellule appartenenti ad un determinato tessuto (Tuan, Boland et al. 2003).

CELLULE STAMINALI NELLA TERAPIA

Le cellule staminali hanno la caratteristica di poter generare qualsiasi tessuto potenzialmente in quantità inesauribile; possono essere isolate e manipolate geneticamente, perciò gli ambiti terapeutici in cui si sta valutando l'efficacia del trattamento con cellule staminali sono molteplici.

L'utilizzo delle staminali è teso principalmente alla sostituzione o alla riparazione di tessuti danneggiati o senili: ad esempio, per ricreare lembi di pelle utili per i soggetti ustionati; per ricostruire *in vitro* organi destinati ai trapianti, dai vasi sanguigni alle ossa, dai tessuti corneali a tratti di muscolo; infine, per la rigenerazione dei tessuti colpiti da tumore, eliminando quindi i rischi di rigetto, poiché costituiti a partire dalle stesse cellule del paziente (Slayton, Li et al. 2007).

Numerosi studi condotti in modelli animali di patologie neurodegenerative hanno dimostrato che il trapianto di cellule staminali **embrionali** permette la rigenerazione dei tessuti danneggiati. Ad esempio, in modelli di morbo di Parkinson nella scimmia e nel ratto, il trapianto di cellule staminali embrionali nello striato ha determinato la rigenerazione dei neuroni dopaminergici danneggiati, contrastando così l'avanzamento della malattia (Bjorklund, Sanchez-Pernaute et al. 2002; Takagi, Takahashi et al. 2005).

Sulla scia dei dati positivi ottenuti nell'animale da esperimento, alcuni tentativi di trapianto di cellule staminali embrionali sono stati effettuati anche nell'uomo. Il trapianto di queste cellule nello striato e nei nuclei del Meynert in pazienti affetti da malattia di Alzheimer ha prodotto effetti positivi sui neuroni colinergici, che sono quelli maggiormente colpiti in questa patologia, grazie alla loro capacità di sopravvivere facilmente e a lungo nel cervello dell'ospite (Martinez-Serrano, Hantzopoulos et al. 1996).

Sebbene le cellule staminali embrionali possiedano un enorme potenziale di differenziamento in fenotipi neuroectodermici, la differenziazione *in vitro* presenta ancora alcuni aspetti critici. Come già accennato le ES possono originare teratomi e rigetto dopo l'impianto. In particolare, il rischio di sviluppare teratomi in seguito all'inserimento di nuovi geni in neuroni derivati da cellule staminali rappresenta un aspetto che merita di essere valutato approfonditamente.

Le cellule staminali **adulte** si ritrovano in numerosi distretti dell'organismo adulto.

Esse possono restare quiescenti nel tessuto di origine oppure andare incontro a due tipi di divisioni mitotiche: la **divisione simmetrica**, che dà origine a due cellule che mantengono le caratteristiche di staminalità; e la **divisione asimmetrica**, che porta alla formazione di una cellula staminale, identica alla cellula madre, e di una cellula progenitrice parzialmente

differenziata. La scelta tra i due tipi di divisione è dettata dai segnali presenti dell'ambiente extracellulare e quindi dalla necessità dell'organismo di ripristinare il pool di staminali piuttosto che di formare nuove cellule differenziate, pur mantenendo costante il numero di cellule staminali nel tessuto. Quando vi è tale necessità, i progenitori prodotti dalle cellule staminali vanno incontro a cicli di divisione successivi e ad ogni ciclo producono precursori sempre più "committed" fino a formare cellule completamente differenziate.

L'utilizzo delle cellule staminali adulte nella terapia è stato tentato in numerose patologie a carico dei diversi organi e di numerosi tipi di cellule staminali.

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

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

Recentemente, con grande entusiasmo della comunità scientifica, è stata sviluppata una nuova classe di cellule staminali: le ***induced pluripotent stem cells*** (iPS cells). Mediante l'introduzione di geni correlati all'embriogenesi è stato possibile far regredire cellule somatiche adulte, come fibroblasti, ad uno stadio di indifferenziamento paragonabile a quelle delle cellule staminali embrionali (Takahashi, Tanabe et al. 2007).

Le malattie neurodegenerative rappresentano un obiettivo d'eccezione nell'impiego delle cellule staminali, a causa della carenza di cure risolutive e dell'aumento di incidenza di tali patologie nella popolazione anziana.

Tra i tipi di cellule staminali più interessanti per il trapianto cerebrale ci sono soprattutto le **cellule staminali neuronali**, che sono presenti nel cervello in fase di sviluppo e adulto, e hanno la capacità di differenziarsi nelle principali popolazioni del sistema nervoso centrale: neuroni, astrociti e oligodendrociti (McKay 1997; Gottlieb 2002).

Le neural stem cells sono presenti anche nell'uomo sia nella vita embrionale che adulta, e queste cellule restano in uno stato di quiescenza all'interno della cosiddetta "nicchia neurogenica" nella zona subventricolare e subgranulare del giro dentato dell'ippocampo (SVZ e SGZ) (Sah, Ray et al. 1997).

Eriksson ha dimostrato che nel cervello adulto sono generati continuamente nuovi neuroni (Eriksson, Perfilieva et al. 1998), tuttavia il danno neuronale causato da malattia o da trauma

non può essere adeguatamente tamponato dalla neurogenesi spontanea, probabilmente a causa dell'inadeguatezza dell'ambiente cerebrale che si viene a creare (Kim and de Vellis 2009).

Le NSC possono essere prelevate dal cervello o generate a partire da cellule staminali embrionali, quindi possono essere coltivate e propagate in presenza di endothelial growth factor (EGF) e/o b-fibroblast growth factor (bFGF).

Le NSC crescono in cluster di proliferazione denominati neurosfere, che sono aggregati eterogenei contenenti cellule staminali, progenitori "committed" e cellule differenziate, tra cui soprattutto astrociti (Burns, Verfaillie et al. 2009).

Il trapianto di staminali neuronali e la possibilità di modificare il loro assetto genico per meglio adattarle alle esigenze del tessuto ricevente hanno gettato le basi per lo sviluppo di nuove terapie per le malattie a carattere neurodegenerativo.

Le NSC impiantate nel cervello possono agire attraverso diversi meccanismi, ovvero: stimolare la risposta plastica o l'attività neurale nel tessuto danneggiato dell'ospite, secernendo fattori neurotrofici che promuovono la sopravvivenza; ripristinare il rilascio di neurotrasmettitori sinaptici, che favoriscono la reinnervazione locale; infine possono integrarsi nelle preesistenti reti neurali e sinaptiche, ristabilendo quindi le connessioni afferenti ed efferenti. Tuttavia, il preciso meccanismo con cui le cellule staminali esercitano il loro effetto protettivo sulle cellule danneggiate non è ancora stato completamente chiarito (fig. 3) (Lindvall and Kokaia 2006).

Migrazione delle NSC nel cervello

Numerosi studi, tra cui quelli citati qui di seguito, hanno evidenziato la capacità delle NSC di migrare all'interno del parenchima cerebrale. Alcuni fattori chemiotattici di produzione astrocitaria e microgliale sono stati individuati come importanti nel richiamo delle cellule verso il sito di lesione (Belmadani, Tran et al. 2006; Rebenko-Moll, Liu et al. 2006; Kataoka, Tozaki-Saitoh et al. 2009), e in particolare è stato dimostrato il ruolo cruciale della microglia in tale richiamo (Aarum, Sandberg et al. 2003). Tuttavia, i meccanismi alla base di tale fenomeno sono ancora in larga parte sconosciuti e una loro miglior conoscenza permetterebbe di modulare e ottimizzare la migrazione delle cellule staminali nel trapianto terapeutico.

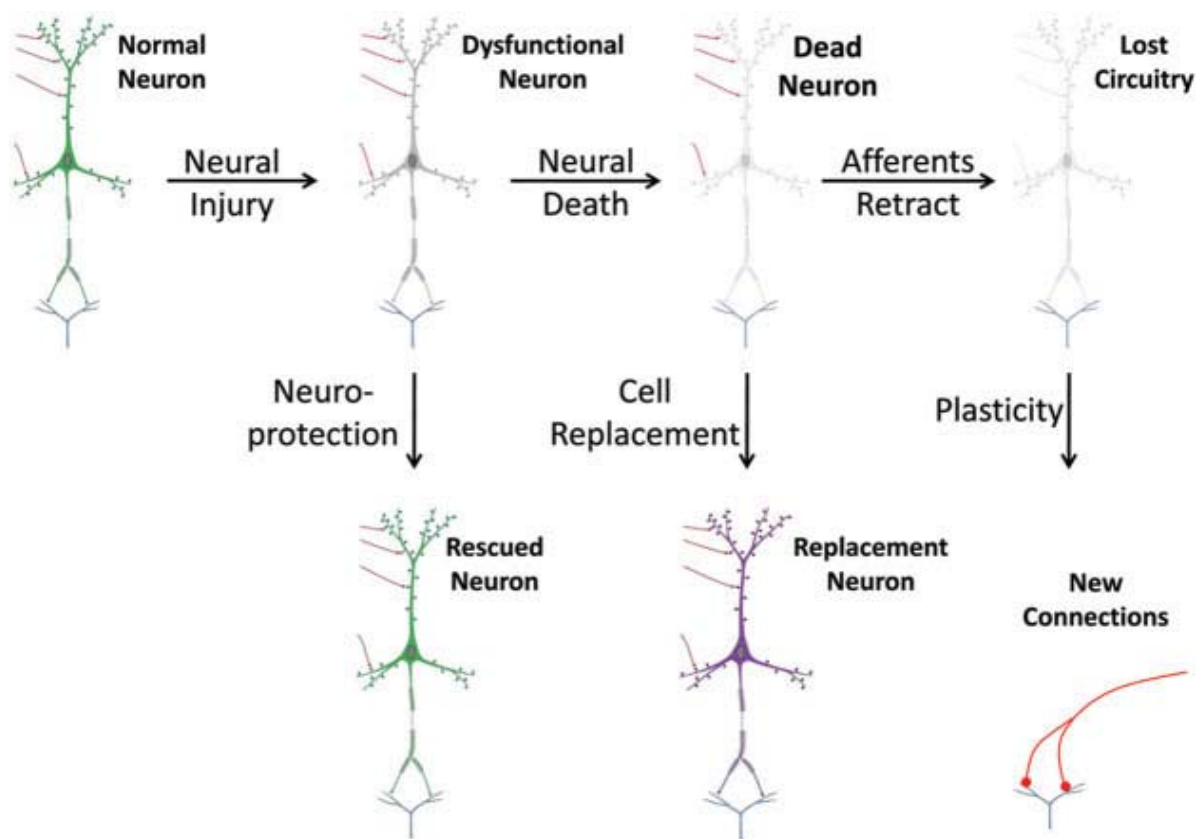


Fig. 3. Meccanismi d'azione delle cellule staminali esogene trapiantate in modelli animali di danno cerebrale. (Burns, Verfaillie et al. 2009).

Riportiamo di seguito lo stato dell'arte della ricerca di base e clinica nell'utilizzo del trapianto delle cellule staminali nelle principali malattie neurodegenerative.

La malattia di **Parkinson** (PD) è una delle malattie neurodegenerative per le quali sono stati fatti molti tentativi di trapianto nell'uomo. Il PD è una patologia cronica del SNC caratterizzata da danno progressivo delle funzioni motorie (tremore involontario e bradicinesia) conseguenti alla perdita dei neuroni dopaminergici della substantia nigra.

Sebbene siano stati individuati dei geni predisponenti per le forme familiari, le cause scatenanti la patologia idiopatica sono tutt'ora sconosciute. La cura d'elezione è rappresentata dalla somministrazione di L-DOPA, un precursore della dopamina, in grado di ripristinare il tono dopaminergico a livello centrale. Tale terapia non rappresenta però la soluzione definitiva, in quanto dimostra un'efficacia limitata nel tempo e i pazienti dopo pochi anni vanno incontro ad un progressivo deterioramento della sintomatologia.

A partire dagli anni '80 sono stati effettuati trapianti di materiale fetale nel cervello di pazienti. Il trapianto di tessuto fetale del mesencefalo umano si è dimostrato utile nel contrastare i sintomi del PD grazie alla normalizzazione della dopamina striatale (Lindvall, Brundin et al. 1990). L'uso di tessuto fetale però portava a problemi di ordine etico-religioso sia per l'approvvigionamento dei tessuti che in seguito a un'efficacia del trattamento molto variabile da paziente a paziente.

In seguito la ricerca si è quindi incentrata sul trapianto di cellule neuronali con fenotipo dopaminergico. Alcuni gruppi eseguirono il trapianto di neuroni dopaminergici derivanti da precursori di tessuto cerebrale fetale. Questi neuroni furono in grado di integrarsi nelle reti neuronali e di migliorare i sintomi in un modello di PD nel ratto (Studer, Tabar et al. 1998; Polgar, Morris et al. 2003).

Sulla scia di questi risultati furono effettuati trapianti di neuroni dopaminergici in pazienti. Nel cervello umano i neuroni non erano però in grado di secernere dopamina in modo costitutivo e nei pazienti trapiantati insorsero discinesia, risposta immune e infiammazione cronica (Freed, Greene et al. 2001; Olanow, Goetz et al. 2003).

Molti gruppi si sono occupati del trapianto di cellule staminali in modelli animali di PD per studiare quali fossero i meccanismi alla base di tale insuccesso.

Nell'animale da esperimento i trapianti di cellule staminali embrionali e mesenchimali hanno entrambi dato risultati incoraggianti; in particolare le staminali mesenchimali sembrano promuovere il recupero funzionale mediante la produzione di fattori trofici. Un altro studio, invece, sembra indicare che le MSC siano in grado di indurre proliferazione nelle cellule staminali neuronali endogene (Hou and Hong 2008).

Anche le cellule staminali neuronali (NSC) sono state ampiamente oggetto di trapianto in modelli animali. Il trapianto di NSC nel cervello di modelli murini di PD è risultato efficace nell'attenuare i deficit funzionali e anatomici, grazie al rilascio di neurotrasmettitori specifici, alla produzione di fattori neurotrofici e al ripopolamento cellulare (Kim and de Vellis 2009).

Nel 2006 fu eseguito uno xenotrapianto di cellule staminali neuronali derivanti da tessuto fetale suino, nello striato lesionato di ratto. Le NSC sopravvissero per cinque mesi e furono in grado di integrarsi nella rete neurale (Harrower, Tyers et al. 2006).

Alcuni interessanti studi hanno visto l'uso di primati come modello di PD: Sladek et al impiantarono NSC umane in un modello di scimmia. Anche in questo caso le cellule furono in grado di ristabilire un ambiente striatale normale (Bjugstad, Redmond et al. 2005).

Nel lavoro di Redmond le cellule staminali umane trapiantate in primati furono in grado di sopravvivere e migliorare anch'esse la sintomatologia, ma si evidenziò che solo una piccola parte delle cellule si era differenziata verso un fenotipo dopaminergico, mentre la maggior parte aveva sviluppato un fenotipo astrocitario, ad indicare come l'effetto positivo del trapianto fosse da imputare a modificazioni del microambiente piuttosto che della restaurazione delle reti neurali dopaminergiche (Redmond, Bjugstad et al. 2007).

Un'altra patologia neurodegenerativa su cui è molto attiva la sperimentazione per il trapianto cellulare è la malattia di **Alzheimer** (AD). Si tratta di una malattia cronica e progressiva, in cui la costante perdita neuronale, soprattutto a livello dei neuroni colinergici ippocampali, porta a danno cognitivo ingravescente. La presenza di placche senili di peptide β -Amiloide nel parenchima cerebrale e di tangles neuro fibrillari intracellulari, sono i sintomi anatomici caratteristici della malattia. Tali strutture sono però riscontrabili solo nei cervelli post-mortem e durante la vita la sintomatologia è sovrapponibile a quella di altre forme di demenza, come la demenza frontotemporale.

Una cura definitiva dell'AD non è ancora disponibile, sebbene negli ultimi decenni gli studi sulla sua eziopatologia abbiano fatto molti progressi. Il trattamento con farmaci inibitori dell'acetilcolinesterasi e con fattori neuroprotettivi permette di alleviare solo temporaneamente i sintomi.

Il trapianto di cellule staminali neuronali in modelli animali di AD è stato effettuato in molti studi; Qu e colleghi, ad esempio, hanno dimostrato che il trapianto di NSC umane è in grado di migliorare i sintomi dell'AD nel ratto (Qu, Brannen et al. 2001), mentre il gruppo di Wu ha dimostrato che le cellule staminali neuronali umane possono generare, nel cervello di ratto, neuroni colinergici in regioni specifiche (Wu, Tarasenko et al. 2002).

Neurosferi derivanti da ES sono state trapiantate in un modello murino di lesione della corteccia frontale, ed è stato dimostrato che esse sono in grado di sopravvivere, migrare e differenziare in neuroni colina-acetiltransferasi positivi. In questi animali, la memoria di lavoro, compromessa dalla lesione corticale, è risultata significativamente migliorata (Wang, Matsumoto et al. 2006).

Tutti questi risultati mostrano che il trapianto con NSC è in grado di migliorare i sintomi dell'AD e possiede quindi un enorme potenziale terapeutico. Tuttavia, la sperimentazione è ancora limitata al modello animale, in quanto ci sono ancora molti problemi da risolvere prima di passare al trattamento nell'uomo. La dose delle cellule, il target anatomico, ad esempio, sono ancora da definirsi; inoltre, non è noto quanto l'effetto positivo si protragga nel tempo (Hou and Hong 2008).

L'**ischemia cerebrale**, come già accennato, è un trauma caratterizzato da una massiva perdita neuronale. La terapia volta a limitare il danno neuronale è principalmente basata sulla somministrazione di t-PA ricombinante entro 90 minuti dall'insulto. Questo limite temporale fa sì che il numero di pazienti che riescono a beneficiare degli effetti protettivi del t-PA ed evitare i deficit neurologici a lungo termine sia ancora molto basso.

Il progredire delle tecniche di endovascolarizzazione ha permesso di aumentare la sopravvivenza, ma queste tecniche non sono ancora state supportate da un'adeguata ricerca clinica (Burns, Rodriguez et al. 2008).

La capacità rigenerativa e neuroprotettiva delle cellule staminali può rivelarsi utile sia nella fase acuta sia nei periodi successivi all'evento ischemico, laddove le terapie convenzionali non possono essere efficaci (Burns, Verfaillie et al. 2009).

Negli ultimi anni sono stati effettuati anche in clinica diversi tentativi di trapianto di cellule staminali. In uno di questi è stata studiata la fattibilità e la sicurezza del trapianto di cellule neuronali umane in 12 pazienti colpiti da ischemia nei 6 mesi-6 anni precedenti.

Non si sono verificate reazioni avverse e i parametri di valutazione della funzionalità neuronale sono risultati aumentati. Nel 2005 questo studio passò alla fase clinica II con risultati incoraggianti, ma ancora non definitivi (Kondziolka, Wechsler et al. 2000; Kondziolka, Steinberg et al. 2005).

Nel 2005 è stato eseguito il primo trapianto autologo con cellule staminali mesenchimali in pazienti ischemici (Bang, Lee et al. 2005). Dei 30 pazienti considerati, solo 5 ricevettero un'iniezione intravenosa con 100 milioni di MSC autologhe. Anche in questo trial si sono verificati dei miglioramenti del deficit neurologico nel gruppo ricevente MSC senza l'insorgenza di importanti eventi avversi.

I risultati ottenuti nell'uomo non possono però ancora prescindere dallo studio nel modello sperimentale animale, poiché occorre chiarire i meccanismi alla base dei fenomeni osservati.

Il modello animale maggiormente utilizzato è l'occlusione dell'arteria cerebrale mediana (MCAO) e il successivo trapianto di una tra le principali popolazioni di cellule staminali: ESC, MSC, e NSC. In molti studi sono state utilizzate cellule staminali in precedenza modificate mediante l'introduzione di geni esogeni, o mediante modificazioni che permettessero di seguirne il comportamento migratorio e proliferativo nel cervello dopo il trapianto.

In generale i risultati sul trapianto di cellule staminali nei modelli animali di ischemia sono positivi, ma molti aspetti dei protocolli di trapianto restano ancora da chiarire.

Ad esempio è molto importante definire quale sia il momento ottimale per effettuare il trapianto. Questo parametro non è ancora stato definito con chiarezza, in quanto la risposta infiammatoria e l'attivazione dell'apoptosi che si verifica nelle ore immediatamente successive all'insulto sembra essere un fattore limitante per la crescita e la sopravvivenza delle cellule trapiantate e delle cellule staminali endogene (Locatelli, Bersano et al. 2009).

Riportiamo di seguito alcuni risultati importanti ottenuti con il trapianto di cellule staminali neuronali in modelli animali di ischemia.

Nel 2000 Park pubblicò i primi dati sul trapianto di NSC in un modello murino. Egli dimostrò l'integrazione delle cellule nel sito di lesione, una limitata proliferazione e soprattutto l'aumento dei meccanismi di self-renewal endogeni (Park 2000).

Il gruppo di Kelly effettuò, nel 2004, il trapianto di NSC derivate da neurosfere umane in ratto dopo 7 giorni dall'induzione dell'ischemia, e le cellule sopravvissero per 4 settimane sia nei ratti MCAO che nei controlli. Le cellule migrarono all'interno del parenchima cerebrale concentrandosi intorno al sito di lesione, mentre nei ratti di controllo migrarono radialmente, senza alcuna direzione precisa, rispetto al sito di iniezione. Le NSC hanno evidenziato un differenziamento soprattutto verso il tipo neuronale (Kelly, Bliss et al. 2004).

