

## Neurologia sperimentale

## Le cellule embrionali staminali favoriscono il recupero motorio e incidono sull'infiltrazione infiammatoria cellulare nei topi affetti da lesione del midollo☆

Daniele Bottai<sup>a,b</sup>, Daniela Cigognini<sup>a</sup>, Laura Madaschi<sup>a</sup>, Raffaella Adami<sup>a</sup>, Emanuela Nicora<sup>a</sup>, Mauro Menarini<sup>c</sup>, Anna Maria Di Giulio<sup>a</sup>, Alfredo Gorio<sup>a,b</sup>

*a* Department of Medicine, Surgery and Dentistry, Faculty of Medicine, University of Milan Via A. di Rudini 8, 20142 Milan, Italy

*b* Clinical Pharmacology IRCCS Humanitas Via Manzoni 56, 20089 Rozzano, Milan, Italy

*c* Fondazione Montecatone onlus, Via Montecatone 43, 40026 Imola (BO), Italy

### Sommario

Questo studio si propone di determinare il destino e gli effetti delle cellule staminali embrionali indifferenziate (CSE) nei topi in seguito a una lesione contusiva del midollo spinale (SCI). La lesione traumatica del midollo è stata riprodotta a livello T8 per mezzo del dispositivo Infinite Horizon, seguito da iniezione intravenosa di un milione di CSE indifferenziate attraverso la vena caudale entro due ore dalla lesione.

Gli animali trattati con CSE hanno evidenziato un miglioramento significativo del recupero della funzione motoria 28 giorni dopo la lesione, con un punteggio medio di 4,61±0,13 della Basso Mouse Scale (n=14), rispetto al punteggio medio di topi trattati con veicolo, 3,58 ± 0,23 (n = 10). Il numero di CSE identificate che è stato trovato nel sito della lesione era lo 0,6% delle cellule iniettate a una settimana dal trapianto, ridotto ulteriormente a 0,04% dopo un mese. Appare quindi evidente che il recupero indotto degli arti posteriori non può essere correlato a una sostituzione del tessuto perso messo in atto dalle CSE esogene. L'approfondita valutazione della produzione di numerose citochine neuroprotettive e infiammatorie non ha rivelato alcun effetto dovuto al trattamento con CSE, ma sorprendentemente il numero di macrofagi e neutrofili invasivi si è notevolmente ridotto. Questo potrebbe spiegare il miglioramento della conservazione della mielina ventrale nel sito della lesione, sia dopo una settimana (29 ±11%) sia dopo un mese (106±14%) dopo il trauma. Non si è osservata alcuna formazione di teratomi, anche se si è scoperta una colonizzazione impropria del midollo sacrale da parte di CSE differenziate positive a nestina- e beta tubulina III. **Parole chiave:** iniezione di cellule, microscopio confocale, infiammazione, cellule staminali, lesione spinale traumatica.

### Introduzione

La forza meccanica applicata al midollo spinale (SCI) porta a un danno complesso che provoca la morte dei neuroni, degli astrociti e degli oligodendrociti. Il trauma meccanico è seguito da una degenerazione secondaria che è il risultato complesso di un processo che implica infiammazione, necrosi emorragica progressiva, edema, demielinizzazione, eccitotossicità e eccessivo accumulo di calcio intracellulare. Questa distruzione strutturale prosegue per parecchi giorni e si estende ben oltre il sito originario del trauma. (Bethea, 2000; Gorio e al., 2005, 2007; Gris e al., 2004; Hall, 1992; Popovich e Jones, 2003). Negli ultimi vent'anni sono stati sperimentati vari approcci farmacologici la maggior parte dei quali tesa a neutralizzare i componenti specifici dei meccanismi sottostanti alla degenerazione secondaria (Gorio e al., 2002, 2007; Klussmann e Martin-Villalba, 2005; Popovich e al., 1999). Molto recentemente si è anche dimostrato che le cellule ED-1 sono direttamente responsabili della ritrazione dell'assone leso tramite l'interazione fisica fra le cellule, e lo svuotamento di macrofagi infiltranti ha portato ad una significativa riduzione della retrazione dell'assone (Horn e al., 2008). Numerosi studi hanno dimostrato che la capacità rigenerativa del midollo leso può essere migliorata mediante il blocco di sostanze come il solfato di condroitina e proteine mieliche che inibiscono o interrompono lo sviluppo e la rigenerazione degli assoni lesi. (Agudo e al., 2008; Barritt e al., 2006; Buss e al., 2005; Fouad e al. 2004; Gonzenbach e Schwab, 2008; Simonen e al. 2003; Tom e Houle, 2008) e trapiantando tessuto nervoso fetale con lo scopo di migliorare la zona della lesione (Horvat, 1991; Houle e Reier, 1988; Tessler, 1991). Ultimamente le cellule staminali rappresentano uno strumento innovativo (Puceat e Ballis 2007; Reier, 2004; Schultz, 2005) per il trattamento di