Nel 2006 Hayashi eseguì il trapianto di NSC, generate da staminali embrionali di scimmia, in un modello murino 24 ore dopo l'evento ischemico. Anche in questo caso le cellule si localizzarono intorno al *core* ischemico e furono in grado di differenziarsi. Le cellule proliferarono soprattutto dai 14 ai 28 giorni successivi al trapianto e formarono nuove reti neurali funzionali (Hayashi, Takagi et al. 2006).

Recentemente il gruppo di Daadi ha dimostrato l'efficacia del trapianto di neural stem cell SD56 umane, derivanti da staminali embrionali, in un modello di ischemia e un recupero funzionale dopo 2 mesi dal trapianto (Daadi, Maag et al. 2008).

In una ricerca eseguita presso l'Istituto Mario Negri di Milano, l'azione delle NSC, ottenute da topi CD-1 neonati, è stata studiata in un modello murino di ischemia indagare se la risposta all'infiammazione da parte delle NSC possa essere favorita dagli eventi che avvengono dopo il danno ischemico

Le NSC sono state impiantate nel cervello dei ratti quattro ore dopo l'evento ischemico. A distanza di una settimana, i ratti trattati con NSC hanno mostrato un miglioramento della sintomatologia in termini di attività sia motoria che cognitivo-comportamentale. In aggiunta, il trattamento con le NSC ha determinato anche una diminuzione della neurodegenerazione nello striato e nella corteccia.

Le NSC trapiantate nel ventricolo laterale sono state in grado di migrare verso il sito della lesione; tuttavia il loro effetto protettivo non è da imputare a differenziamento o sostituzione cellulare, ma probabilmente ad interazioni tra le NSC e l'ambiente cellulare. Infatti la permanenza di tali cellule nel sito della lesione si è conclusa nell'arco di due settimane, suggerendo la possibilità che l'ambiente ischemico abbia perso la capacità di promuovere la loro sopravvivenza, anche se l'effetto protettivo sulla sopravvivenza dei neuroni permane più a lungo (Capone, Frigerio et al. 2007).

L'ipotesi che le cellule staminali neuronali, così come altri tipi di staminali, abbiano una funzione immunomodulatoria ha preso sempre più piede negli ultimi anni ed è stata supportata da diversi studi. Lee e collaboratori hanno dimostrato l'azione immunomodulatoria delle NSC in un modello murino di ischemia emorragica e in un modello in vitro di microglia stimolata con lipopolisaccaride (Einstein and Ben-Hur 2008; Lee, Chu et al. 2008; Taupin 2009).

Anche per la cura del **dolore neuropatico** sono stati fatti alcuni tentativi di terapia mediante trapianto cellulare, anche se per questa patologia la ricerca in questo ramo è ad uno stadio meno avanzato rispetto alle altre patologie riportate.

Una particolare forma di dolore neuropatico centrale può sopraggiungere in seguito a trauma del midollo spinale. Numerosi tentativi di curare, non soltanto i deficit motori, ma anche il dolore cronico sono stati fatti in animali modello di **spinal cord injury (SCI)**.

Nei primi tentativi di trapianto cellulare intraspinale per la cura del dolore neuropatico sono state utilizzate cellule surrenali cromaffini umane. Queste cellule avevano la funzione di secernere sostanze ad azione antinocicettiva nel midollo spinale. Questi studi, dapprima nell'animale e poi in clinica, hanno permesso di osservare che il trapianto nello spazio intratecale è sicuro e permette la sopravvivenza cellulare.

In seguito, a causa di problemi relativi alla scarsa omogeneità nella secrezione di tali sostanze antalgiche e della difficoltà di approvvigionamento di cellule, l'interesse si è spostato su altri tipi

cellulari: i precursori neuronali o surrenali. In queste cellule, le proprietà antinocicettive sono state indotte in vitro grazie all'induzione di un fenotipo neuronale o cromaffine (Eaton 2004).

Nel 2006 il gruppo di Hendricks ha, invece, studiato gli effetti del trapianto di cellule staminali embrionali, pre-differenziate in vitro in progenitori gliali e neuronali, in un modello murino di danno spinale caratterizzato da eccitotossicità.

Il trapianto è stato in grado di attenuare l'insorgenza del dolore in tempi molto brevi. Tra gli effetti osservati c'è stata una immediata neuro protezione e un effetto antinocicettivo durevole nel tempo. (Hendricks, Pak et al. 2006).

Nell'ambito del **dolore neuropatico periferico** il gruppo di Klass ha effettuato, invece, il trapianto di cellule staminali mesenchimali in un modello di costrizione cronica del nervo sciatico nel ratto. Cellule mononucleate prelevate dal midollo osseo sono state infuse per via endovenosa. L'end-point considerato era l'ipersensibilità, misurata mediante test di latenza nella ritrazione della zampa sottoposta a stimoli termici e meccanici.

Il trapianto non è stato efficace nel prevenire l'insorgenza del dolore neuropatico, ma nei ratti trattati con le cellule staminali dopo 10 giorni dalla legatura del nervo la sensibilità verso lo stimolo doloroso è risultata significativamente ridotta rispetto ai ratti non trattati (Klass, Gavrikov et al. 2007).

In conclusione possiamo affermare che il trapianto di cellule staminali, in particolare le cellule staminali neuronali e mesenchimali, ha delle enormi potenzialità nella cura delle malattie degenerative sia nel sistema nervoso centrale che periferico.

Il quadro variegato dei risultati fino ad oggi ottenuti, sia in clinica che nella ricerca di base, indica chiaramente la necessità di indagare ulteriormente molti aspetti alla base degli effetti positivi di questa terapia.

Occorre ricordare che al momento della sua nascita la terapia del trapianto con cellule staminali ha prodotto molte aspettative in milioni di pazienti, per poi rivelare la sua inaspettata complessità.

Bisogna inoltre tenere presente che esistono Paesi, come la Cina, che oggi forniscono questo tipo di terapie senza rispondere ai criteri di sicurezza ed efficacia universalmente accettati dalla comunità scientifica occidentale, attirando molti pazienti che versano in condizioni disperate.

La comunità scientifica ha quindi il compito di esplorare questa complessità per permettere, in futuro, l'accesso a queste terapie in modo rispondente ai criteri di efficacia e sicurezza.

SCOPO DELLA TESI

Negli ultimi decenni, parallelamente alla costante crescita delle aspettative di vita, si è registrato un aumento significativo dell'incidenza delle ischemie cerebrali e delle malattie neurodegenerative. Si calcola infatti che attualmente in Italia l'ischemia cerebrale rappresenti la terza causa di morte e la prima di invalidità permanente e che il numero di persone afflitte da patologie di tipo neurodegenerativo sia in costante aumento.

Queste patologie, seppur eterogenee per caratteristiche eziopatogenetiche e funzionali, sono accomunate dalla degenerazione di una o più funzioni nervose, che originano da un danno neuronale. Il danno e la morte neuronale che ne consegue, sono a loro volta responsabili del processo di neuroinfiammazione, il cui scopo primario dovrebbe essere quello di proteggere i neuroni sopravvissuti.

Le cellule principalmente coinvolte nel mantenimento e nell'amplificazione dello stato neuroinfiammatorio, mediante la produzione di molecole pro-infiammatorie quali citochine e chemochine, sono quelle della microglia. Tuttavia, un'attivazione microgliale prolungata e incontrollata è dannosa per i neuroni e quindi l'inibizione dello stato neuroinfiammatorio prolungato costituisce oggi un target di strategie per limitare il danno neuronale.

Per identificare nuove procedure utili a ripristinare le reti neurali danneggiate, in questi ultimi anni molti studi si sono focalizzati anche sul trapianto cerebrale di cellule staminali neuronali (NSC). Le cellule staminali neuronali rappresentano un'importante possibilità terapeutica per la loro capacità di proliferare e differenziarsi in cellule specializzate all'interno del parenchima cerebrale. Tuttavia, non è ancora stato accertato se gli effetti positivi grazie segnalati in seguito al trapianto di NSC nel cervello sia da attribuire unicamente alla capacità delle NSC di proliferare e differenziare in cellule neuronali, piuttosto che a un'azione esercitata dalle cellule stesse sull'ambiente circostante mediante il rilascio di fattori solubili.

Lo scopo di questa ricerca è verificare se le NSC siano in grado di modulare l'attivazione microgliale provocata dall'ATP, mediatore cerebrale rilasciato massivamente dai neuroni lesionati.

Per verificare tale ipotesi, sarà utilizzato un modello *in vitro* in cui le cellule N9, una linea cellulare di microglia murina immortalizzata, saranno coltivate in presenza di terreni di coltura condizionati da NSC, ottenute da topi neonati di ceppo CD1.

Gli effetti dell'incubazione dei terreni condizionati da NSC saranno valutati su diversi aspetti della funzionalità cellulare. Dapprima, mediante saggio fluorimetrico, in una serie di esperimenti dose-risposta sarà individuata la concentrazione minima di ATP in grado di provocare riproducibilmente il massimo rilascio di Ca^{2+} all'interno delle cellule N9. La dose scelta sarà quindi utilizzata nei successivi esperimenti, con l'intento di valutare se la pre-incubazione nei terreni condizionati dalle NSC sia in grado di modulare l'attivazione delle N9 stimulate acutamente con ATP. Successivamente, sarà indagato mediante RT-PCR quantitativa

se i terreni condizionati dalle NSC siano in grado di modificare l'espressione genica di alcuni fattori pro-infiammatori e anti-infiammatori, quali TNF- α , IL-10 e COX-2, nelle cellule N9 attivate con ATP. Infine, sarà esaminato l'effetto dei terreni condizionati da NSC sulla vitalità cellulare delle N9, mediante saggio con MTT.

In base ai risultati ottenuti cercheremo di confermare tali effetti anche in altri modelli cellulari rappresentativi di malattie in cui l'ATP ha un ruolo cruciale, come ad esempio il dolore neuropatico. In questa patologia le cellule di Schwann, che costituiscono la guaina mielinica dei nervi periferici, rispondono all'aumento di ATP in seguito ad una lesione del nervo e concorrono ad innescare la risposta infiammatoria. Tale risposta degenera fino a istaurare il dolore cronico neuropatico.

Cellule neuronali saranno utilizzate, invece, per verificare la capacità delle NSC di esercitare un'azione protettiva verso la tossicità neuronale da ATP, fenomeno che si verifica in seguito all'evento ischemico.

Esperimenti preliminari hanno dimostrato che, in seguito a stimolazione con ATP, le cellule di microglia murina N9 sono in grado di stimolare *in vitro* la tras migrazione delle NSC, suggerendo che le N9 possano attirare le NSC mediante la liberazione di fattori chemotattici.

Al fine quindi di individuare le molecole chemotattiche prodotte dalle N9, saranno analizzati i livelli di mRNA di alcune chemochine indotte dalla stimolazione con ATP. Sulla base dei risultati ottenuti, si procederà con la messa a punto della tecnica di silenziamento genico specifico per il gene target.

Il silenziamento genico del gene target potrà fornire informazioni utili sul reale ruolo di tale fattore nella induzione della tras migrazione delle cellule staminali neuronali *in vitro*.

In conclusione, i risultati di questa ricerca ci permetteranno di affermare se i terreni condizionati dalle NSC siano in grado di modulare positivamente la suscettibilità delle cellule N9 al trattamento con ATP in termini di liberazione del Ca²⁺ intracellulare, secrezione di molecole infiammatorie e citotossicità e di confermare quindi l'ipotesi del cross-talk tra i due tipi cellulari, mediato da fattori solubili.

MATERIALI E METODI

LINEE CELLULARI

Cellule N9

Abbiamo utilizzato una linea di cellule microgliali murine immortalizzate, le cellule N9, derivanti da microglia primaria di topo CD-1 e ottenute per fusione con ibridoma.

Le N9 sono state coltivate in Iscove Modified Dulbecco's MEM (Sigma) contenente penicillina 100 IU/ml, L-glutamina 2 mM, penicillina G 100 U/ml, streptomicina solfato 100 µg/ml, addizionato di FBS (fetal bovine serum) al 5%.

Le cellule sono mantenute in incubatore termostato a 37°C, con 5% CO₂, e utilizzate dal passaggio 3 al passaggio 15.

Cellule IMS32

E' una linea murina di cellule di Schwann immortalizzate, derivata da una coltura primaria di neuroni DRG. Le IMS32 sono state coltivate Dulbecco's Modified Eagle Medium (Sigma) contenente penicillina 100 IU/ml, L-glutamina 2 mM, penicillina G 100 U/ml, streptomicina solfato 100 µr/ml, addizionato di FBS (fetal bovine serum) al 10% .

Le cellule sono mantenute in incubatore termostato a 37°C, con 5% di CO₂, sono state utilizzate dal passaggio 30 al passaggio 35.

Cellule Neuro2A

Le cellule Neuro2A appartengono ad una linea di neuroblastoma di topo albino. Sono coltivate in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Sigma) contenente penicillina 100 IU/ml, L-glutamina 2 mM, penicillina G 100 U/ml, streptomicina solfato 100 µgr/ml, addizionato di FBS (fetal bovine serum) al 10% .

Le cellule sono mantenute in incubatore termostato a 37°C, con 5% di CO₂, sono state utilizzate dal passaggio 2 al passaggio 15.

Cellule Staminali Neuronal e terreni condizionati

Le cellule staminali neuronali (NSC), utilizzate per gli esperimenti di trasmigrazione, sono state prelevate da cervelli di topi neonati CD-1 nel laboratorio del Prof. Parati dell'Istituto Neurologico Besta di Milano. Le NSC sono state coltivate in terreno Basal Medium ottimizzato per la crescita delle cellule staminali.

I terreni di coltura condizionati da NSC sono stati prelevati da colture omogenee a diversi passaggi di coltura (da P7 a P14). Come terreno di controllo è stato utilizzato il Basal Medium.

Mobilizzazione del Ca²⁺ intracellulare

Le cellule N9, sono state seminate a una densità di 20.000 cellule per pozzetto in piastre da 96 pozzetti nera con fondo trasparente (Corning, Costar). Dopo 48 ore, le cellule sono state incubate in 100 µl di soluzione composta da Fluo-4 NW 4,5 µM (Molecular Probes) e Probenecid 2,5 mM, (SIGMA). Il Fluo-4 NW è un acetossimetil estere che viene utilizzato come indicatore di fluorescenza: infatti è in grado di permeare la membrana plasmatica e di emettere fluorescenza se legato al calcio. La cellula tende ad espellerlo attraverso i trasportatori di membrana, e per questo motivo insieme al Fluo-4 NW viene usato il Probenecid, un inibitore di tali trasportatori.

Le cellule sono state incubate a 37°C e 5% CO₂ per 40 minuti per permettere al Fluo-4 di concentrarsi nel citoplasma. Successivamente le cellule sono state trattate con gli stimoli in grado di dare un aumento di calcio libero intracellulare.

I trattamenti sono stati effettuati mediante un dispositivo che inietta 25 µl di soluzione in ogni singolo pozzetto della piastra da 96 pozzetti.

Lo strumento effettua 20 letture ogni 0.2 secondi in ogni pozzetto, rilevando il livello basale di calcio libero citoplasmatico quindi inietta la sostanza ed effettua ulteriori 60 letture per seguire la cinetica di liberazione del Ca²⁺.

La lettura della piastra è stata effettuata mediante lo spettrofotometro multifunzione VICTOR³ (Perkin Elmer). È stata utilizzata la coppia di filtri eccitazione/emissione, rispettivamente a 485/535 nm.

I risultati sono stati espressi come differenza dei valori massimo e minimo del picco registrato dallo strumento.

Le cellule sono state stimulate con ATP, che nelle cellule di microglia determina un immediato incremento dei livelli citoplasmatici di Ca²⁺ mediante l'attivazione dei recettori purinergici della famiglia P2. Le concentrazioni di ATP utilizzate sono state 0,05-0,1-0,3-0,6-1 e 3 mM. Per ogni gruppo sperimentale sono stati utilizzati 10 pozzetti.

Per la misurazione della cinetica di liberazione di Ca²⁺ nelle cellule IMS32, le cellule sono state piastrate alla densità di 50000 cellule/pozzetto in piastre da 96 pozzetti quindi abbiamo adottato lo stesso protocollo descritto.

Trattamento delle cellule N9 per analisi dell'espressione genica

Le N9 sono state seminate in piastra da 6 pozzetti, alla densità di 200.000 cell/pozzetto. Dopo 3 giorni dalla semina le cellule sono state trattate per 3 ore con ATP diluito alla concentrazione desiderata nel terreno di coltura IMDM privo di siero.

Per testare la capacità dei terreni condizioni da staminali ATP è stato aggiunto alla concentrazione finale di 1mM ai terreni condizionati stessi, oppure al terreno non condizionato (TNC). Per ogni gruppo sperimentali sono stati trattati 6/8 pozzetti.

Estrazione dell'RNA totale cellulare

Le cellule N9 in piastra da 6 pozzetti sono state staccate mediante l'utilizzo di adeguati scraper e recuperate in 800 µl/pozzetto di soluzione Trizol-like.

La soluzione di Trizol-like (100ml):

- Guanidio tiocianato ($\text{CH}_5\text{N}_3\text{CHNS}$) 0.8 M
- Ammonio tiocianato (NH_4SCN) 0.4 M
- Sodio acetato (CH_3COONa) 0.1 M
- Fenolo non saturato 38%
- Glicerolo 5%

La quantità di reagente aggiunta è sufficiente per l'estrazione dell'RNA da 5-10 X 10⁶ cellule.

Protocollo di estrazione:

I campioni vengono incubati a temperatura ambiente per 5 minuti per garantire la completa dissociazione dei complessi delle nucleoproteine; si aggiungono quindi 0,2 ml di cloroformio e si agita vigorosamente. Dopo un riposo a temperatura ambiente di 3 minuti, i campioni vengono centrifugati a 12000 rpm per 15 minuti a 4°C. Si ottengono 3 fasi separate: la fase organica inferiore contenente il DNA, l'interfase contenente le proteine, e la fase acquosa superiore contenente l'RNA. La fase acquosa viene accuratamente prelevata e trasferita in un nuovo tubo sterile; ad essa si aggiungono 0,5 ml di isopropanolo a 4° C. I campioni vengono agitati vigorosamente per alcuni secondi e incubati a temperatura ambiente per 10 minuti. Dopo aver centrifugato a 12000 rpm per 10 minuti, l'RNA totale precipita. Il surnatante viene rimosso con un'accurata aspirazione ed il precipitato viene lavato con 0,2 ml di etanolo 70%. I campioni vengono nuovamente centrifugati a 7600 rpm per 5 minuti a 4°C. Dopo aver

scartato il surnatante, l'etanolo residuo è fatto evaporare sotto vuoto per 2 minuti, l'RNA viene quindi risospeso in un volume adeguato (25-30 µl) di formammide.

Per valutare l'integrità degli RNA estratti dai campioni, una piccola aliquota di ciascun RNA totale è sottoposta a separazione elettroforetica su gel di agarosio 1% contenente 0,5 µgr/ml di bromuro di etidio in TAE 1 X (Tris base 0,4 M, acido acetico 0,04 M, EDTA 0,01 M).

La concentrazione e la purezza degli RNA estratti sono state valutate mediante lettura della ratio di assorbanza alle lunghezze d'onda $\lambda_{260}/\lambda_{80}$ allo spettrofotometro (Nanodrop, Celbio). È stata considerata accettabile una ratio ≥ 1.8 .

Digestione del DNA genomico

I campioni di RNA totale sono stati sottoposti a digestione enzimatica con DNAasi in modo da eliminare eventuali contaminazioni da DNA genomico.

La procedura di digestione è adatta a rimuovere sino a 2 µg di DNA contaminante in un volume di 20 µl.

Protocollo sperimentale:

Sono stato prelevati 2µg di RNA totale e sono stati aggiunti ad una mix di digestione composta da:

- 2 µl di Buffer DNAase 10X,
- 1 unità di DNAase I (1u/µl, Fermentas)
- ddH₂O fino a volume finale di 18 µl

I campioni sono stati incubati a 37°C per 30 minuti,

Successivamente la reazione viene inibita mediante aggiunta di 2 µl di EDTA e l'incubazione a 60°C per 10 minuti.

Retrotrascrizione

Quattrocento nanogrammi di RNA totale sono stati retrotrascritti utilizzando un kit per retrotrascrizione “RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit” (Fermentas).

Il kit contiene i reagenti necessari per ottenere una mix di reazione così composta:

○ dNTPs 10mM	2 µl
○ Revertaid™ H minus M-MuLV RT (200u/µl)	1 µl
○ RNAasi inibitore Ribolock (20u/µl)	1 µl
○ Oligo dT 0.5µg/µl	1 µl
○ Buffer 5x	4 µl
○ ddH ₂ O sterile	Volume finale 20 µl

I campioni sono incubati in termociclatore alle seguenti temperature:

- 25°C per 10'
- 42°C per 60'
- 70°C per 10'

Per saggiare l'espressione degli mRNA di interesse mediante PCR quantitativa l'RNA è stato diluito in ddH₂O alla concentrazione finale di 1ng/µl.

REAL-TIME PCR

5 ng di cDNA precedentemente ottenuto sono stati utilizzati per analizzare l'espressione genica di alcune citochine e chemochine mediante real-time PCR con lo strumento ABI PRIMS 7000 (Applied Biosystem).

È stato utilizzato un saggio Taqman in un volume finale di 25 ul. Come gene housekeeping è stato scelto il gene per la gliceraldeide fosfo deidrogenasi (GAPDH).

La mix di reazione è così composta:

- Real Master Mix con ROX, contenente:
10ul
 - HotMaster Taq DNA polimerasi 0.1 U/ul, 1 unità finale
 - magnesio acetato 12.5mM (5mM finali)
 - dNTPs 1mM (0.4mM finali)
 - ROX

- Taqman assay-on-demand 0.7ul
- ddH₂O
- cDNA templatato 5 ul

La reazione di amplificazione è stata ripetuta per 40 cicli.

Le sonde taqman e i primer specifici sono stati acquistati come Taqman Assay-on-demand Gene Expression (Applied Biosystem). Le efficienze di amplificazione dei target e del gene housekeeping sono state validate prima di effettuare l'analisi dei dati. Le reazioni sono state fatte in triplicato e i dati ottenuti sono stati analizzati mediante il metodo di quantificazione relative del $\Delta\Delta C_T$.

Saggio di vitalità cellulare con MTT

Per evidenziare la capacità dei fattori secreti dalle staminali di diminuire la mortalità delle cellule N9 sottoposte ad uno stimolo tossico (ATP 0,1, 1 e 3 mM, per 24 ore) abbiamo utilizzato un saggio di vitalità MTT (metil tetrazolium).

Preparazione del reagente MTT:

La polvere di sale metiltetrazolium (MTT) è stata sciolta in PBS alla concentrazione di 5mg/ml e quindi mantenuta a 60°C per 1 minuto.

E' statp preparato il solvente a base di isopropanolo acidificato: 1ml di HCL 1N in 25 ml di isopropanolo -> ratio 0.04.

L'MTT disciolto in PBS è stato filtrato con filtro da 0.22µm sotto cappa sterile;

Prima dell'uso MTT è statp incubato a 37° per 1 minuto.

Saggio MTT:

Le cellule N9 sono state seminate 48 prima del saggio in piastra multiwell da 96, alla concentrazione di 9000 cell/well. Dopo 24 ore dalla semina è stato somministrato alle cellule lo stimolo tossico, ATP3mM per 24 ore. Quindi è stato aggiunto al terreno di trattamento (100µl) 10µl di reagente MTT precedentemente preparato.

Le cellule sono state incubate per 3 ore a 37°C al buio per permettere la formazione dei cristalli di Formazan ad opera dell'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi, presente nelle cellule vitali. Dopo 3 ore il terreno è stato aspirato e i cristalli di formazan presenti sul fondo dei pozzetti sono stati risospesi nella soluzione di isopraponolo acidificata (200ul/well). La piastra è stata quindi inserita nel lettore multifunzione Victor3 (Perkin Elmer) per la lettura spettrofotometrica a 540nm.

Silenziamento genico con RNA Interference

Per studiare il ruolo di MCP-1 abbiamo utilizzato la tecnica del silenziamento genico mediante RNA interference (Qiagen). Questa tecnica permette di ridurre fino al 90% l'espressione di una proteina di interesse. La cellula, o l'organismo, in cui si vuole silenziare una determinata proteina viene trasfettata con molecole di RNA a doppia elica contenenti la sequenza di circa 20bp chiamata small interfering RNA (siRNA).

Gli RNA a doppia elica all'interno del citoplasma vengono riconosciuti dall'enzima *dicer* che elimina alcune basi terminali. Il siRNA risultante è lungo circa 20 bp ed è riconosciuto dal complesso enzimatico RISC. Tale complesso è in grado di separare i due filamenti di RNA e mantiene il legame con il filamento antisense. La sequenza del filamento di siRNA è in grado di riconoscere e legare in modo specifico l'RNA messaggero che codifica per la proteina di interesse. Tale legame attiva il complesso enzimatico RISC che degrada la molecola di mRNA target riconosciuta dal siRNA. Una volta degradata la molecola di mRNA target, il complesso proteico rilascia l'enzima DICER legato al siRNA che è libero di legare un'altra molecola di mRNA specifico e mediarne la degradazione.

La diminuzione di mRNA relativo alla proteina di interesse varia al variare dell'efficienza di trasfezione, della specificità del siRNA e dalla lunghezza dell'mRNA target, e quindi per ogni target occorre verificare sperimentalmente le condizioni ottimali di silenziamento.

Un abbassamento dell'mRNA misurato con real-time PCR è osservabile da 18 a 73 ore dalla trasfezione.

Lo small-interfering RNA può anche essere trasfettato stabilmente, quando inserito in vettori di espressione adeguati. Tali vettori permettono la produzione dei siRNA oligonucleotidi double strand costitutiva nel citoplasma della cellula che, in questo caso, risulta silenziata stabilmente.

Alternativamente il siRNA può essere introdotto direttamente nelle cellule mediante trasfezione transiente; questa metodica permette un notevole risparmio di tempo rispetto a quello richiesto da una selezione clonale e la possibilità di silenziamento di diverse proteine cellulari.

Per questi motivi abbiamo deciso di utilizzare quest'ultima metodica per studiare la proteina MCP-1 nel nostro modello cellulare.

Preparazione siRNA stock solution:

5 nanomoli di siRNA specifico per MCP-1 sono stati preparati con un buffer di sospensione (Qiagen) e solubilizzate mediante incubazione a 90°C per 1 minuto e 37°C per 60 minuti. La soluzione ottenuta (20µM) viene conservata a -20°C fino all'uso.

Preparazione cellule:

Le cellule N9 sono seminate in piastre multipozzetto da 6 pozzetti alla concentrazione di 350.000/pozzetto. Dopo 24 ore raggiungono il 60-80% della confluenza e si può procedere con la trasfezione dei siRNA.

Nel corso di questa ricerca abbiamo confrontato due sistemi che utilizzano due diversi reagenti di trasfezione:

Trasfezione:

1) **Hiperfect** (Qiagen)

L'RNA da trasfettare precedentemente preparato viene diluito con Iscove's Modified Dulbecco's MEM senza siero alla concentrazione finale di 20 nM.

Alla soluzione ottenuta si aggiungono 20µl di Hiperfect (volume finale 100µl /pozzetto). La soluzione di trasfezione viene incubata 10 minuti a temperatura ambiente per permettere la formazione di complessi tra l'Hiperfect e i siRNA.

Viene effettuato un cambio del terreno di coltura alle cellule N9 con 1,9 ml di terreno IMDM fresco senza FBS. Quindi vengono aggiunti 100 µl di soluzione di trasfezione per ogni pozzetto. Le cellule vengono incubate a 37°C, 5% CO₂ per 6 ore, quindi si effettua un cambio di terreno con IMDM contenente 5% di siero. Il silenziamento raggiunge il picco massimo dopo 24 ore dalla trasfezione. Sono state perfezionate anche trasfezioni parallele di controllo usando le stesse quantità di reagenti: i siRNA di controllo positivo e negativo sono stati messi a disposizione dalla ditta produttrice (Qiagen).

2) **N-TER** (Sigma)

La soluzione di trasfezione viene chiamata Nanoparticles Formation Solution (NFS), la concentrazione del siRNA finale deve essere sempre di 650nM, e il rapporto tra siRNA e reagente di trasfezione N-TER resta costante. Le diverse prove vengono effettuate utilizzando volumi crescenti di NFS nel terreno di trasfezione finale.

Formazione della NFS:

Il siRNA dello stock viene diluito nella Buffer Solution (Sigma) fornita insieme al reagente di trasfezione in un volume finale pari alla metà del volume totale della NFS.

Abbiamo quindi diluito a partire dalla siRNA stock solution 20 μ M secondo questa formula:

$$\text{Volume di siRNA stock} = 0.0325 \mu\text{l} \times V_{\text{finale NFS}}$$

La soluzione ottenuta viene miscelata mediante vortex e centrifugata per pochi secondi.

Si diluisce il reagente di trasfezione N-TER in ddH₂O in un volume pari a metà del volume finale della NFS (200 μ l) secondo questa formula:

$$\text{volume di N-TER} = 0.08 \mu\text{l} \times \text{Volume finale NFS}$$

La diluizione viene vortexata e centrifugata.

Le due soluzioni sono unite per formare la NFS, che viene vigorosamente miscelata e centrifugata per alcuni secondi, quindi incubata a temperatura ambiente per 20 minuti per permettere la formazione dei complessi di trasfezione.

Successivamente la NFS può essere diluita nel terreno di coltura (senza siero) che verrà utilizzato per la trasfezione. Le diverse prove sono state effettuate variando il volume della NFS da diluire nel terreno di trasfezione finale e quindi variando le concentrazioni di siRNA e N-TER finale.

Il terreno di coltura delle cellule viene aspirato e ad ogni pozzetto vengono aggiunti 2ml di terreno di trasfezione. Le cellule sono quindi incubate a 37°C , 5% CO₂ per 24ore.

L'efficacia della trasfezione è stata testata per diverse concentrazioni di siRNA (5nM, 10nM, 20nM) con entrambe le metodiche.

Verifica della trasfezione mediante imaging

Per evidenziare l'ingresso dei siRNA nel citoplasma delle cellule N9 sono state effettuate delle prove di trasfezione utilizzando un siRNA marcato covalentemente con il fluoroforo Alexa-FLUO 488. In questo caso le cellule sono state coltivate su vetrino di diametro 2.5 cm posizionato in piastra da 6 pozzetti.

Dopo 24 ore dalla trasfezione le cellule sono state lavate due volte con PBS e fissate con paraformaldeide 4% per 30 minuti.

Successivamente le cellule sono state lavate 3 volte con PBS e sono state marcate a livello nucleare con Hoechst alla concentrazione 1 μ g/ml per 10 minuti.

I vetrini sono stati montati su vetrini portaoggetti e le immagini relative alla fluorescenza dei nuclei e del siRNA fluorescente sono state raccolte al microscopio a fluorescenza.

Nelle prove successive le cellule N9 sono state coltivate in piastra multipozzetto senza vetrini e le cellule sono state raccolte dopo 24 ore dalla trasfezione con il reagente Trizol-like, precedentemente descritto, per l'estrazione dell'RNA totale e le successive reazioni di RT-PCR quantitativa, per valutare l'espressione della proteina target nelle diverse condizioni di trasfezione.

Saggio di trasmigrazione cellulare

Per evidenziare la capacità migratoria delle NSC e l'eventuale influenza delle N9 su tale meccanismo abbiamo utilizzato delle piastre transwell multipozzetto (6 pozzetti) dotate di inserti con membrana in policarbonato.

I fori della membrana di diametro di 8 μm sono in grado di trattenere cellule e terreno di coltura, ma permettono a cellule in attiva trasmigrazione di attraversare la membrana e raggiungere il pozzetto sottostante.

1 milione di NSC marcate con CFDA (marcatore fluorescente nucleare) sono state caricate in ogni inserto e la trasmigrazione è stata valutata dopo 4 ore a 37°C.

Tale determinazione è stata effettuata in presenza di cellule N9 coltivate sul fondo di ciascun pozzetto.

Le N9 sono state coltivate sul fondo del pozzetto 48 ore prima dell'esperimento di trasmigrazione alla concentrazione di 450.000cell/pozzetto. Dopo 24 ore dalla semina un gruppo di cellule N9 è stato trasfettato transientemente con siRNA specifico per MCP-1, mentre le restanti N9 sono state trasfettate con siRNA di controllo.

Dopo 24 ore dalla trasfezione, ovvero quando si è raggiunto un adeguato silenziamento del fattore MCP-1, è stato effettuato l'esperimento di trasmigrazione. Alle piastre in cui sono state coltivate le N9 sono stati applicati gli inserti con membrana, quindi in ogni inserto sono state caricate le NSC sospese in 2ml di terreno IMDM privo di siero. La membrana in policarbonato non permette al terreno contenuto nell'inserto di mescolarsi con il terreno sottostante, ma permette il passaggio di piccole molecole, e fattori solubili eventualmente prodotte dalle N9.

Gruppi sperimentali:

- NSC
- NSC + N9 silenziate MCP-1 **CTRL**
- NSC + N9 silenziate MCP-1 + **ATP 1mM**
- NSC + N9 siRNActrl **CTRL**
- NSC + N9 siRNActrl + **ATP 1mM**

Dopo 4 ore di incubazione a 37° gli inserti sono stati rimossi e sono stati raccolti i terreni contenuti nel pozzetto sottostante. Tali terreni, contenenti le NSC trasigrate, sono stati centrifugati e il pellet di cellule ottenuto è stato risospeso in 1ml di PBS.

E' stata effettuata la conta delle NSC presenti nel PBS mediante camera di Burker. Le cellule N9 eventualmente presenti sono state discriminate in quanto non marcate con CFDA.

Analisi statistica

I risultati di tutti gli esperimenti sono stati espressi come media \pm errore standard ($M \pm SE$). La significatività statistica delle differenze tra i diversi gruppi di trattamento è stata valutata con il test di Tukey-Kramer per confronti multipli, preceduto dall'analisi della varianza a una via (one way ANOVA). Sono state considerate significative le differenze con valore di $P < 0,05$.

RISULTATI

Effetti della stimolazione con ATP sulla mobilizzazione del Ca^{2+} intracellulare nelle cellule N9

Sono stati effettuati alcuni esperimenti preliminari allo scopo di determinare quali concentrazioni di ATP fossero in grado di stimolare il rilascio di Ca^{2+} intracellulare nelle cellule N9.

A tal fine, le cellule N9 sono state incubate in presenza di Fluo-4 NW e stimolate con ATP a concentrazioni crescenti: 0,05-0,1-0,3-0,6-1 e 3 mM. Tutte le concentrazioni ATP utilizzate determinavano un incremento significativo ($p < 0,05$) del Ca^{2+} libero intracellulare rispetto al controllo.

La concentrazione minima di ATP in grado di indurre riproducibilmente il rilascio massimale di Ca^{2+} è risultata essere 0,1 mM (Fig.1). Pertanto, questa concentrazione è stata utilizzata negli esperimenti successivi, con l'intento di valutare l'effetto dei terreni condizionati da NSC su tale parametro.

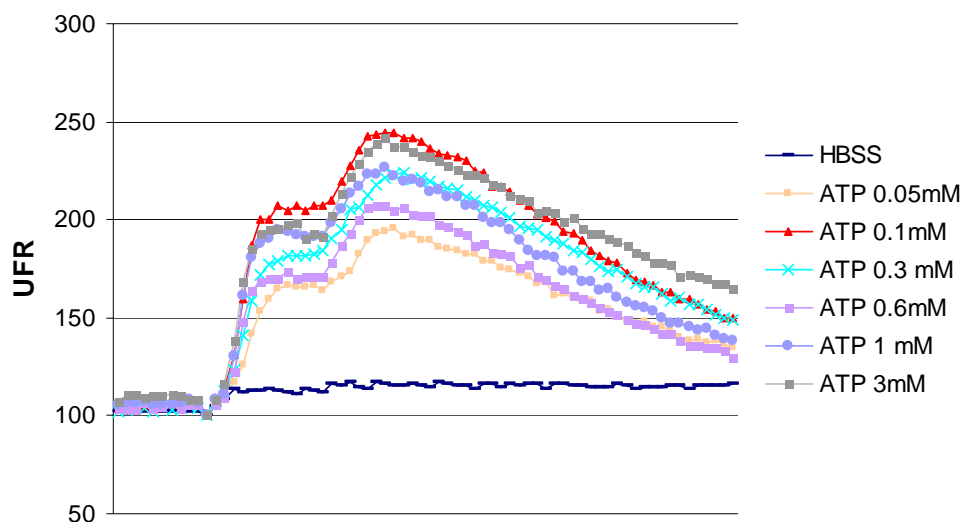


Fig.1. Effetti della stimolazione con ATP sulla mobilizzazione del Ca^{2+} intracellulare nelle cellule N9.

Cellule di microglia murina N9, seminate alla densità di 20000 cellule/pozzetto in piastre da 96 pozzetti, sono state incubate con Fluo-4 NW per 40 minuti, a 37°C , e successivamente stimolate con diverse concentrazioni di ATP: 0,05 mM, 0,1 mM, 1 Mm e 3 mM. La mobilizzazione del Ca^{2+} libero intracellulare è stata determinata mediante saggio fluorimetrico. Nel gruppo di controllo la stimolazione è stata effettuata con il solo solvente dell'ATP, ovvero una quantità isovolumetrica di Hank's Balanced Salt Solution (HBSS).

I risultati sono espressi come $M \pm ES$ delle UFR (unità di fluorescenza relativa) di 10 determinazioni per gruppo di trattamento.

Effetti della pre-incubazione in terreni condizionati da NSC sulla liberazione del Ca²⁺ intracellulare in cellule N9 stimolate con ATP

Come atteso, nelle cellule N9 pre-incubate in terreni non condizionati (TNC), la stimolazione con ATP 0,1 mM ha provocato una massiva liberazione di Ca²⁺ intracellulare. Tuttavia, la pre-incubazione delle cellule N9 per un'ora nei terreni condizionati da NSC a diversi passaggi di coltura (P2, P5 e P8) ha determinato una significativa riduzione della mobilizzazione del Ca²⁺ intracellulare stimolata dall'ATP (29.54% ± 5.2; 13.7% ± 4.7; 25% ± 4.7 di decremento della mobilizzazione del Ca²⁺ intracellulare, nelle cellule N9 pre-incubate in terreni condizionati P2, P5, P8 rispetto a quelle pre-incubate in TNC; P<0,05) (Fig. 2).

E' interessante osservare che il prolungamento della pre-incubazione delle N9 in terreni condizionati da NSC a 3 ore ha causato un'ulteriore diminuzione della liberazione di Ca²⁺, riportando i livelli di quest'ultimo a valori paragonabili a quelli dei controlli (65.15% ± 4.7; 60.6 ± 9.8; 90.9% ± 4.9 di decremento della mobilizzazione del Ca²⁺ intracellulare in cellule N9 trattate con ATP e pre-incubate per 3 ore in terreni condizionati P2, P5, P8 rispetto a quelle trattate con ATP e pre-incubate in TNC; P<0,05)(Fig. 2).

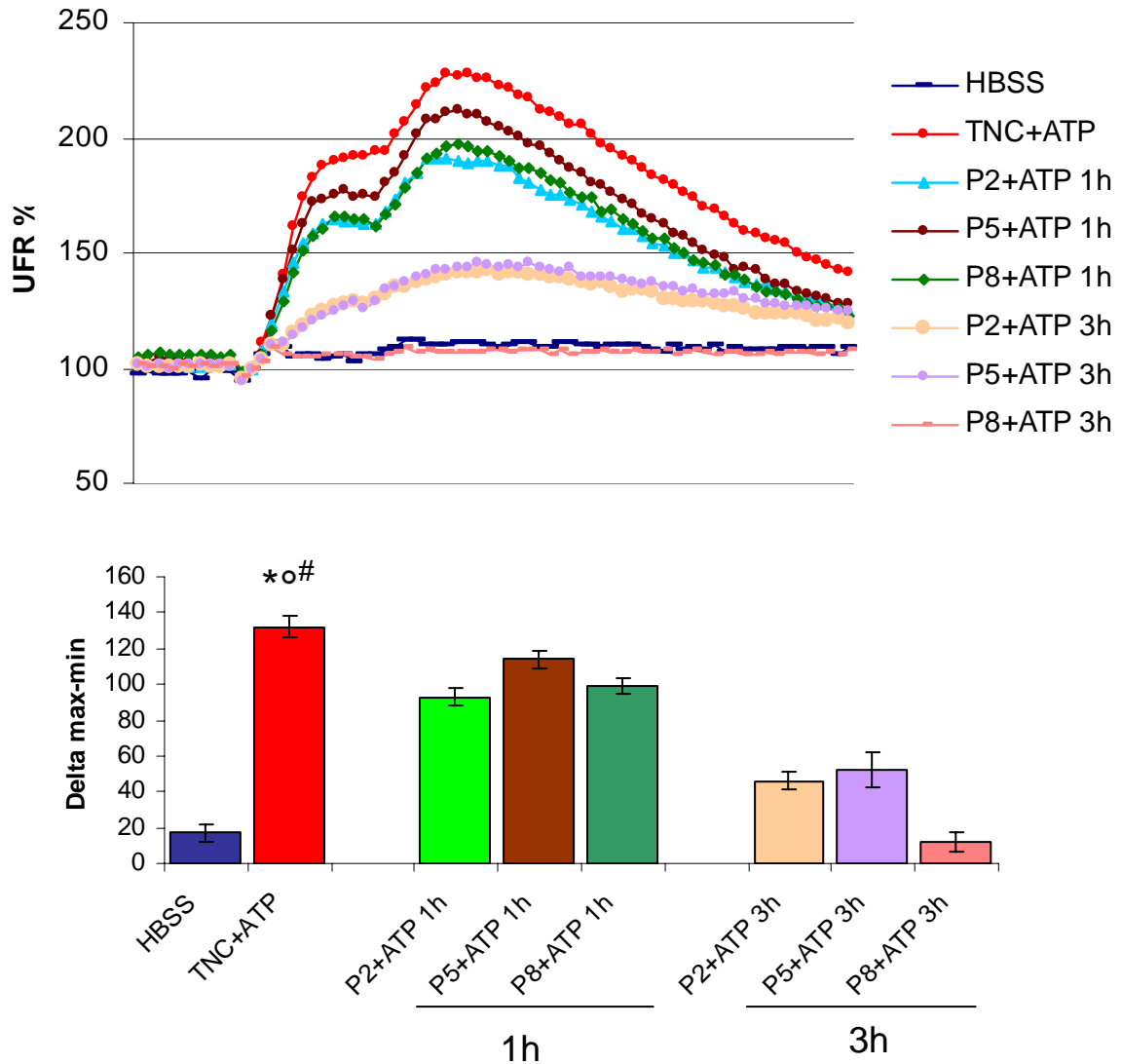


Fig. 2. Effetto della pre-incubazione in terreni condizionati da NSC nelle cellule N9 sulla mobilizzazione del Ca^{2+} intracellulare indotta da ATP.