Il progetto è stato sostenuto da un contributo del Ministero Italiano della Pubblica Istruzione negli anni 2003 e 2005 e da una generosa donazione dalla Fondazione Montecatone di Imola (Italia) ad Alfredo Gorio.

disturbi neurodegenerativi. Si possono suddividere le cellule staminali in due vaste categorie, CSE e cellule staminali somatiche adulte (Tiedemann e al., 2001; Trounson, 2005; Vats e al., 2005). Si sono impiantati diversi tipi di cellule staminali in modelli di ratti e topi con lesione del midollo spinale con risultati variabili; alcuni esempi includono cellule olfattive inguainanti (di rivestimento?) (Lavdas e al., 2008; Marshall e al., 2006), cellule staminali del midollo spinale (Klein e Svendsen, 2005), cellule staminali derivate dal midollo osseo (Ankeny e al., 2004), cellule staminali derivate dal derma (Biernaskie e al., 2007; Gorio e al., 2004; Kyung e al., 2007), e cellule staminali neuronali (Bottai e al., 2008; Snyder e Macklis, 1995; Snyder e al., 1997).

I risultati di questi trattamenti sono stati molto eterogenei, anche quando è stato usato lo stesso tipo di cellule. Nel complesso questi numerosi studi rivelano l'esigenza di ulteriori indagini per stabilire il destino ed gli effetti dell'applicazione delle cellule staminali al midollo spinale lesio.

Si conoscono la plasticità e la potenzialità delle CSE da quando sono state scoperte nei topi (Evans e Kaufman, 1981; Kleinsmith e Pierce, 1964) e nell'uomo (Thomson e al., 1998) ed è stato prodotto un topo intero partendo dalle CSE (Nagy e al., 1993). Al contrario delle cellule somatiche normali, le CSE non sono soggette a senescenza e possono essere coltivate in quantità virtualmente illimitate mantenendo un'alta attività di telomerasi e la segnalazione di un ciclo cellulare normale. Con appropriate tecniche di coltura, queste cellule non subiscono i cambiamenti genomici, mitocondriali e epigenetici che portano alla trasformazione (Zeng e Rao, 2007). Le CSE dei roditori possono essere indirizzate nella differenziazione verso un destino neuronale (Conti e al., 2005, 2006; Finley e al., 1996) o gliale (Liu e al., 2000); inoltre i motoneuroni derivati dalle CSE possono sopravvivere, integrarsi e contribuire alla ripresa delle funzioni dopo il trapianto nei ratti paralizzati (Deshpande e al., 2006). Recentemente degli oligodendrociti derivati dalle CSE (Sharp e Keirstead, 2007) sono sopravvissuti nel midollo lesio e hanno favorito la guarigione (Hatch e al., 2009). D'altra parte l'impiego di CSE indifferenziate suscita gravi preoccupazioni riguardo alla formazione di tumori, anche quando tale rischio diminuisce con la progressiva differenziazione cellulare (cioè con il ridursi della multipotenza). Le CSE trapiantate possono formare teratomi che sono costituiti da cellule di stirpi entodermiche, mesodermiche e ectodermiche (Nussbaum e al., 2007; Reubinoff e al., 2000).

In questo studio si dimostra che la somministrazione per via intravenosa (i.v.) con un ago sottile di CSE indifferenziate di topo ha degli effetti sulla degenerazione secondaria, blocca l'invasione di cellule infiammatorie, protegge la mielina ventrale e promuove il recupero della funzione dopo una SCI acuta. E' stata anche studiata la colonizzazione della porzione sacrale del midollo dove le CSE si sono differenziate in cellule positive a nestina e b-tubulina III.

## **Materiali e metodi**

### ***Animali***

Per questo studio si sono usati topi adulti maschi CD1 (del peso di 28/30 gr). Gli animali sono stati tenuti in condizioni standard (22+/-2°C, 65% di umidità, e luce artificiale fra le 8 e le 20). Cibo e acqua erano disponibili *ad libitum*.

Le procedure sugli animali sono state approvate dal Comitato di Revisione Etica dell'università di Milano ed erano conformi alle linee guida italiane per gli animali da laboratorio che ottemperano la Direttiva della Comunità Europea del novembre 1986 (86/609/EEC).