Cellule della linea di microglia murina N9, piastrate alla densità di 20000 cellule/pozzetto in piastre da 96 pozzetti, sono state preincubate per 1 o 3 ore in terreni non condizionati (TNC) o condizionati da NSC ai passaggi di coltura P2, P5 e P8, e successivamente stimulate con ATP 0,1 mM. Gli effetti della stimolazione con ATP sulla mobilizzazione del Ca^{2+} intracellulare sono stati determinati mediante saggio fluorimetrico, effettuato dopo aver incubato le cellule N9 in Fluo-4 NW per 45 minuti, a 37°C. Pannello superiore: andamento delle modificazioni della fluorescenza a seguito della stimolazione con ATP. Pannello inferiore: stessi dati del pannello superiore, ricalcolati come differenza tra il punto di stimolazione massimale e il basale di ogni singola curva. I risultati sono espressi come $M \pm ES$ del $\Delta_{\text{max-min}}$ di 10 determinazioni per gruppo di trattamento.

* $P < 0,05$ ATP + TNC vs HBSS

° $P < 0,05$ ATP + TNC vs ATP + P2 1 ora, ATP + P5 1 ora, ATP + P8 1 ora

$P < 0,05$ ATP + TNC vs ATP + P2 3 ore, ATP + P5 3 ore, ATP + P8 3 ore

Effetti del trattamento con ATP sull'espressione di citochine pro-infiammatorie in cellule N9

Sono stati effettuati esperimenti per caratterizzare le curve dose-effetto e time-course finalizzate a individuare a quali concentrazioni l'ATP risultasse attivo nell'induzione di citochine pro-infiammatorie nelle cellule N9 e quale fosse la lunghezza della stimolazione necessaria per evidenziare il massimo effetto.

In base ai risultati reperibili in letteratura abbiamo deciso di testare inizialmente 2 concentrazioni di ATP e l'incubazione di 3 ore.

La concentrazione 0.1 mM è quella che negli esperimenti preliminari si era dimostrata capace di indurre riproducibilmente un aumento massimale del calcio libero intracellulare, mentre 1 mM è la concentrazione di ATP che viene riportata capace di indurre l'attivazione del recettore P2X7.

Nei nostri esperimenti le concentrazioni di ATP superiori a 1mM sono risultate tossiche per le cellule e quindi non sono state utilizzate per le successive analisi.

Inizialmente si è provveduto ad analizzare l'espressione di mRNA per TNF- α mediante PCR quantitativa, in quanto il TNF- α è nota essere una delle prime citochine a venire indotta dagli stimoli infiammatori ed è un marker indiscusso di attivazione microgliale.

Nei nostri esperimenti, la concentrazione di ATP 1mM è risultata efficace nell'aumentare significativamente l'espressione di mRNA di TNF- α . (CTRL 11.96 ± 0.75 vs ATP1 mM 19.45 ± 0.78 $p < 0.01$) (Fig.3)

Abbiamo quindi deciso di caratterizzare in maniera più precisa il time-course della stimolazione con ATP. Nell'esperimento successo abbiamo infatti verificato gli effetti di diversi tempi di trattamento: 1, 3 e 24 ore.

L'espressione del marker di attivazione è stata valutata mediante PCR quantitativa. I risultati da noi ottenuti evidenziano che il picco di induzione di TNF- α veniva raggiunto dopo 3 ore di stimolazione (ATP 3 ore 22.45 ± 2.93 vs CTRL 8.08 ± 0.56 $p < 0.01$) (Fig.4).

In base a questi risultati abbiamo scelto di utilizzare il trattamento con ATP 1 mM per 3 ore per gli esperimenti successivi.

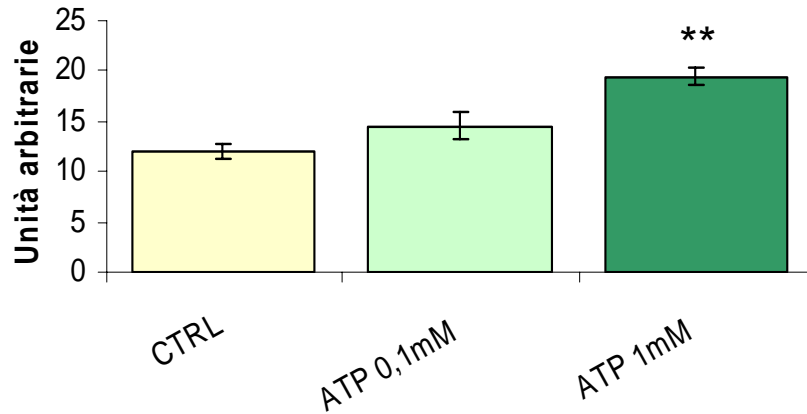


Fig. 3. Effetto del trattamento con dosi crescenti di ATP sull'espressione di mRNA per TNF- α nelle cellule N9.

Cellule della linea microgliale N9, seminate alla densità di 45×10^5 cellule/pozzetto in piastre da 6 pozzetti, sono state incubate nel normale medium di coltura per 3 ore in assenza o in presenza di ATP alle concentrazioni di 0,1 e 1 mM. Le cellule sono state quindi raccolte con Trizol e l'RNA totale è stato successivamente estratto per determinare, mediante RT-PCR quantitativa, l'espressione di mRNA per TNF- α . L'housekeeping utilizzato per la normalizzazione è il gene per l'enzima GAPDH I risultati sono espressi come $M \pm ES$ di 6 determinazioni per gruppo di trattamento.

* $P < 0,05$ TNC + ATP 1 mM vs CTRL

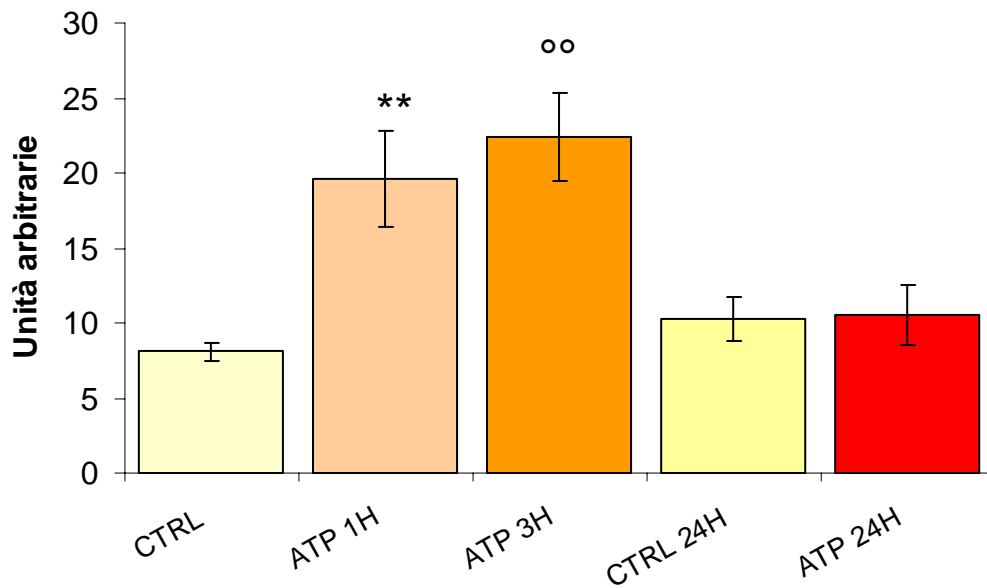


Fig. 4. Effetti del trattamento con ATP 1 mM per 1-24 ore, sull'espressione di mRNA per TNF- α nelle cellule N9.

Cellule della linea di microglia murina N9, piastrate alla densità di 45×10^5 cellule/pozzetto in piastre da 6 pozzetti, sono state incubate nel normale medium di coltura in assenza di ATP o in presenza di ATP alla concentrazione 1mM per 1, 3 e 24 ore. Le cellule sono state quindi raccolte con Trizol e l'RNA totale è stato estratto per la successiva determinazione, mediante RT-PCR semiquantitativa, dell'espressione di mRNA per TNF- α . L'housekeeping utilizzato per la normalizzazione è il gene per l'enzima GAPDH I risultati sono espressi come $M \pm ES$ di 6 determinazioni per gruppo di trattamento.

** $p < 0.001$ ATP1h Vs CTRL

°° $p < 0.001$ ATP 3h vs CTRL

Effetti dell'incubazione delle cellule N9 in terreni condizionati da NSC sull'espressione di mRNA per TNF- α , IL-10 e COX-2

L'incubazione per 3 ore con ATP 1mM, ha indotto nelle cellule N9 un incremento dell'espressione di mRNA per **TNF- α** , rispetto al controllo (controllo TNC 5.46 ± 0.53 ; TNC+ATP 11.15 ± 0.89 : 103% di aumento di espressione rispetto al controllo; $p < 0,05$; Fig. 5). Pertanto, la concentrazione di ATP 1 mM è stata utilizzata negli esperimenti successivi, con lo scopo di valutare l'effetto protettivo dei terreni condizionati da NSC sui livelli di espressione di altre citochine.

Similmente a quanto osservato per TNF- α , questo protocollo sperimentale ha indotto nelle cellule N9 un incremento significativo, rispetto al controllo, dei livelli di mRNA per **IL-10** (2.95 ± 0.29 per TNC e 3.89 ± 0.19 per TNC + ATP corrispondente al 31.9% di aumento di espressione, $p < 0,05$) e per **COX-2** (8.93 ± 1.17 per TNC e 19.54 ± 1.07 per TNC +ATP che corrisponde ad un aumento di espressione del 119.15%; $p < 0,05$,) (Fig.6, 7)

In questi esperimenti, al fine evidenziare un potenziale effetto dei terreni condizionati da staminali neuronali abbiamo effettuato il trattamento con ATP 1mM per 3 ore in copresenza dei terreni condizionati. Abbiamo quindi analizzato con PCR quantitativa l'espressione dei geni infiammatori modificati dal trattamento. Da questi esperimenti abbiamo osservato che la presenza di terreni condizionati, prelevati dalle colture di NSCs ai passaggi di coltura crescenti 5, 7 e 9, sono risultati efficaci nel prevenire l'aumento di espressione di **TNF- α** indotto da ATP (TNC+ATP 11.15 ± 0.89 vs P5+ATP 6.26 ± 0.72 ; P7+ATP 4.65 ± 0.61 ; P9+ATP 4.62 ± 0.84 $p < 0.05$; Fig. 5). In particolare abbiamo osservato una riduzione percentuale di espressione di TNF- α rispetto a TNC+ATP rispettivamente del 43%, 58.32% e 58.6%.

Similmente anche per l'espressione della citochina anti-infiammatoria **IL-10** abbiamo rilevato la capacità da parte dei terreni condizionati di antagonizzare la stimolazione con ATP e mantenere i livelli di mRNA a valori simili a quelli del controllo (TNC+ATP 3.89 ± 0.19 vs P5+ATP 2.20 ± 0.31 , P7+ATP 2.66 ± 0.19 , P9+ATP 2.02 ± 0.2 : riduzione di espressione del 43.46%, 31.72%, 48.09% rispettivamente; $p < 0.05$, Fig. 6)

Per quanto riguarda invece l'espressione dell'mRNA per **COX-2**, è da notare che non tutti i terreni condizionati si sono rivelati ugualmente efficaci nel contrastare l'effetto provocato dalla stimolazione con ATP: infatti, soltanto quelli al passaggio 7 e 9, ma non quello al passaggio 5, erano in grado di antagonizzare l'aumento dei livelli di espressione di mRNA per COX-2 (TNC + ATP 19.54 ± 1.07 vs P5 + ATP 20.84 non significativo; TNC + ATP 19.54 ± 1.07 vs P7+ATP 13.93 ± 1.89 , P9+ATP 12.05 ± 2.24 : riduzione di espressione del 28.69% e 38.34% $p < 0.05$, Fig.7).

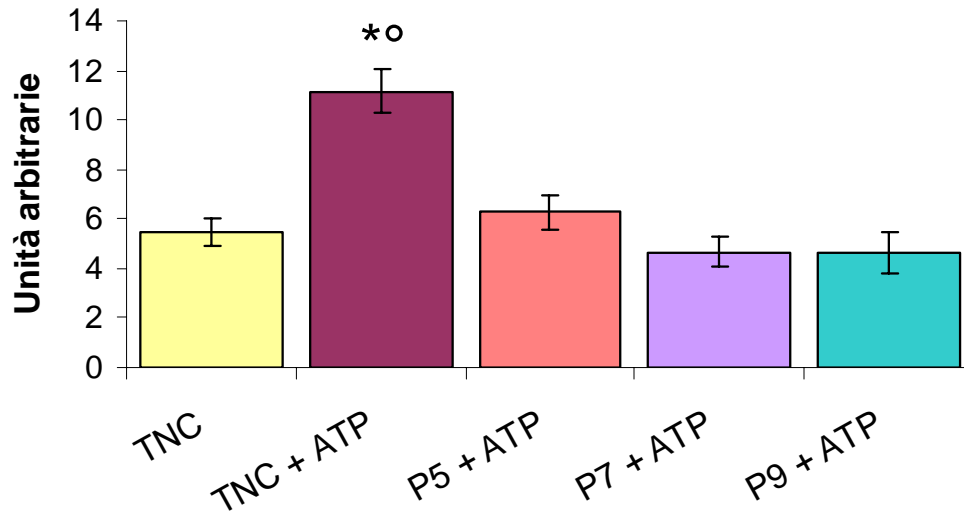


Fig.5. Effetto del trattamento con ATP sull'espressione di mRNA per TNF- α in cellule N9 incubate in terreni condizionati da NSC.

Cellule della linea di microglia N9, piastrate alla densità di 45×10^5 cellule/pozzetto in piastre da 6 pozzetti, sono state incubate per 3 ore in TNC o terreni condizionati da NSC ai passaggi P5, P7, P9 in presenza di ATP 1mM. Le cellule sono state quindi raccolte con Trizol e l'RNA totale è stato estratto per determinare, mediante RT-PCR quantitativa, l'espressione di mRNA per TNF- α . L'housekeeping utilizzato per la normalizzazione è il gene per l'enzima GAPDH. I risultati sono espressi come $M \pm ES$ di 6 determinazioni per gruppo di trattamento.

* $P < 0,05$ TNC + ATP vs TNC

° $P < 0,05$ TNC + ATP vs P5 + ATP, P7 + ATP, P9 + ATP

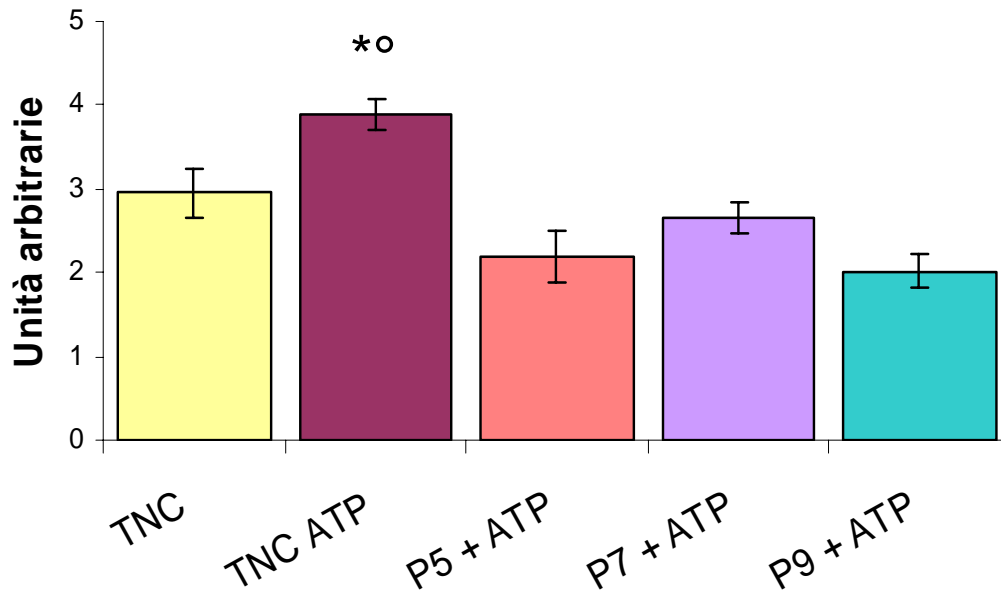


Fig.6. Effetto del trattamento con ATP sull'espressione di mRNA per IL-10 in cellule N9 incubate in terreni condizionati da NSC.

Cellule della linea N9 sono state trattate come descritto nella legenda della Figura 4. Le cellule sono state quindi raccolte con Trizol e l'RNA totale è stato estratto per determinare, mediante RT-PCR quantitativa, l'espressione di mRNA per IL-10. L'housekeeping utilizzato per la normalizzazione è il gene per l'enzima GAPDH. I risultati sono espressi come $M \pm ES$ di 6 determinazioni per gruppo di trattamento.

* $P < 0,05$ TNC + ATP vs TNC

° $P < 0,05$ TNC + ATP vs P5 + ATP, P7 + ATP, P9 + ATP

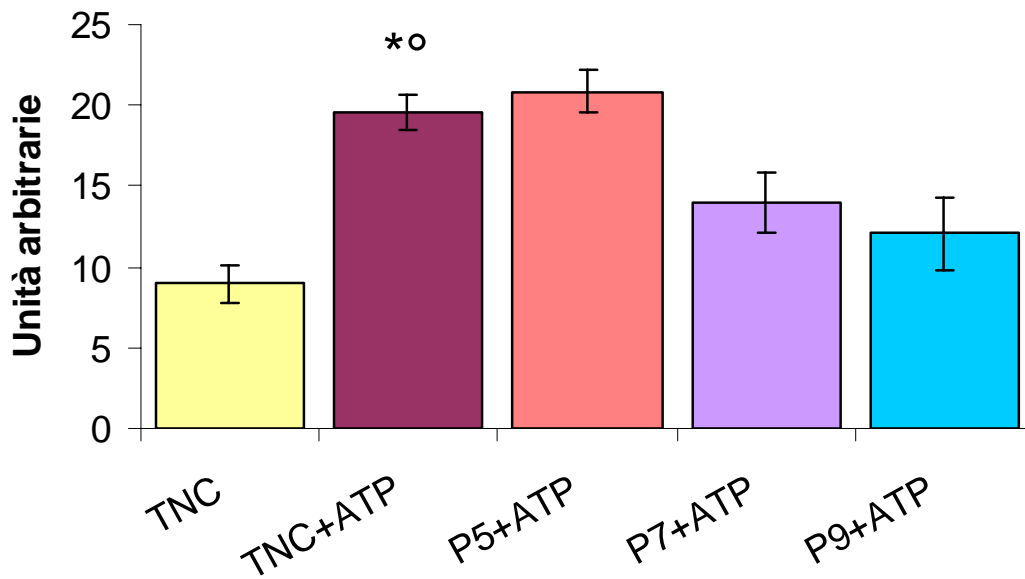


Fig.7. Effetto del trattamento con ATP sull'espressione di mRNA per COX-2 in cellule N9 incubate in terreni condizionati da NSC.

Cellule di microglia N9, sono state trattate come descritto nella legenda della Figura 4. Le cellule sono state quindi raccolte con Trizol e l'RNA totale è stato estratto per determinare, mediante RT-PCR quantitativa, l'espressione di mRNA per COX-2. L'housekeeping utilizzato per la normalizzazione è il gene per l'enzima GAPDH. I risultati sono espressi come $M \pm ES$ di 6 determinazioni per gruppo di trattamento.

* $P < 0,05$ TNC + ATP vs TNC e P5 + ATP vs TNC

° $P < 0,05$ TNC + ATP vs P7 + ATP, P9 + ATP

Effetti dei terreni condizionati da NSC sulla sopravvivenza delle cellule N9 stimolate con dosi tossiche di ATP

La stimolazione per 24 ore con ATP alle concentrazioni 0,1 e 1 mM determinava una lieve diminuzione della vitalità cellulare delle cellule N9, che tuttavia non raggiungeva la significatività statistica. Al contrario, l'incubazione con concentrazioni più elevate di ATP, in particolare 3 mM, provocava una drastica riduzione della sopravvivenza cellulare ($90,28 \% \pm 1,09$ di morte cellulare, per ATP 3 mM vs controllo; $P < 0,001$) (Fig.8). Pertanto, questa dose di ATP è stata utilizzata negli esperimenti successivi, volti a valutare un eventuale effetto protettivo dei terreni condizionati da NSC sulla sopravvivenza delle cellule N9.

L'incubazione delle cellule N9 con terreno condizionato da NSC al passaggio 14 e ATP 3 mM, induceva un lieve incremento della vitalità cellulare, rispetto al gruppo di controllo trattato con TNC addizionato di ATP 3 mM, che tuttavia non risultava statisticamente significativo. Invece, la vitalità cellulare delle cellule N9 aumentava significativamente se esse venivano pre-incubate per 24 ore nel terreno condizionato da NSC, e poi stimolate con ATP 3 mM; infatti la sopravvivenza aumentava dal $5,16\% \pm 0,84$ al $30,69 \% \pm 3,13$, rispettivamente per P14 24 ore + ATP vs TNC + ATP ($P < 0,001$) (Fig.9).

L'effetto osservato con il terreno P14 era inoltre sovrapponibile a quello ottenuto con terreni condizionati da NSC di altri passaggi di coltura testati, in particolare i passaggi P8, P10 e P12 (sopravvivenza: ATP $14,3\% \pm 1,5$ vs P8+ATP $47,4\% \pm 2,12$, P10+ATP $36,12\% \pm 1,8$, P12+ATP $45,4\% \pm 3,8$ $p < 0,01$) (Fig. 10).

Non è stato invece osservato alcun effetto da parte dei terreni condizionati sulla proliferazione delle cellule N9 in condizioni con basali senza ATP, a dimostrazione del fatto che i terreni condizionati non aumentano di per sé la proliferazione cellulare, ma hanno un effetto protettivo specifico verso la tossicità indotta da ATP ad alte concentrazioni.

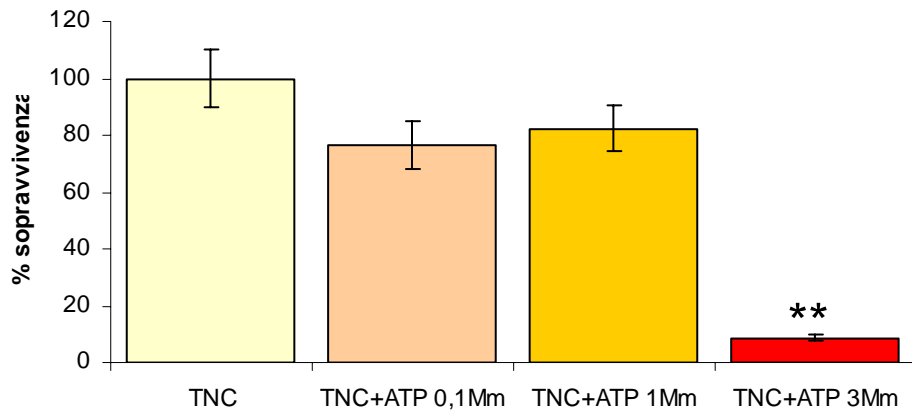


Fig.8. Effetto del trattamento con dosi crescenti di ATP sulla vitalità cellulare nelle cellule N9.

Cellule della linea N9, piastrate alla densità di 9000 cellule/pozzetto in piastre da 96 pozzetti, sono state incubate per 24 ore in TNC o in TNC addizionato di ATP alla concentrazione di 0,1, 1 o 3 mM. La vitalità cellulare è stata misurata mediante saggio MTT, e calcolata come percentuale rispetto al controllo. I risultati sono espressi come $M \pm ES$ di 8 determinazioni per gruppo di trattamento.

** $P < 0,001$ TNC + ATP 3 mM vs TNC, TNC + ATP 0,01 mM e TNC + ATP 1 Mm

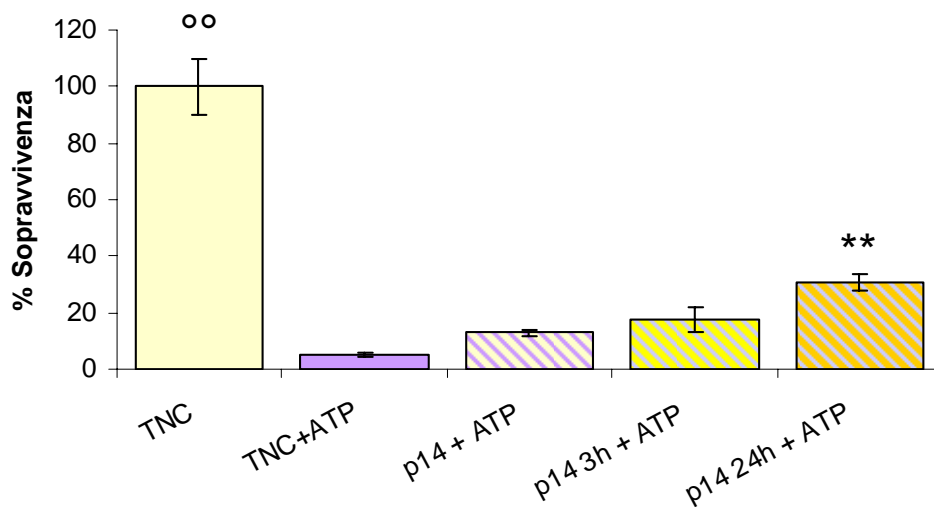


Fig. 9. Effetto della pre-incubazione con terreni condizionati da NSC sulla vitalità cellulare in cellule N9 trattate ATP.

Cellule N9, piastrate alla densità di 9000 cellule/pozzetto in piastre da 96 pozzetti, sono state pre-incubate in TNC o in terreno condizionato da NSC (P14) per 0, 3 o 24 ore prima dello stimolo con ATP 3 mM per 24 ore. Alla fine dell'incubazione con ATP è stata valutata, mediante saggio MTT, la vitalità cellulare, misurata come percentuale rispetto al controllo. I risultati sono espressi come $M \pm ES$ di 8 determinazioni per gruppo di trattamento.

°° $P < 0,001$ TNC vs TNC + ATP

** $P < 0,001$ P14 24h + ATP vs TNC + ATP

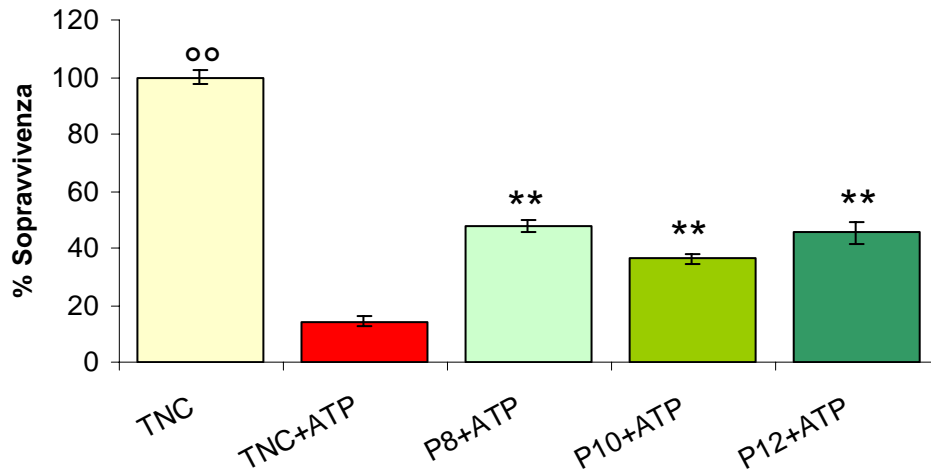


Fig. 10. Effetto della pre-incubazione con terreni condizionati da NSC ai passaggi di coltura P8, P10 e P12 sulla vitalità cellulare in cellule N9 trattate con ATP .

Cellule N9, seminate alla densità di 9000 cellule/pozzetto in piastre da 96 pozzetti, sono state pre-incubate in TNC o in terreni condizionato da NSC per 24 ore prima dello stimolo con ATP 3 mM per 24 ore. Alla fine dell'incubazione con ATP la vitalità cellulare è stata valutata mediante saggio MTT, e calcolata come percentuale rispetto al controllo. I risultati sono espressi come $M \pm ES$ di 8 determinazioni per gruppo di trattamento.

°° $P < 0,001$ P8 + ATP, P10 + ATP e P12 + ATP vs TNC + ATP

** $P < 0,001$ TNC vs TNC + ATP

Espressione di mRNA specifici per chemochine in cellule N9 stimulate con ATP

Per studiare il ruolo della microglia nell'induzione della migrazione cellulare nelle NSC abbiamo deciso di effettuare uno screening di espressione per le chemochine che in letteratura sono state precedentemente viste coinvolte nei meccanismi di richiamo di cellule staminali nel cervello.

Analogamente a quanto osservato per l'espressione delle citochine, l'incubazione delle cellule N9 per 3 ore con ATP 1mM provocava un incremento significativo anche dei livelli di mRNA per alcune molecole ad azione chemiotattica che sono normalmente indotte durante la risposta infiammatoria.

Tra queste abbiamo evidenziato la Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1) che è risultata aumentata del $74.41\% \pm 3.65$ rispetto al controllo ($p < 0,05$) (Fig.11).

Le citochine Interferon-inducibile Protein 10 (IP-10) e il Platelet Derived Growth Factor-b (PDGF-b) sono risultate aumentate rispettivamente del $27,62\% \pm 8,12$ e $8,22\% \pm 4,55$ di rispetto al controllo ($p < 0,05$) (Fig.12 e 13).

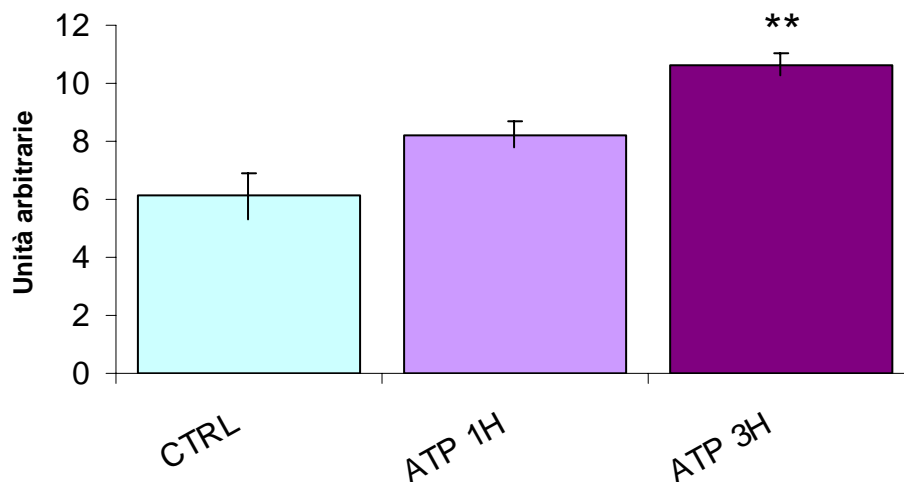


Fig.11. Espressione di mRNA per MCP-1 in cellule N9 pre-incubate con ATP.

Cellule della linea N9, seminate alla densità di 45×10^5 cell/pozzetto in piastre da 6 pozzetti, sono state incubate in TNC o in TNC addizionato di ATP 0,1 mM per 1 ora o per 3 ore. Le cellule sono state quindi raccolte con Trizol e l'RNA totale è stato utilizzato per determinare, mediante RT-PCR quantitativa, l'espressione di mRNA per MCP-1. L'housekeeping utilizzato è il gene per l'enzima GAPDH. I risultati sono espressi come $M \pm ES$ di 6 determinazioni per gruppo di trattamento.

** $P < 0,001$ ATP 3 ore vs CTRL

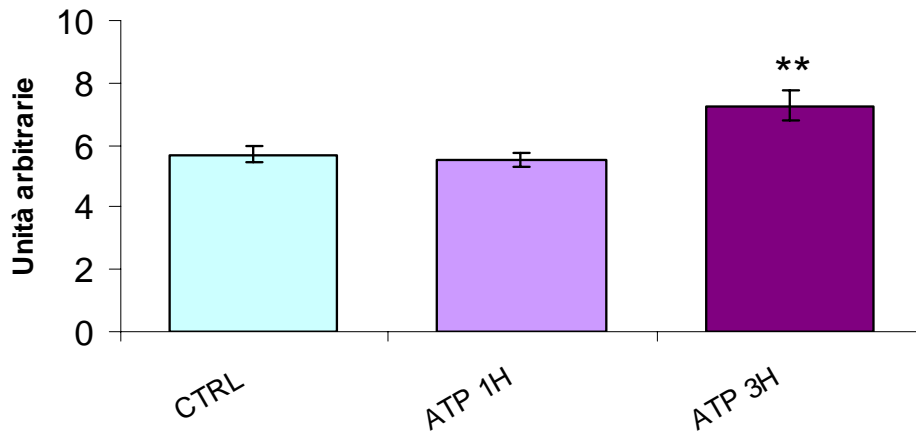


Fig. 12. Espressione di mRNA per IP-10 in cellule N9 trattate con ATP.

Cellule della linea N9, sono state trattate come descritto nella legenda della Figura 11. Le cellule sono state quindi raccolte con Trizol e l'RNA totale è stato utilizzato per determinare, mediante RT-PCR semiquantitativa l'espressione di mRNA per IP-10. L'housekeeping utilizzato è il gene per l'enzima GAPDH. I risultati sono espressi come $M \pm ES$ di 6 determinazioni per gruppo di trattamento.

* $P < 0,05$ ATP 3 ore vs CTRL

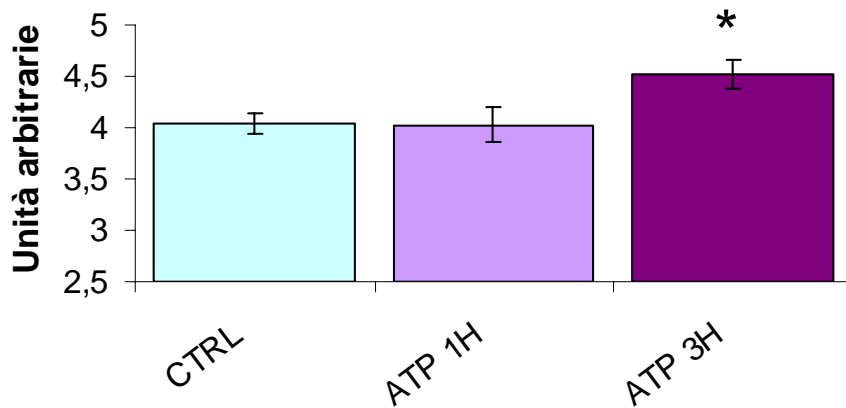


Fig. 13. Espressione di mRNA per PDGF-b in cellule N9 trattate con ATP.

Cellule della linea N9, sono state trattate come descritto nella legenda della Figura 11. Le cellule sono state quindi raccolte con Trizol e l'RNA totale è stato utilizzato per determinare, mediante RT-PCR semiquantitativa, l'espressione di mRNA per PDGF-b. L'housekeeping utilizzato è il gene per l'enzima GAPDH. I risultati sono espressi come $M \pm ES$ di 6 determinazioni per gruppo di trattamento.

* $P < 0,05$ ATP 3 ore vs CTRL

° $P < 0,05$ ATP 3 ore vs ATP 1 ora

Silenziamento genico di MPC-1

I risultati ottenuti sull'induzione dell'espressione di mRNA per alcune chemochine nelle cellule N9 stimulate con ATP hanno mostrato che, tra quelle prese in esame, MCP-1 era la chemochina che veniva maggiormente stimolata. Inoltre dati in letteratura supportano un coinvolgimento di MCP-1 nel richiamo di cellule staminali in diversi distretti dell'organismo. Per questi motivi si è deciso di approfondire ulteriormente il ruolo di MCP-1 mediante silenziamento genico con la tecnica dell'RNA interference (siRNA).

Messa a punto tecnica di RNA interference (1)

In fase di messa a punto delle condizioni ottimali per silenziare il gene di MCP-1 sono stati testati due diversi reagenti di trasfezione: N-TER (Sigma) e Hiperfect (Qiagen).

Nel primo esperimento abbiamo utilizzato un oligonucleotide di RNA marcato con Alexa Fluor 488. Questo fluoroforo, visibile nel campo del verde, permette di verificare al microscopio a fluorescenza l'effettivo ingresso di siRNA nelle cellule N9 contro-colorate a livello nucleare con l'intercalante Hoechst (Fig 14).

Per il reagente Hiperfect, in accordo con il protocollo suggerito dall'azienda, sono state testate diverse quantità di reagente di trasfezione in combinazione con concentrazioni di siRNA crescenti, ovvero, 5 e 10µl di reagente di trasfezione in 100µl di soluzione di trasfezione, sono stati testati con siRNA marcato alle concentrazioni di 5 e 10 nM.

Per il reagente N-TER, è stato mantenuto costante il rapporto reagente/siRNA, come suggerito dal protocollo fornito dalla ditta produttrice, e sono state testate concentrazioni di siRNA crescenti : N-TER + siRNA 5, 10, 20nM.

Tra le condizioni utilizzate abbiamo osservato che esse determinavano innanzitutto una differenza nella distribuzione della fluorescenza a livello citoplasmatico, in quanto con il reagente Hiperfect tale distribuzione risulta a piccoli aggregati puntiformi, mentre con N-ter risulta più diffusa. Il maggior livello di fluorescenza è stato osservato con Hiperfect 10µl + siRNA 10nM, mentre la condizione migliore per il protocollo N-TER è risultata essere quella con la maggior concentrazione di siRNA (20nM).

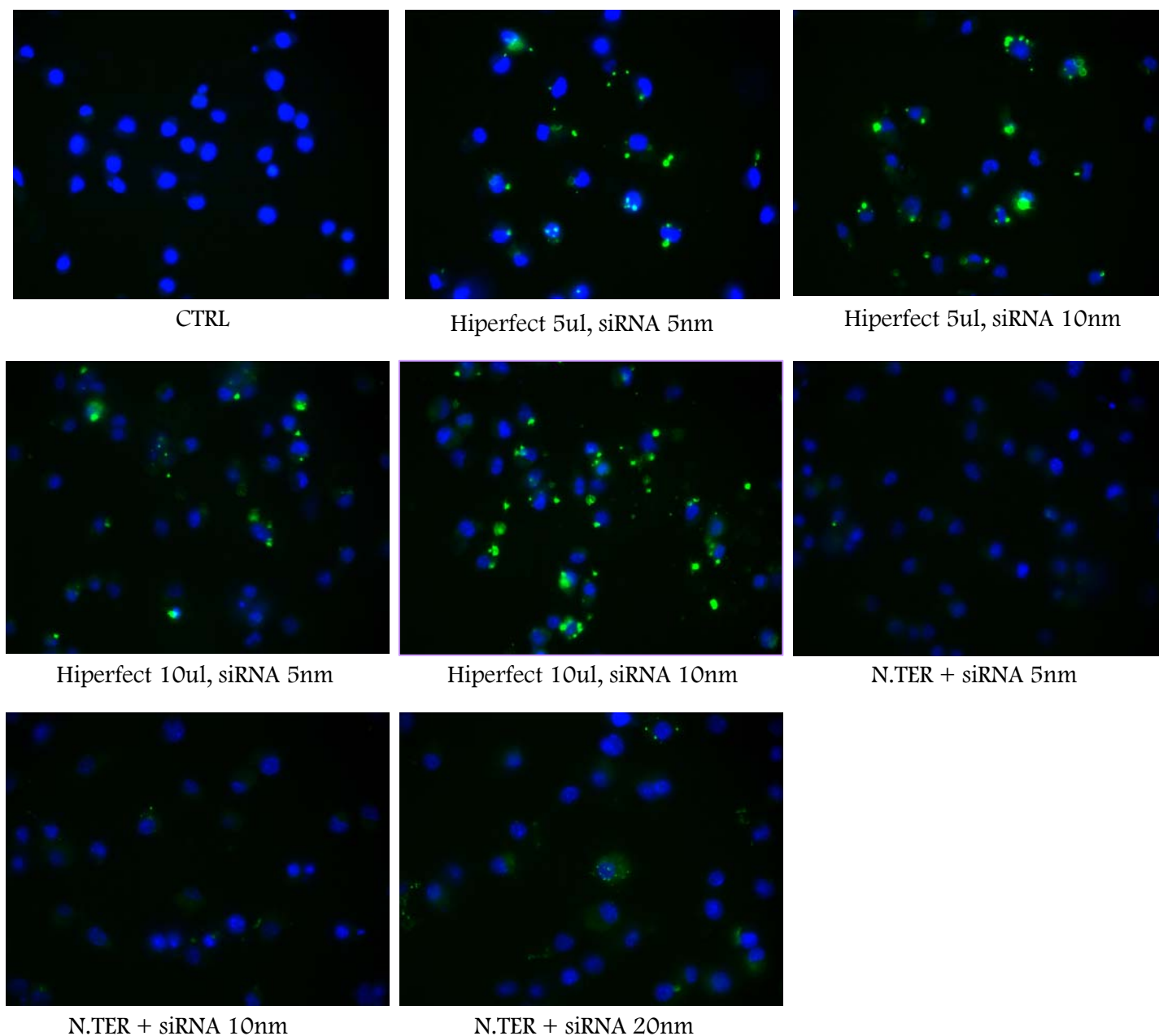


Fig. 14. Trasfezione transiente delle cellule N9 con siRNA marcato con Alexa Fluo488

Cellule N9 sono state seminate alla densità di 300000 cellule/pozzetto su vetrini da 2.5 mm di diametro collocati in piastre da 6 pozzetti. La trasfezione è stata effettuata dopo 24 ore dalla semina (60-70% di confluenza) mediante incubazione per 6 ore con le soluzioni di trasfezione da testare.

Dopo 18 ore le cellule sono state lavate e fissate con paraformaldeide 4%. I nuclei sono state quindi marcati con il colorante nucleare fluorescente Hoechst. I vetrini sono stati montati per l'analisi delle immagini al microscopio a fluorescenza. L'Alexa-fluo 488 emette fluorescenza verde e indica la presenza di siRNA all'interno della cellula. Da un punto di vista qualitativo abbiamo potuto apprezzare la presenza di Alexa-Fluo488 in prossimità dei nuclei delle cellule N9 che hanno subito trasfezione.

Ottimizzazione della tecnica di RNA interference (2)

Nelle fasi successive di messa a punto abbiamo utilizzato le diverse condizioni sperimentali, a partire da quelle suggerite grazie all'esperimento col siRNA fluorescente, per testare l'efficacia di silenziamento del gene MCP-1 nelle cellule N9.

Il grafico in figura 15 riassume i dati di silenziamento percentuale relativi alle diverse condizioni sperimentali testate rispetto al gruppo di controllo, trasfettato con un siRNA controllo, che non è in grado di riconoscere nessuna sequenza del genoma murino.

Abbiamo testato le seguenti condizioni di trasfezione:

N-TER:

- siRNA 20nM;
- siRNA 30nM,
- siRNA 60 nM

Hiperfect:

- Hip 5 μ l + siRNA 10 nM
- Hip 10 μ l + siRNA 5 nM
- Hip 10 μ l + siRNA 10 nM
- Hip 20 μ l + siRNA 20 nM

I risultati di espressione di MCP-1 mostrano che la trasfezione con il reagente N-TER ha determinato una significativa diminuzione dell'espressione dell'mRNA di MCP-1 a partire dalla concentrazione di siRNA 30nM (29.9 % di silenziamento \pm 3.2 $p < 0.001$ vs CTRL). Il massimo di silenziamento è stato ottenuto utilizzando una concentrazione di siRNA 60nM (77.53% \pm 4.03 di inibizione dell'espressione rispetto al controllo $p < 0.001$).

Con il protocollo che prevede l'utilizzo del reagente Hiperfect abbiamo variato sia la quantità di reagente di trasfezione sia la concentrazione finale di siRNA.

Alle condizioni che nell'esperimento precedente avevano evidenziato un significativo ingresso del siRNA a livello citoplasmatico abbiamo osservato che si verificava una significativa riduzione dell'espressione di MCP-1:

Hiperfect 5 μ l + siRNA 10nM: 18.16 % di riduzione \pm 4.3 ($p < 0.001$ vs CTRL);

Hiperfect 10 μ l + siRNA 5nM: 42,68 % di riduzione \pm 2.2 ($p < 0.001$ vs CTRL);

Hiperfect 10 μ l + siRNA 10nM: 33.06 % di riduzione \pm 4.7 ($p < 0.001$ vs CTRL);

La condizione che si è rivelata maggiormente efficace nell'indurre il silenziamento genico è quella composta da Hiperfect 20 μ l + siRNA 20nM, che ha dato una riduzione di espressione del 79.13% \pm 3.7 (p<0.001 vs CTRL).

Il reagente Hiperfect è risultato efficace nel determinare una riduzione di espressione di MCP-1 in modo paragonabile al reagente N-TER (N-TER 77.53% \pm 4.03, Hiperfect 79.13% \pm 3.7), ma tale risultato è stato raggiunto con una minore concentrazione di siRNA presente nella soluzione di trasfezione, perciò il protocollo con Hiperfect è stato scelto come protocollo d'elezione per i successivi esperimenti di silenziamento genico

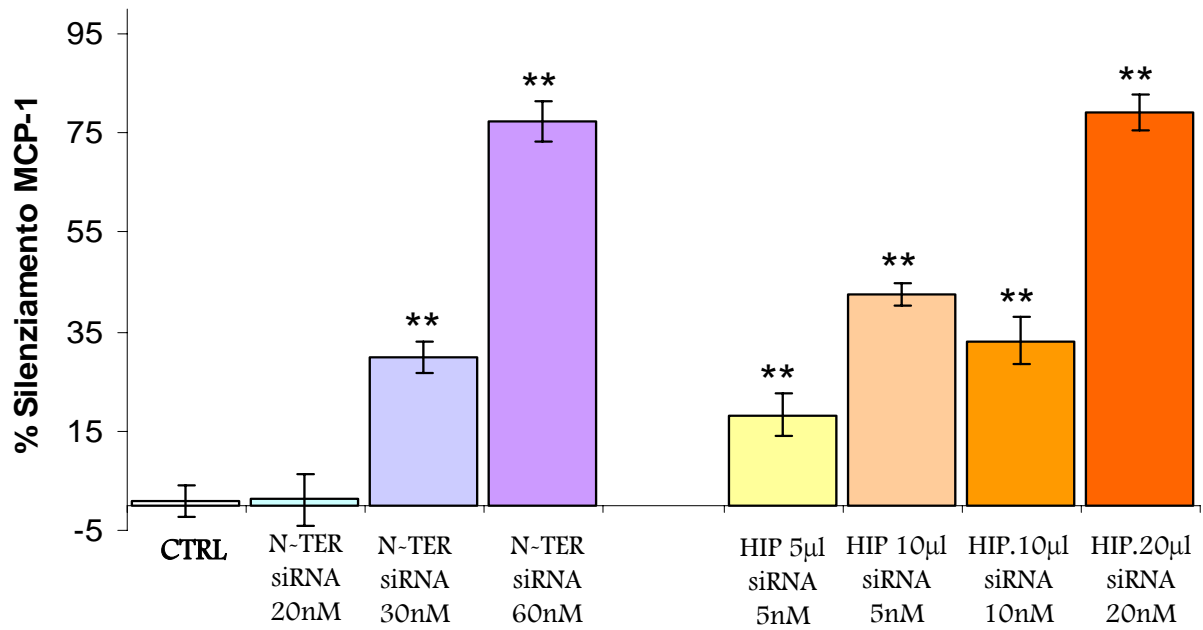


Figura 15. Silenziamento del gene MPC-1 mediante la tecnica dell'RNA-interference.

Cellule N9 sono state seminate alla densità di 450.000 cellule/pozzetto in piastre da 6 pozzetti. Le N9 sono state trasfettate mediante i protocolli precedentemente descritti utilizzando i reagenti di trasfezione N-TER (Sigma) e Hiperfetc (Qiagen). Il gruppo CTRL è stato trasfettato con siRNA di controllo.

Dopo 24 ore dalla trasfezione le cellule sono state raccolte con Trizol e l'RNA totale è stato utilizzato per determinare, mediante RT-PCR quantitativa, l'espressione di mRNA per MCP-1. L'housekeeping utilizzato è stato il gene per l'enzima GAPDH. I risultati sono espressi come $M \pm ES$ della percentuale di silenziamento misurata in 6 determinazioni per gruppo di trattamento.

** $P < 0,01$ vs CTRL

Modulazione della tras migrazione delle NSC da parte delle cellule N9

Esperimenti preliminari avevano evidenziato che le cellule N9 stimolate con ATP 1mM sono in grado di stimolare la tras migrazione spontanea delle NSC in vitro. (dati non mostrati).

Al fine di studiare il ruolo di MCP-1 nell'induzione di tras migrazione delle NSC da parte delle cellule N9 abbiamo deciso di silenziare MCP-1 nelle N9 mediante la tecnica dell'RNA interference.

Le cellule N9 sono state seminate in piastre da 6 pozzetti, e dopo 24 ore di crescita sono state trasfettate con siRNA per silenziare l'espressione di MCP-1. Dopo ulteriori 24 ore dalla trasfezione il terreno delle N9 è stato cambiato con IMDM fresco privo di siero fetale bovino. Sono stati applicati alla piastra gli inserti Transwell, dotati di membrana in policarbonato da 8 μ m su cui sono state caricate 1 milione di NSC disaggregate e risospese in 1 ml di IMDM senza siero.

Le due popolazioni cellulari sono in contatto attraverso i medium di coltura e le cellule staminali possono ricevere attraverso la membrana eventuali segnali chemotattici liberati dalle cellule di microglia sottostanti. I pori della membrana hanno permesso alle cellule NSC di tras migrare nel pozzetto sottostante.

I trattamenti per indurre o meno la tras migrazione delle NSC sono effettuati sulle N9. Un gruppo sperimentale è trattato con FBS al 2% come controllo positivo della tras migrazione. Come atteso, la presenza di FBS al 2% nel terreno di coltura nel pozzetto ha stimolato l'aumento di tras migrazione delle NSC a livelli significativamente superiori a quella spontanea con un aumento medio del 76,4% (numero di NSC tras migrate con N9 medio: FBS 2% 27343,6 \pm 1770.7, CTRL 15499.9 \pm 1349.9; $p < 0.001$).

Il trattamento delle N9 WT con ATP 1mM ha indotto un aumento del 87% della migrazione spontanea nelle NSC rispetto alle N9 wt utilizzate come gruppo di controllo (N9 wt CTRL 15156 \pm 2969, N9 wt + ATP: 28333.33 \pm 1780 $P < 0.001$);

Il silenziamento di MCP-1 nelle N9 ha ridotto la capacità delle cellule N9 di indurre un aumento di tras migrazione nelle cellule staminali neuronali dopo trattamento con ATP (N9 + siRNA MCP-1 CTRL 15729.17 \pm 1752.3, N9 + siRNA MCP-1 + ATP: 14296.88 \pm 2494.7 $p = 0.651$) (Fig 16)

Questo risultato indica chiaramente un ruolo cruciale di questa chemochina nella stimolazione della migrazione cellulare delle NSC da parte della microglia attivata con ATP.

Medie del numero di NSC trasigrate nei singoli gruppi sperimentali:

N9 (wt) CTRL : 15156 ± 2969

N9 (wt) + FBS 2% : $24296,6 \pm 780$

N9 (wt) + ATP : 28333.33 ± 1780 ;

N9 (siRNA MCP-1) CTRL : 15729.17 ± 1752.3

N9 (siRNA MCP-1) + FBS 2% : $30390,63 \pm 2799.08$

N9 (siRNA MCP-1) + ATP : 14296.88 ± 2494.7

Abbiamo verificato l'espressione di MCP-1 nelle N9 utilizzate per l'esperimento di tras migrazione mediante PCR quantitativa. L'espressione è risultata diminuita del 57% (N9 WT 12.89 ± 1.75 vs N9 siRNA MCP-1 5.56 ± 0.48 , $p < 0.01$) (Fig.17).

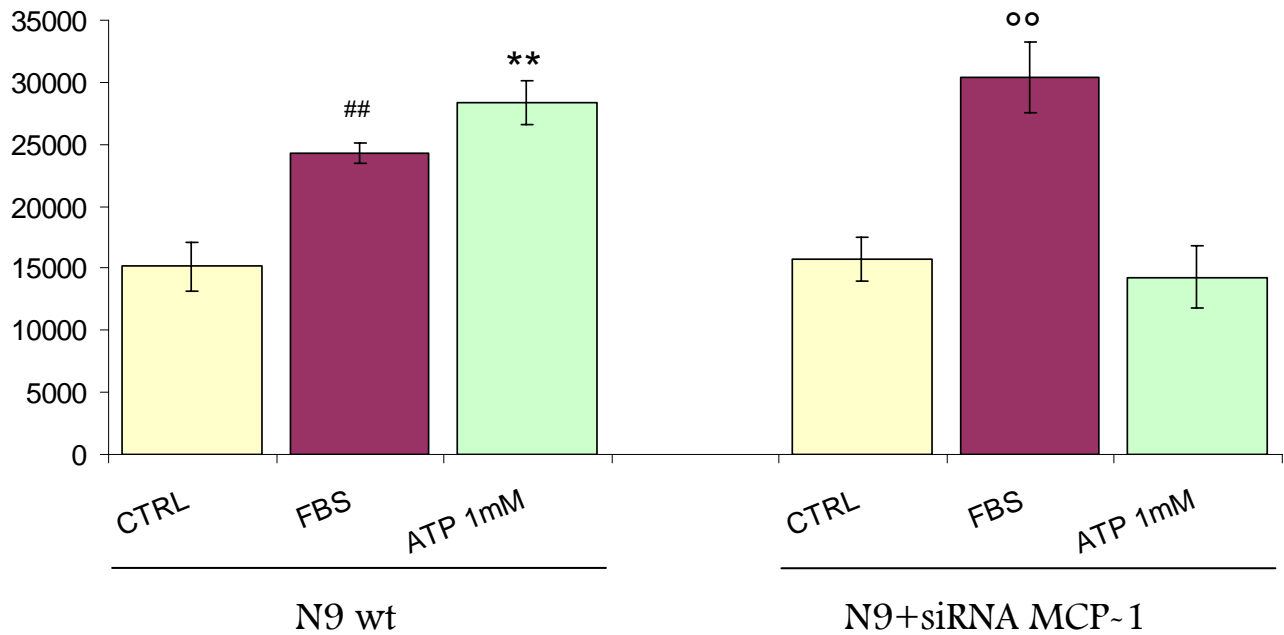


Figura 16. Trasmigrazione di cellule NSCs in contatto con cellule N9 stimulate con ATP1mM e silenziate o meno per la chemochina MCP-1.

Cellule N9 seminate alla densità di 450000 cellule/pozzetto in piastre da 6 pozzetti sono state silenziate per l'espressione di MCP-1 mediante trasfezione con siRNA. Dopo 24 ore dalla trasfezione è stata valutata la capacità delle N9 di indurre un aumento di trasmigrazione spontanea nelle NSCs poste in un inserto con membrana in contatto attraverso il medium di coltura per 4 ore

P< 0,01 N9 wild-type FBS 2% vs N9 wild-type CTRL, ** P< 0,01 N9 wild-type + ATP1mM vs N9 wild-type CTRL, °° P< 0,01 N9 silenziate + FBS 2% vs N9 silenziate CTRL e vs N9 silenziate + ATP 1mM.

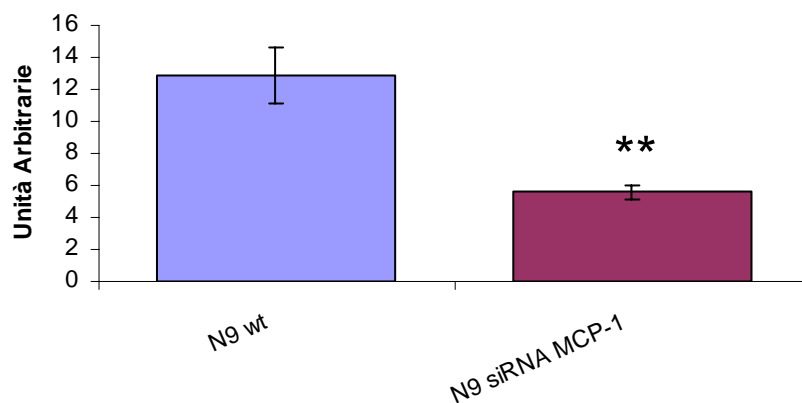


Fig. 17 Espressione MCP-1 nelle cellule N9 utilizzate durante l'esperimento di trasmigrazione delle cellule staminali neuronali.

** P< 0,01 N9 trasfettate con siRNA MCP-1 vs N9 trasfettate con siRNA CTRL -

Effetti della stimolazione con ATP sulla mobilizzazione del Ca²⁺ intracellulare nelle cellule di Schwann immortalizzate IMS32 e modulazione da parte del terreno condizionato da NSC.

Le cellule di Schwann sono esposte ad alte concentrazioni di ATP nei siti di lesione dei nervi periferici ed il coinvolgimento dei recettori purinergici espressi sia nelle cellule microgliali che nelle cellule di Schwann è stato ampiamente evidenziato. E' stato ipotizzato, inoltre, che le cellule di Schwann abbiano un ruolo rilevante nell'insorgenza e mantenimento del dolore neuropatico.

Abbiamo quindi preso in esame se l'effetto da parte dei terreni condizionati sull'inibizione della liberazione del Ca²⁺ intracellulare osservato nelle cellule di microglia N9 possa essere presente anche nelle cellule di Schwann.

Anche per le IMS32 gli esperimenti dose-effetto hanno indicato che la concentrazione di ATP 0,1mM è in grado di indurre riproducibilmente l'aumento massimale del Ca²⁺ libero intracellulare (dato non mostrato), ed è stata quindi utilizzata per valutare l'azione del terreno condizionato da NSCs. La pre-incubazione con terreno condizionato è stata protratta per 3 ore, come nel precedente esperimento e per 24 ore per verificare se un'incubazione ancora più prolungata esacerbasse gli effetti osservati. La preincubazione per 3 e 24 ore con terreni condizionati ha determinato una riduzione significativa ($p < 0.001$) della liberazione di Ca²⁺ intracellulare rispetto ai valori misurati nelle cellule pre-incubate in terreno non condizionato: l'aumento della fluorescenza è infatti stato pari a $84.5 \% \pm 7.8$ nel gruppo TNC+ATP, mentre tale valore si abbassava a $55,31 \% \pm 4.5$ per P9 3h+ATP e $43.35 \% \pm 3.5$ per P9 24h+ATP. ($p < 0.05$) (Fig.3)

Non sono state rilevate differenze significative tra gli effetti indotti dall'incubazione di 3 rispetto a quella per 24 ore in terreno condizionato. ($p = 0.352$)

E' da notare che gli effetti determinati dai terreni condizionati nelle cellule di Schwann IMS32 sono quantitativamente e qualitativamente diversi da quelli osservati nelle cellule di microglia N9. Infatti nelle IMS32 l'entità di inibizione è minore, arrivando al massimo al 41,17%, mentre nelle cellule N9 la riduzione massima raggiungeva il 90 %; inoltre, la forma delle curva di fluorescenza misurate nei due tipi cellulari è molto diversa, probabilmente ad indicare il coinvolgimento di sottotipi diversi di recettori purinergici

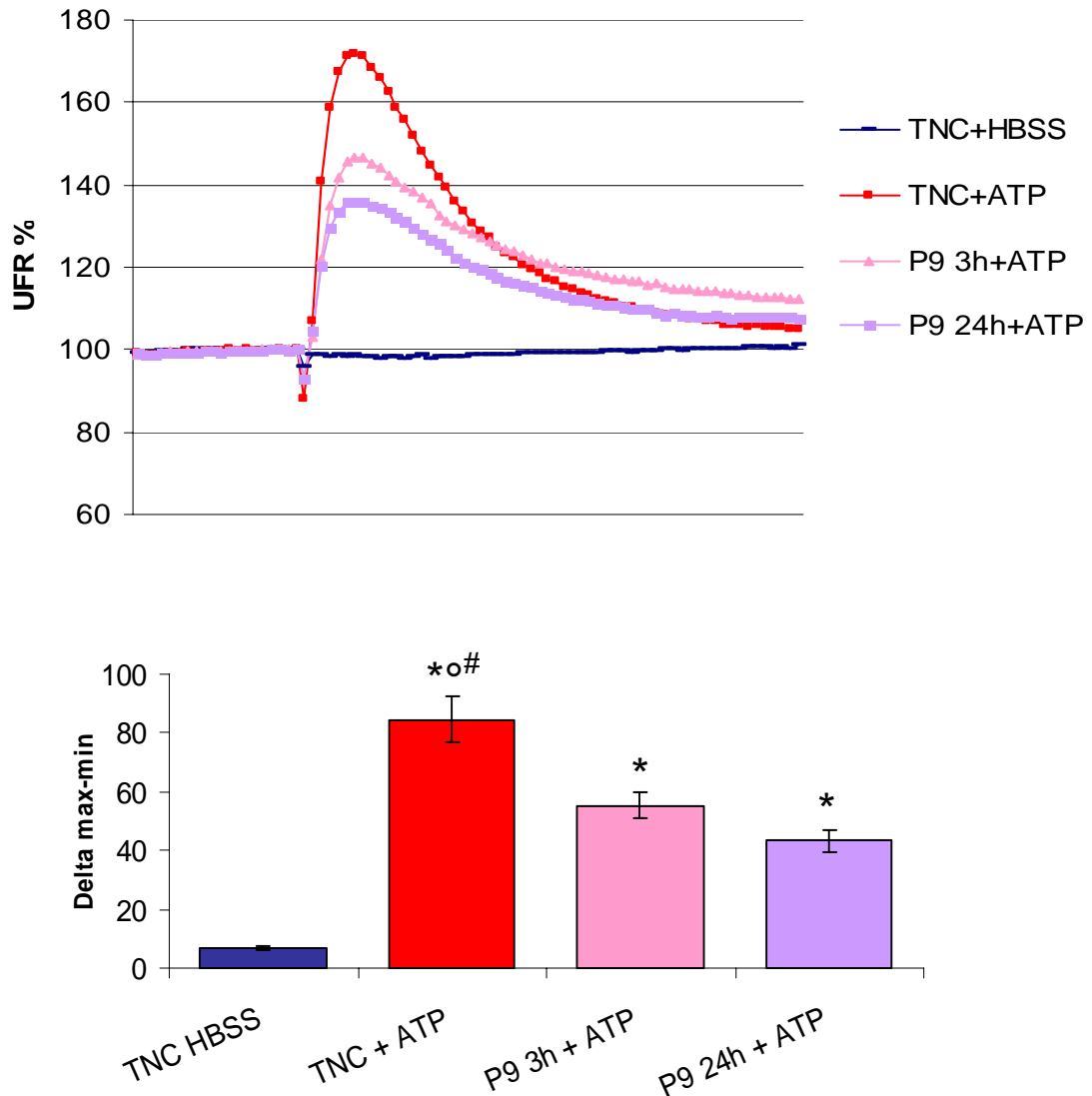


Fig.18. Effetto della pre-incubazione in terreno condizionato da NSC nelle cellule IMS32 sulla mobilizzazione del Ca^{2+} intracellulare indotta da ATP.

Cellule della linea IMS32, seminate alla densità di 50000 cellule/pozzetto in piastre da 96 pozzetti, sono state preincubate per 3 o 24 ore in terreno non condizionato (TNC) o condizionato da NSC al passaggio di coltura P9, e successivamente stimolate con ATP 0,1 mM. Gli effetti della stimolazione con ATP sulla mobilizzazione del Ca^{2+} intracellulare sono stati determinati mediante saggio fluorimetrico, dopo aver incubato le cellule IMS32 in Fluo-4 NW per 40 minuti, a 37°C.

Pannello superiore: andamento delle modificazioni della fluorescenza a seguito della stimolazione con ATP. Pannello inferiore: stessi dati del pannello superiore, ricalcolati come differenza tra il punto di stimolazione massima e il basale di ogni singola curva. I risultati sono espressi come $M \pm ES$ del $\Delta_{\text{max-min}}$ di 10 determinazioni per gruppo di trattamento.

* $P < 0,05$ TNC + ATP, P93h+ATP, P9 24h+ATP vs TNC+HBSS

° $P < 0,05$ TNC + ATP vs P9 3h + ATP

$P < 0,05$ TNC + ATP vs P9 24h + ATP

Effetti dei terreni condizionati da NSC sulla sopravvivenza delle cellule di neuroblastoma Neuro2A stimulate con dosi tossiche di ATP

Alla luce dei risultati di neuroprotezione osservati con le cellule N9 da parte dei terreni condizionati da NSC, ci siamo chiesti se anche il danno neuronale indotto dall'ATP potesse essere modulato da parte dei terreni condizionati dalle NSC. Abbiamo quindi deciso di verificare mediante saggio MTT l'effetto sulla tossicità da ATP in una linea neuronale immortalizzata. In questi esperimenti sono state utilizzate cellule di neuroblastoma Neuro2A.

Le cellule Neuro2A sono state trattate con le dosi di ATP utilizzate precedentemente per verificare la loro sensibilità all'azione tossica di ATP. Anche in questo caso il trattamento per 24 ore con la dose ATP 3mM si è dimostrato avere un effetto tossico: la sopravvivenza cellulare è diminuita infatti del $77,32\% \pm 2,5\%$ nel gruppo trattato con ATP 3Mm rispetto al controllo ($p < 0,001$) (Fig.19).

Queste condizioni sperimentali sono state scelte per indurre tossicità negli esperimenti successivi.

Le cellule di neuroblastoma sono state seminate in piastra da 96 pozzetti alla concentrazione di 20.000 cellule/pozzetto. Dopo il raggiungimento della confluenza (48 ore) abbiamo pre-incubato le cellule Neuro2A per 24 ore con terreno condizionato da NSC prelevato al passaggio P10, quindi incubato le cellule con ATP 3mM per 24 ore, al termine delle quali abbiamo misurato la vitalità cellulare mediante saggio MTT.

Il pretrattamento con il terreno condizionato da staminali al P10 è risultato in grado di aumentare significativamente la sopravvivenza delle Neuro2A dal $13,6\% \pm 0,65$ al $47,7\% \pm 2,39$ ($p < 0,01$) (Fig.20).

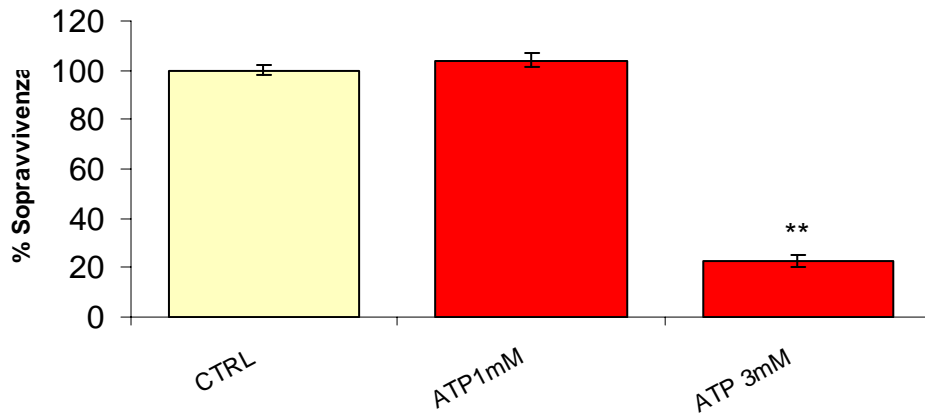


Fig.19. Effetto del trattamento con ATP a diverse concentrazioni sulla vitalità di cellule di neuroblastoma Neuro2A.

Cellule Neuro2A seminate alla densità di 20.000 cellule/pozzetto in piastre da 96 pozzetti, sono state trattate con ATP 1 mM e 3 mM per 24 ore. E' stata quindi valutata la vitalità cellulare mediante saggio MTT. I dati sono stati calcolati come percentuale del controllo, ed espressi come la $M \pm ES$ di 8 determinazioni per gruppo di trattamento.

** $p < 0,001$ ATP 3Mm vs CTRL

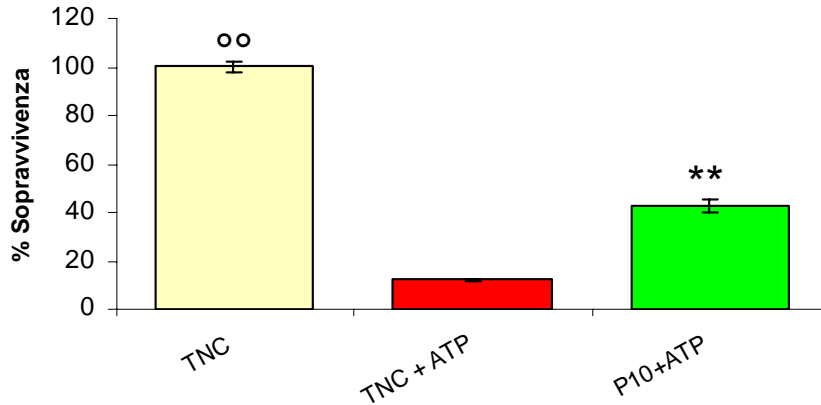


Fig. 20. Effetto della pre-incubazione con terreni condizionati da NSC sulla vitalità cellulare in cellule di neuroblastoma Neuro2A trattate ATP.

Cellule della linea Neuro2A, seminate alla densità di 20000 cellule/pozzetto in piastre da 96 pozzetti, sono state pre-incubate in TNC o in terreno condizionato da NSC (P10) per 24 ore prima dello stimolo con ATP 3 mM per 24 ore. La vitalità cellulare è stata valutata mediante saggio MTT. I dati sono stati calcolati come percentuale del controllo, ed espressi come la $M \pm ES$ di 8 determinazioni per gruppo di trattamento.

°° $P < 0,001$ TNC vs TNC + ATP

** $P < 0,001$ P10+ ATP vs TNC + ATP

DISCUSSIONE

La neuroinfiammazione è un processo mediato da citochine spesso associato ad un danno diretto del sistema nervoso centrale o periferico. Lo scopo primario del processo neuroinfiammatorio consiste nell'attivare meccanismi atti a proteggere i neuroni sopravvissuti all'insulto; tuttavia se l'entità del fenomeno infiammatorio supera una certa soglia, può produrre effetti negativi e addirittura esacerbare il danno neuronale. Gli elementi cellulari maggiormente coinvolti nella neuroinfiammazione sono gli astrociti e le cellule della microglia; queste ultime, attivate da diversi mediatori cerebrali, producono numerose molecole pro-infiammatorie, anti-infiammatorie e immunomodulatorie atte a sostenere e ad amplificare il processo infiammatorio stesso. Poiché un'attivazione microgliale prolungata e incontrollata risulta deleteria per i neuroni l'inibizione dello stato neuroinfiammatorio costituisce oggi un target d'elezione nella ricerca di strategie atte a limitare il danno neuronale.

In caso di lesione neuronale vengono rilasciate ingenti quantità di mediatori tra i quali l'ATP che, tramite l'interazione con specifici recettori purinergici svolge un ruolo di primo piano attivando le cellule microgliali.

In questi ultimi anni, allo scopo di contrastare la degenerazione neuronale che caratterizza diverse patologie, numerosi studi sono stati condotti alla definizione di una strategia terapeutica basata sul trapianto di cellule staminali neuronali (NSC). Il razionale del loro impiego trae origine dalla loro presunta capacità di proliferare e differenziare in cellule neuronali all'interno del parenchima cerebrale; in tal modo, esse potrebbero sostituire i neuroni e i circuiti neuronali danneggiati.

Tuttavia, le più recenti evidenze sperimentali dimostrano che gli effetti positivi esercitati dalle NSC sulla lesione neuronale in modelli animali di patologie neurodegenerative non sono frutto unicamente del processo di differenziamento in cellule neuronali, bensì il risultato di modificazioni dell'ambiente extracellulare dell'area colpita ad opera delle cellule staminali stesse (Capone, Frigerio et al. 2007).

Diversi studi attestano infatti la presenza di interazioni tra cellule della microglia e le NSC: in modelli murini di ischemia cerebrale il trapianto di NSC determina una significativa proliferazione della microglia nell'area della lesione (Capone, Frigerio et al. 2007).

Alla luce di tali evidenze sperimentali, la nostra ricerca si è proposta di studiare le possibili interazioni tra cellule microgliali attivate e NSC, utilizzando un modello *in vitro* costituito da cellule N9, una linea immortalizzata di microglia murina, stimolata con ATP e coltivata in presenza di terreni condizionati da NSC.

I risultati ottenuti dimostrano che la pre-incubazione delle cellule di microglia N9 nei terreni condizionati da NSC conferisce loro una minore suscettibilità allo stimolo pro-infiammatorio dell'ATP. Tale effetto è risultato evidente su diversi aspetti funzionali delle cellule N9, quali la mobilitazione del calcio intracellulare, indice di attivazione cellulare, la modificazione

dell'espressione genica di molecole pro-infiammatorie, come TNF- α e COX-2 e, infine, la proliferazione cellulare.

Infatti, l'incubazione delle cellule N9 nei terreni condizionati da NSC è in grado di diminuire significativamente la liberazione del calcio intracellulare stimolata dall'ATP, suggerendo che i terreni condizionati dalle NSC contengano dei fattori solubili in grado di contrastare l'azione diretta dell'ATP sui recettori purinergici. Al momento tali fattori non sono noti.

Tra i recettori purinergici, il sottotipo P2X₇ sembrerebbe svolgere un ruolo critico nella modulazione del processo neuroinfiammatorio sostenuto dalla microglia; infatti, l'inibizione di tale recettore nella microglia attivata sembrerebbe ridurre la risposta infiammatoria sia *in vivo* che *in vitro* ed esercitare un effetto neuroprotettivo *in vivo* (Choi, Hong et al. 2003). Ulteriori studi saranno necessari per individuare quale, tra i fattori rilasciati dalle NSC, sia in grado di interferire con l'attivazione microgliale mediata dal recettore P2X₇.

Segnalazioni della letteratura evidenziano che l'attivazione del TNF- α avviene nelle prime fasi dell'ischemia cerebrale. Tale citochina promuove l'avvio delle fasi precoci del processo infiammatorio, incrementando l'espressione di fattori chemiotattici e di molecole di adesione da parte dell'endotelio vascolare, che, a loro volta, favoriscono l'infiltrazione di cellule del sistema immunitario nel sito della lesione (Wang, Tang et al. 2007). Tuttavia, è stato dimostrato che la modulazione dell'attività del TNF- α nelle fasi precoci dell'ischemia riduce il danno neuronale, e migliora l'outcome neurologico in modelli animali di patologia ischemica (Hosomi, Ban et al. 2005).

In accordo con i dati della letteratura, i risultati da noi ottenuti dimostrano che, nel nostro modello *in vitro*, la stimolazione delle cellule N9 con ATP induce un aumento dell'espressione di mRNA per TNF- α , mimando in parte ciò che accade *in vivo*. L'incubazione delle cellule N9 con i terreni condizionati da NSC è in grado di ridurre l'espressione di TNF- α e di COX-2, confermando che le NSC sarebbero capaci di modulare la risposta pro-infiammatoria nelle cellule N9 attraverso il rilascio di fattori solubili.

A sostegno di questa ipotesi, dati recenti presenti in letteratura riportano che le NSC iniettate in modelli murini di ischemia cerebrale emorragica riducono il danno neurologico, esibendo proprietà anti-apoptiche e anti-infiammatorie (Lee, Chu et al. 2008).

Oltre all'incremento di TNF- α e di COX-2 osservato nelle cellule N9 stimulate con ATP, i nostri risultati dimostrano anche un aumento dell'espressione di IL-10, una citochina dotata di attività anti-infiammatoria. Poiché la IL-10 risulta stimolata in concomitanza con altre molecole pro-infiammatorie, potrebbe rappresentare un fattore della risposta immediata delle cellule N9, finalisticamente volta allo spegnimento del segnale infiammatorio.

Gli esperimenti condotti per valutare la vitalità cellulare delle cellule N9 stimulate con ATP ed esposte ai terreni condizionati dalle NSC avvalorano l'ipotesi che le NSC siano in grado di interagire con le cellule microgliali, riducendo da una parte l'attivazione mediata dall'interazione tra l'ATP e i recettori purinergici, ed esercitando dall'altra un effetto anti-infiammatorio e protettivo nei confronti della morte cellulare.

Tale azione protettiva riveste un'importanza cruciale in riferimento alla popolazione neuronale che subisce il danno primario in seguito all'evento ischemico. L'osservazione che fattori solubili prodotti dalle cellule staminali neuronali siano protettivi, in modo specifico verso l'effetto tossico di ATP, anche verso la linea neuronale Neuro2A dimostra che l'azione delle NSC nel cervello non è da ricercarsi unicamente nella produzione di fattori trofici o nel replacement cellulare, ma anche nella produzione di fattori che prevengono la suscettibilità all'insulto da ATP.

Il fatto che il prolungamento da un'ora a tre ore dell'esposizione delle cellule N9 ai terreni condizionati da NSC negli esperimenti per la valutazione del rilascio di calcio, e da tre a ventiquattro ore in quelli per la misurazione della vitalità cellulare, si sia rivelato maggiormente efficace nell'attenuare la risposta delle cellule N9 allo stimolo pro-infiammatorio fa inoltre supporre che l'azione dei fattori solubili rilasciati dalle NSC sulle cellule N9 sia di tipo lento, e che probabilmente sia mediato, a sua volta, da altri meccanismi al momento non noti.

Tra le proprietà delle cellule microgliali è stata ampiamente descritta in letteratura la loro capacità di attrarre la migrazione delle cellule staminali nel sito della lesione mediante la produzione di sostanze con attività chemio tattica successivamente ad un danno cerebrale localizzato (Aarum, Sandberg et al. 2003; Lepore, Han et al. 2004). I nostri risultati dimostrano che la stimolazione delle cellule N9 con ATP induce un aumento dell'espressione di molecole chemiotattiche quali MIP-1, MCP-1, IP-10 e PDGF-b, descritto come descritto anche da altri autori sia *in vivo* che *in vitro* (Belmadani, Tran et al. 2006; Rebenko-Moll, Liu et al. 2006; Kataoka, Tozaki-Saitoh et al. 2009).

E' noto che MCP-1 è sintetizzato *in vivo* nel corso del processo neuroinfiammatorio ed è importante per la migrazione dei leucociti nel SNC; questo fenomeno si è riscontrato anche per le cellule staminali trapiantate nel cervello. Alcuni dati interessanti dimostrano che l'entità del fenomeno migratorio risulta significativamente ridotta nel caso in cui le NSC siano prodotte a partire da topi knock-out per il recettore di MCP-1 (CCR2) (Belmadani, Tran et al. 2006). In un elegante esperimento condotto in un modello ex-vivo, le NSC ottenute da topi KO per CCR2 sono state trapiantate su fettine organotipiche di ippocampo (prelevate da topi wild-type dello stesso ceppo), e la loro migrazione cellulare è risultata significativamente ridotta rispetto alle

NSC ottenute da topi wt. Questo risultato indica il coinvolgimento diretto di MCP-1 nella migrazione dei progenitori in condizioni di neuroinfiammazione (Belmadani, Tran et al. 2006).

Il ruolo di MCP-1, insieme ad altri fattori chemiotattici, come SDF-1, è stato dimostrato nell'induzione di trasmigrazione anche da parte degli astrociti in un modello *in vitro* di ipossia (Xu, Wang et al. 2007).

Nel nostro modello di trasmigrazione *in vitro* abbiamo confermato che le cellule microgliali sono in grado di indurre un aumento della trasmigrazione spontanea nelle NSC in seguito a stimolazione con ATP. Il silenziamento genico di MCP-1 nelle cellule microgliali mediante RNA interference ha determinato l'inibizione dell'effetto pro-migratorio delle cellule microgliali N9 stimulate con ATP. Questi risultati dimostrano il ruolo cruciale di MCP-1 nel richiamo di cellule staminali da parte della microglia.

L'osservazione che i fattori solubili rilasciati dalle cellule staminali siano in grado di interferire nella stimolazione da ATP di altri tipi cellulari ci ha fatto interrogare su altre possibili patologie nelle quali l'ATP svolge un possibile ruolo eziopatogenico. Tra queste, il **dolore neuropatico** è una patologia che desta oggi particolare interesse. Abbiamo voluto indagare se i fattori solubili prodotti dalle cellule staminali embrionali possono avere un effetto protettivo anche in un modello murino di sviluppo del dolore neuropatico. In particolare, ci siamo interessati ai fenomeni di attivazione delle cellule di Schwann, che sono coinvolte già nelle primissime fasi del danno ai nervi periferici. Esse sono esposte all'ATP liberato in seguito alla lesione e sono in grado di produrre fattori pro-infiammatori scatenanti della risposta immunitaria. Per questi esperimenti abbiamo utilizzato una linea di cellule di Schwann immortalizzate, le IMS32, che mantengono moltissime caratteristiche delle cellule di Schwann primarie.

Abbiamo analizzato la responsività delle cellule IMS32 allo stimolo con ATP in termini di mobilitazione del Ca^{2+} citoplasmatico. Anche in questo caso i terreni condizionati dalle NSC a diversi passaggi si sono rivelati efficaci nel diminuire significativamente l'aumento di Ca^{2+} indotto da ATP nelle cellule IMS32. E' da notare che l'entità di questo effetto è stata minore nelle IMS32 rispetto a quanto osservato nelle cellule microgliali N9. Studi successivi saranno necessari per chiarire quali possano essere le differenze a livello di signaling intracellulare che possano giustificare queste differenze.

In conclusione i dati ottenuti in questa ricerca dimostrano che le cellule N9 costituiscono un buon modello sperimentale per lo studio delle interazioni tra NSC e cellule gliali in condizioni di neuroinfiammazione.

Questa ricerca dimostra che le cellule staminali neuronali sono in grado di modulare positivamente la suscettibilità delle cellule N9 al trattamento con ATP, confermando l'ipotesi di un cross-talk tra i due tipi cellulari, e questa modulazione è dipendente da fattori solubili rilasciati dalle cellule nel terreno di coltura durante la loro normale crescita.

La suscettibilità all'ATP viene modulata sia dal punto di vista dell'attivazione in senso pro-infiammatorio, sia dal punto di vista dell'effetto tossico che alte concentrazioni di ATP extracellulare esercitano sulle cellule di microglia e sui neuroni.

Le cellule gliali sono in grado di richiamare nel sito di lesione le cellule staminali neuronali. Nella nostra ricerca abbiamo dimostrato che MCP-1 è una chemochina prodotta in seguito a stimolazione con ATP e ha un ruolo cruciale nel fenomeno di richiamo delle NSC.

In futuro sarà indagato il ruolo anche di altre molecole ad azione chemoattrattrice per chiarire i meccanismi alla base del movimento delle NSC nel cervello. Questi studi saranno preziosi per l'applicazione nella terapia basata sul trapianto di cellule staminali nel cervello, sia nel trattamento dell'ischemia cerebrale che nel trattamento di altre malattie degenerative a carattere infiammatorio.

I dati ottenuti sulle cellule di Schwann e nella linea neuronale Neuro2A dimostrano che gli effetti mediati dalle NSC non sono specifici per le cellule di microglia. In futuro questi dati necessiteranno di essere ulteriormente approfonditi per verificare il ruolo delle cellule staminali neuronali, e dei fattori da esse prodotti, nella suscettibilità all'ATP delle popolazioni cellulari cerebrali.

BIBLIOGRAFIA

- Aarum, J., K. Sandberg, et al. (2003). "Migration and differentiation of neural precursor cells can be directed by microglia." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(26): 15983-8.
- Abulafia, D. P., J. P. de Rivero Vaccari, et al. (2009). "Inhibition of the inflammasome complex reduces the inflammatory response after thromboembolic stroke in mice." J Cereb Blood Flow Metab **29**(3): 534-44.
- Adler, J. E., L. Nico, et al. (2009). "Modulation of neuropathic pain by a glial-derived factor." Pain Med **10**(7): 1229-36.
- Ahmad, M., Y. Zhang, et al. (2009). "Prolonged opportunity for neuroprotection in experimental stroke with selective blockade of cyclooxygenase-2 activity." Brain Res **1279**: 168-73.
- Andrae, J., R. Gallini, et al. (2008). "Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine." Genes Dev **22**(10): 1276-312.
- Appay, V. and S. L. Rowland-Jones (2001). "RANTES: a versatile and controversial chemokine." Trends Immunol **22**(2): 83-7.
- Arend, W. P., G. Palmer, et al. (2008). "IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines." Immunol Rev **223**: 20-38.
- Bang, O. Y., J. S. Lee, et al. (2005). "Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients." Ann Neurol **57**(6): 874-82.
- Belmadani, A., P. B. Tran, et al. (2006). "Chemokines regulate the migration of neural progenitors to sites of neuroinflammation." J Neurosci **26**(12): 3182-91.
- Bettoni, I., F. Comelli, et al. (2008). "Glial TLR4 receptor as new target to treat neuropathic pain: efficacy of a new receptor antagonist in a model of peripheral nerve injury in mice." Glia **56**(12): 1312-9.
- Bjorklund, L. M., R. Sanchez-Pernaute, et al. (2002). "Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(4): 2344-9.
- Bjugstad, K. B., D. E. Redmond, Jr., et al. (2005). "Neural stem cells implanted into MPTP-treated monkeys increase the size of endogenous tyrosine hydroxylase-positive cells found in the striatum: a return to control measures." Cell Transplant **14**(4): 183-92.
- Bona, E., A. L. Andersson, et al. (1999). "Chemokine and inflammatory cell response to hypoxia-ischemia in immature rats." Pediatr Res **45**(4 Pt 1): 500-9.
- Burns, T. C., G. J. Rodriguez, et al. (2008). "Endovascular interventions following intravenous thrombolysis may improve survival and recovery in patients with acute ischemic stroke: a case-control study." AJNR Am J Neuroradiol **29**(10): 1918-24.
- Burns, T. C., C. M. Verfaillie, et al. (2009). "Stem cells for ischemic brain injury: a critical review." J Comp Neurol **515**(1): 125-44.
- Burnstock, G. (2008). "Purinergic signalling and disorders of the central nervous system." Nat Rev Drug Discov **7**(7): 575-90.
- Capone, C., S. Frigerio, et al. (2007). "Neurosphere-derived cells exert a neuroprotective action by changing the ischemic microenvironment." PLoS ONE **2**(4): e373.
- Cavaliere, F., K. Dinkel, et al. (2005). "Microglia response and P2 receptor participation in oxygen/glucose deprivation-induced cortical damage." Neuroscience **136**(3): 615-23.
- Cavaliere, F., F. Florenzano, et al. (2003). "Up-regulation of P2X2, P2X4 receptor and ischemic cell death: prevention by P2 antagonists." Neuroscience **120**(1): 85-98.
- Che, X., W. Ye, et al. (2001). "Monocyte chemoattractant protein-1 expressed in neurons and astrocytes during focal ischemia in mice." Brain Res **902**(2): 171-7.

- Chen, Y., J. M. Hallenbeck, et al. (2003). "Overexpression of monocyte chemoattractant protein 1 in the brain exacerbates ischemic brain injury and is associated with recruitment of inflammatory cells." J Cereb Blood Flow Metab **23**(6): 748-55.
- Chessell, I. P., J. P. Hatcher, et al. (2005). "Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain." Pain **114**(3): 386-96.
- Chock, V. Y. and R. G. Giffard (2005). "Development of neonatal murine microglia in vitro: changes in response to lipopolysaccharide and ischemia-like injury." Pediatr Res **57**(4): 475-80.
- Choi, H. B., S. H. Hong, et al. (2003). "Differential activation of subtype purinergic receptors modulates Ca(2+) mobilization and COX-2 in human microglia." Glia **43**(2): 95-103.
- Clark, W. M., L. G. Rinker, et al. (2000). "Lack of interleukin-6 expression is not protective against focal central nervous system ischemia." Stroke **31**(7): 1715-20.
- Coull, J. A., S. Beggs, et al. (2005). "BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain." Nature **438**(7070): 1017-21.
- Daadi, M. M., A. L. Maag, et al. (2008). "Adherent self-renewable human embryonic stem cell-derived neural stem cell line: functional engraftment in experimental stroke model." PLoS One **3**(2): e1644.
- de Bilbao, F., D. Arsenijevic, et al. (2009). "In vivo over-expression of interleukin-10 increases resistance to focal brain ischemia in mice." J Neurochem **110**(1): 12-22.
- Dinarello, C. A. (2009). "Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family." Annu Rev Immunol **27**: 519-50.
- Donnan, G. A., M. Fisher, et al. (2008). "Stroke." Lancet **371**(9624): 1612-23.
- Donnelly-Roberts, D., S. McGaraughy, et al. (2008). "Painful purinergic receptors." J Pharmacol Exp Ther **324**(2): 409-15.
- Dufour, J. H., M. Dziejman, et al. (2002). "IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking." J Immunol **168**(7): 3195-204.
- Eaton, M. (2004). "Cell therapy for neuropathic pain in spinal cord injuries." Expert Opin Biol Ther **4**(12): 1861-9.
- Einstein, O. and T. Ben-Hur (2008). "The changing face of neural stem cell therapy in neurologic diseases." Arch Neurol **65**(4): 452-6.
- Ekdahl, C. T., J. H. Claassen, et al. (2003). "Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(23): 13632-7.
- Eriksson, P. S., E. Perfilieva, et al. (1998). "Neurogenesis in the adult human hippocampus." Nat Med **4**(11): 1313-7.
- Ferrari, D., P. Chiozzi, et al. (1997). "ATP-mediated cytotoxicity in microglial cells." Neuropharmacology **36**(9): 1295-301.
- Ferrari, D., M. Villalba, et al. (1996). "Mouse microglial cells express a plasma membrane pore gated by extracellular ATP." J Immunol **156**(4): 1531-9.
- Fillit, H., W. H. Ding, et al. (1991). "Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease." Neurosci Lett **129**(2): 318-20.
- Frangogiannis, N. G. (2007). "Chemokines in ischemia and reperfusion." Thromb Haemost **97**(5): 738-47.
- Freed, C. R., P. E. Greene, et al. (2001). "Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease." N Engl J Med **344**(10): 710-9.
- Freyenhagen, R. and M. I. Bennett (2009). "Diagnosis and management of neuropathic pain." Bmj **339**: b3002.
- Garden, G. A. and T. Moller (2006). "Microglia biology in health and disease." J Neuroimmune Pharmacol **1**(2): 127-37.

- Gartner, S. and Y. Liu (2002). "Insights into the role of immune activation in HIV neuropathogenesis." J Neurovirol **8**(2): 69-75.
- Gonsette, R. E. (2008). "Neurodegeneration in multiple sclerosis: the role of oxidative stress and excitotoxicity." J Neurol Sci **274**(1-2): 48-53.
- Gorba, T., P. Bradoo, et al. (2006). "Neural regeneration protein is a novel chemoattractive and neuronal survival-promoting factor." Exp Cell Res **312**(16): 3060-74.
- Gottlieb, D. I. (2002). "Large-scale sources of neural stem cells." Annu Rev Neurosci **25**: 381-407.
- Graham, D. I., J. H. Adams, et al. (1995). "The nature, distribution and causes of traumatic brain injury." Brain Pathol **5**(4): 397-406.
- Harrower, T. P., P. Tyers, et al. (2006). "Long-term survival and integration of porcine expanded neural precursor cell grafts in a rat model of Parkinson's disease." Exp Neurol **197**(1): 56-69.
- Harry, G. J. and A. D. Kraft (2008). "Neuroinflammation and microglia: considerations and approaches for neurotoxicity assessment." Expert Opin Drug Metab Toxicol **4**(10): 1265-77.
- Hayashi, J., Y. Takagi, et al. (2006). "Primate embryonic stem cell-derived neuronal progenitors transplanted into ischemic brain." J Cereb Blood Flow Metab **26**(7): 906-14.
- Hendricks, W. A., E. S. Pak, et al. (2006). "Predifferentiated embryonic stem cells prevent chronic pain behaviors and restore sensory function following spinal cord injury in mice." Mol Med **12**(1-3): 34-46.
- Hide, I., M. Tanaka, et al. (2000). "Extracellular ATP triggers tumor necrosis factor- α release from rat microglia." J Neurochem **75**(3): 965-72.
- Hosomi, N., C. R. Ban, et al. (2005). "Tumor necrosis factor- α neutralization reduced cerebral edema through inhibition of matrix metalloproteinase production after transient focal cerebral ischemia." J Cereb Blood Flow Metab **25**(8): 959-67.
- Hou, L. and T. Hong (2008). "Stem cells and neurodegenerative diseases." Sci China C Life Sci **51**(4): 287-94.
- Huang, D., Y. Han, et al. (2000). "Chemokines and chemokine receptors in inflammation of the nervous system: manifold roles and exquisite regulation." Immunol Rev **177**: 52-67.
- Inoue, K. (1998). "The functions of ATP receptors in the hippocampus." Pharmacol Res **38**(5): 323-31.
- Inoue, K. (2006). "The function of microglia through purinergic receptors: neuropathic pain and cytokine release." Pharmacol Ther **109**(1-2): 210-26.
- Inoue, K., M. Tsuda, et al. (2004). "ATP- and adenosine-mediated signaling in the central nervous system: chronic pain and microglia: involvement of the ATP receptor P2X4." J Pharmacol Sci **94**(2): 112-4.
- Kakio, T., A. Matsumori, et al. (2000). "Roles and relationship of macrophages and monocyte chemoattractant and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1 in the ischemic and reperfused rat heart." Lab Invest **80**(7): 1127-36.
- Kataoka, A., H. Tozaki-Saitoh, et al. (2009). "Activation of P2X7 receptors induces CCL3 production in microglial cells through transcription factor NFAT." J Neurochem **108**(1): 115-25.
- Kaushal, V. and L. C. Schlichter (2008). "Mechanisms of microglia-mediated neurotoxicity in a new model of the stroke penumbra." J Neurosci **28**(9): 2221-30.
- Kelly, S., T. M. Bliss, et al. (2004). "Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(32): 11839-44.

- Kharlamov, A., S. C. Jones, et al. (2002). "Suramin reduces infarct volume in a model of focal brain ischemia in rats." Exp Brain Res **147**(3): 353-9.
- Kim, S. U. and J. de Vellis (2009). "Stem cell-based cell therapy in neurological diseases: a review." J Neurosci Res **87**(10): 2183-200.
- Klass, M., V. Gavrikov, et al. (2007). "Intravenous mononuclear marrow cells reverse neuropathic pain from experimental mononeuropathy." Anesth Analg **104**(4): 944-8.
- Kondziolka, D., G. K. Steinberg, et al. (2005). "Neurotransplantation for patients with subcortical motor stroke: a phase 2 randomized trial." J Neurosurg **103**(1): 38-45.
- Kondziolka, D., L. Wechsler, et al. (2000). "Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke." Neurology **55**(4): 565-9.
- Lee, S. T., K. Chu, et al. (2008). "Anti-inflammatory mechanism of intravascular neural stem cell transplantation in haemorrhagic stroke." Brain **131**(Pt 3): 616-29.
- Lee, Y. B., A. Nagai, et al. (2002). "Cytokines, chemokines, and cytokine receptors in human microglia." J Neurosci Res **69**(1): 94-103.
- Lepore, A. C., S. S. Han, et al. (2004). "Differential fate of multipotent and lineage-restricted neural precursors following transplantation into the adult CNS." Neuron Glia Biol **1**(2): 113-126.
- Lindvall, O., P. Brundin, et al. (1990). "Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease." Science **247**(4942): 574-7.
- Lindvall, O. and Z. Kokaia (2006). "Stem cells for the treatment of neurological disorders." Nature **441**(7097): 1094-6.
- Locatelli, F., A. Bersano, et al. (2009). "Stem cell therapy in stroke." Cell Mol Life Sci **66**(5): 757-72.
- Loring, J. F., J. G. Porter, et al. (2001). "A gene expression profile of embryonic stem cells and embryonic stem cell-derived neurons." Restor Neurol Neurosci **18**(2-3): 81-8.
- Marella, M. and J. Chabry (2004). "Neurons and astrocytes respond to prion infection by inducing microglia recruitment." J Neurosci **24**(3): 620-7.
- Martinez-Serrano, A., P. A. Hantzopoulos, et al. (1996). "Ex vivo gene transfer of brain-derived neurotrophic factor to the intact rat forebrain: neurotrophic effects on cholinergic neurons." Eur J Neurosci **8**(4): 727-35.
- Martucci, C., A. E. Trovato, et al. (2008). "The purinergic antagonist PPADS reduces pain related behaviours and interleukin-1 beta, interleukin-6, iNOS and nNOS overproduction in central and peripheral nervous system after peripheral neuropathy in mice." Pain **137**(1): 81-95.
- McCoy, M. K. and M. G. Tansey (2008). "TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease." J Neuroinflammation **5**: 45.
- McGeer, E. G. and P. L. McGeer (2007). "The role of anti-inflammatory agents in Parkinson's disease." CNS Drugs **21**(10): 789-97.
- McKay, R. (1997). "Stem cells in the central nervous system." Science **276**(5309): 66-71.
- McLarnon, J. G. (2005). "Purinergic mediated changes in Ca²⁺ mobilization and functional responses in microglia: effects of low levels of ATP." J Neurosci Res **81**(3): 349-56.
- McLarnon, J. G., J. K. Ryu, et al. (2006). "Upregulated expression of purinergic P2X(7) receptor in Alzheimer disease and amyloid-beta peptide-treated microglia and in peptide-injected rat hippocampus." J Neuropathol Exp Neurol **65**(11): 1090-7.

- Melani, A., S. Amadio, et al. (2006). "P2X7 receptor modulation on microglial cells and reduction of brain infarct caused by middle cerebral artery occlusion in rat." J Cereb Blood Flow Metab **26**(7): 974-82.
- Melani, A., D. Turchi, et al. (2005). "ATP extracellular concentrations are increased in the rat striatum during in vivo ischemia." Neurochem Int **47**(6): 442-8.
- Miettinen, S., F. R. Fusco, et al. (1997). "Spreading depression and focal brain ischemia induce cyclooxygenase-2 in cortical neurons through N-methyl-D-aspartic acid-receptors and phospholipase A2." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(12): 6500-5.
- Monif, M., C. A. Reid, et al. (2009). "The P2X7 receptor drives microglial activation and proliferation: a trophic role for P2X7R pore." J Neurosci **29**(12): 3781-91.
- Morales, J. R., I. Ballesteros, et al. (2008). "Activation of liver X receptors promotes neuroprotection and reduces brain inflammation in experimental stroke." Circulation **118**(14): 1450-9.
- Morganti-Kossmann, M. C., M. Rancan, et al. (2002). "Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword." Curr Opin Crit Care **8**(2): 101-5.
- Mulcahy, N. J., J. Ross, et al. (2003). "Delayed administration of interleukin-1 receptor antagonist protects against transient cerebral ischaemia in the rat." Br J Pharmacol **140**(3): 471-6.
- Nagele, R. G., J. Wegiel, et al. (2004). "Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease." Neurobiol Aging **25**(5): 663-74.
- Nie, C. Q., N. J. Bernard, et al. (2009). "IP-10-mediated T cell homing promotes cerebral inflammation over splenic immunity to malaria infection." PLoS Pathog **5**(4): e1000369.
- Ogata, T., M. Chuai, et al. (2003). "Adenosine triphosphate inhibits cytokine release from lipopolysaccharide-activated microglia via P2y receptors." Brain Res **981**(1-2): 174-83.
- Olanow, C. W., C. G. Goetz, et al. (2003). "A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease." Ann Neurol **54**(3): 403-14.
- Park, K. I. (2000). "Transplantation of neural stem cells: cellular & gene therapy for hypoxic-ischemic brain injury." Yonsei Med J **41**(6): 825-35.
- Pinteaux, E., N. J. Rothwell, et al. (2006). "Neuroprotective actions of endogenous interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) are mediated by glia." Glia **53**(5): 551-6.
- Planas, A. M., R. Gorina, et al. (2006). "Signalling pathways mediating inflammatory responses in brain ischaemia." Biochem Soc Trans **34**(Pt 6): 1267-70.
- Polgar, S., M. E. Morris, et al. (2003). "Reconstructive neurosurgery for Parkinson's disease: a systematic review and preliminary meta-analysis." Brain Res Bull **60**(1-2): 1-24.
- Potucek, Y. D., J. M. Crain, et al. (2006). "Purinergic receptors modulate MAP kinases and transcription factors that control microglial inflammatory gene expression." Neurochem Int **49**(2): 204-14.
- Qu, T., C. L. Brannen, et al. (2001). "Human neural stem cells improve cognitive function of aged brain." Neuroreport **12**(6): 1127-32.
- Ransohoff, R. M. and V. H. Perry (2009). "Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses." Annu Rev Immunol **27**: 119-45.
- Rebenko-Moll, N. M., L. Liu, et al. (2006). "Chemokines, mononuclear cells and the nervous system: heaven (or hell) is in the details." Curr Opin Immunol **18**(6): 683-9.
- Redmond, D. E., Jr., K. B. Bjugstad, et al. (2007). "Behavioral improvement in a primate Parkinson's model is associated with multiple homeostatic effects of human neural stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(29): 12175-80.

- Renner, O., A. Tsimpas, et al. (2003). "Time- and cell type-specific induction of platelet-derived growth factor receptor-beta during cerebral ischemia." Brain Res Mol Brain Res **113**(1-2): 44-51.
- Rollins, B. J. (1996). "Monocyte chemoattractant protein 1: a potential regulator of monocyte recruitment in inflammatory disease." Mol Med Today **2**(5): 198-204.
- Ryu, J. K. and J. G. McLarnon (2008). "Block of purinergic P2X(7) receptor is neuroprotective in an animal model of Alzheimer's disease." Neuroreport **19**(17): 1715-9.
- Sah, D. W., J. Ray, et al. (1997). "Bipotent progenitor cell lines from the human CNS." Nat Biotechnol **15**(6): 574-80.
- Schmidt, N. O., D. Koeder, et al. (2009). "Vascular endothelial growth factor-stimulated cerebral microvascular endothelial cells mediate the recruitment of neural stem cells to the neurovascular niche." Brain Res **1268**: 24-37.
- Scholz, J. and C. J. Woolf (2007). "The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia." Nat Neurosci **10**(11): 1361-8.
- Shannon, T. A. (2001). "Human embryonic stem cell therapy." Theor Stud **62**(4): 811-24.
- Shie, F. S., M. Nivison, et al. (2009). "Modulation of microglial innate immunity in Alzheimer's disease by activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma." Curr Med Chem **16**(6): 643-51.
- Slayton, W. B., X. M. Li, et al. (2007). "The role of the donor in the repair of the marrow vascular niche following hematopoietic stem cell transplant." Stem Cells **25**(11): 2945-55.
- Sommer, C. and M. Kress (2004). "Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia." Neurosci Lett **361**(1-3): 184-7.
- Streit, W. J., R. E. Mrak, et al. (2004). "Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective." J Neuroinflammation **1**(1): 14.
- Studer, L., V. Tabar, et al. (1998). "Transplantation of expanded mesencephalic precursors leads to recovery in parkinsonian rats." Nat Neurosci **1**(4): 290-5.
- Suzuki, S., K. Tanaka, et al. (2009). "Ambivalent aspects of interleukin-6 in cerebral ischemia: inflammatory versus neurotrophic aspects." J Cereb Blood Flow Metab **29**(3): 464-79.
- Suzuki, T., I. Hide, et al. (2004). "Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor by P2X7 receptor-activated microglia." J Neurosci **24**(1): 1-7.
- Takagi, Y., J. Takahashi, et al. (2005). "Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model." J Clin Invest **115**(1): 102-9.
- Takahashi, K., K. Tanabe, et al. (2007). "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors." Cell **131**(5): 861-72.
- Tang, X. N., Q. Wang, et al. (2007). "Monitoring the protective effects of minocycline treatment with radiolabeled annexin V in an experimental model of focal cerebral ischemia." J Nucl Med **48**(11): 1822-8.
- Taupin, P. (2009). "Adult neural stem cells for the treatment of neuroinflammation. Fondazione Centro San Raffaele del Monte Tabor: WO2007015173." Expert Opin Ther Pat **19**(3): 373-6.
- Tu, J. and L. P. Wang (2009). "Therapeutic potential of extracellular ATP and P2 receptors in nervous system diseases." Neurosci Bull **25**(1): 27-32.
- Tuan, R. S., G. Boland, et al. (2003). "Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering." Arthritis Res Ther **5**(1): 32-45.
- Volonte, C., S. Amadio, et al. (2003). "Extracellular ATP and neurodegeneration." Curr Drug Targets CNS Neurol Disord **2**(6): 403-12.

- Waeckel, L., Z. Mallat, et al. (2005). "Impairment in postischemic neovascularization in mice lacking the CXC chemokine receptor 3." Circ Res **96**(5): 576-82.
- Wang, Q., Y. Matsumoto, et al. (2006). "Neural stem cells transplantation in cortex in a mouse model of Alzheimer's disease." J Med Invest **53**(1-2): 61-9.
- Wang, Q., X. N. Tang, et al. (2007). "The inflammatory response in stroke." J Neuroimmunol **184**(1-2): 53-68.
- Watkins, L. R. and S. F. Maier (2002). "Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states." Physiol Rev **82**(4): 981-1011.
- Wu, P., Y. I. Tarasenko, et al. (2002). "Region-specific generation of cholinergic neurons from fetal human neural stem cells grafted in adult rat." Nat Neurosci **5**(12): 1271-8.
- Xu, Q., S. Wang, et al. (2007). "Hypoxia-induced astrocytes promote the migration of neural progenitor cells via vascular endothelial factor, stem cell factor, stromal-derived factor-1alpha and monocyte chemoattractant protein-1 upregulation in vitro." Clin Exp Pharmacol Physiol **34**(7): 624-31.
- Yanagisawa, D., Y. Kitamura, et al. (2008). "Possible involvement of P2X7 receptor activation in microglial neuroprotection against focal cerebral ischemia in rats." Biol Pharm Bull **31**(6): 1121-30.
- Yang, G. Y., Y. J. Zhao, et al. (1997). "Overexpression of interleukin-1 receptor antagonist in the mouse brain reduces ischemic brain injury." Brain Res **751**(2): 181-8.