### ***La coltura delle CSE***

La linea delle CSE è stata derivata da topi 120/Sv come già descritto altrove (Alvarez e al., 2004), e è stata stabilmente transfettata con il vettore d'espressione pCX-(beta-act)-eGFP (Arnhold e al., 2000). Le CSE sono state passate ogni due giorni in fiasche ricoperte di gelatina di T75 o T175 cm(2) in presenza del medium minimo fondamentale di Glasgow (GMEM) (Sigma) con l'aggiunta di 0.1 mM di aminoacidi non essenziali (Invitrogen), 40 mM di glutamina (Invitrogen), 2 mM di piruvato di sodio (Gibco), 0.05 mM 2-mercaptoetanololo (Invitrogen), 10% di siero bovino fetale (FBS) (PAA) e 10 ng/ml di fattore inibitore della leucemia (LIF) (Chemicon). Le cellule sono state incubate in 5% CO<sub>2</sub> a 37 °C e passate quando veniva raggiunta la confluenza (ogni 3-4 giorni). Ad ogni passaggio le cellule venivano staccate con tripsina allo 0.1%, centrifugate 1000 rpm per 10 minuti e ri-piastrate alla stessa densità dopo aver determinato la loro vitalità con l'esclusione Trypan Blue.

### ***Isolamento e coltura dei fibroblasti***

Dopo aver soppresso gli animali con una dose letale di cloral idrato al 4%, i fibroblasti sono stati isolati dalla pelle dei topi e coltivati come descritto altrove (Kim e al., 2005). In breve la pelle è stata disinfettata con etanolo al 70% e il pelo è stato rasato. Il derma è stato separato raschiando la superficie esterna della pelle con una lama di rasoio e lavato con PBS. Il tessuto è stato macinato e digerito in PBS contenente 1.5 mg/ml di dispasi (Sigma) e 0.15 mg/ml di collagenasi (Sigma) a 37 °C fino a completa disintegrazione.

Il tessuto disintegrato è stato poi centrifugato a 400 x g per 15 min, ri-sospeso in DMEM contenente il 10% di FBS e incubato a 37 °C con il 5% di CO<sub>2</sub> fino a che i fibroblasti hanno coperto quasi completamente la superficie della fiasca.

### ***La lesione del midollo e la cura post-chirurgica***

Una moderata lesione del midollo spinale è stata indotta con l'impiego di un impattatore Infinite Horizon (IH) (Sistemi e strumentazioni di precisione). Le procedure chirurgiche sono state effettuate come descritto precedentemente (Gorio e al., 2002, 2005). In breve, i topi sono stati anestetizzati con cloral idrato al 4%. È stata effettuata una laminectomia a livello T8 e la superficie dorsale del midollo esposta è stata sottoposta a una lesione contusiva moderata con una forza di 50 kdyn per 1 s. Dopo la lesione i muscoli sono stati suturati e la pelle è stata richiusa con graffette chirurgiche. Sono stati somministrati per 7 giorni antibiotici (penicillina/streptomina, Invitrogen) e una soluzione di lattato Ringer. Si è praticato quotidianamente lo svuotamento manuale della vescica urinaria fino al recupero del riflesso della vescica stessa.

### ***Gruppi sperimentali***

Trenta animali lesi sono stati casualmente divisi in due gruppi per l'analisi comportamentale, prima di valutare qualsiasi prestazione motoria; il primo gruppo è stato sottoposto a iniezione di CSE i.v, mentre al secondo gruppo sono stati iniettati 100 µl di soluzione salina sterile di tampone fosfato (PBS). All'interno di quei gruppi, tre animali (uno dal gruppo 1 e due dal gruppo 2) sono stati scartati il primo giorno dopo il trapianto perché avevano un punteggio BMS superiore a 3 (in posizione plantare con o senza sostegno del peso che indicava che la lesione era troppo blanda). Nell'arco della settimana seguente tre animali sono morti in seguito a problemi urinari (zero del gruppo 1 e tre del gruppo 2) e sono stati eliminati dall'analisi comportamentale. Alla fine del periodo di analisi comportamentale questi topi sono stati esaminati per uno studio immunocitochimico. Anche gli animali che sono stati analizzati una settimana dopo il trapianto sono stati divisi in due gruppi di quattro animali ciascuno (quelli trattati con CSE e quelli trattati con PBS) (uno per ciascun gruppo è stato scartato il primo giorno dopo il trapianto perché aveva un punteggio BMS superiore a 3. Gli operatori che valutavano il punteggio non conoscevano il tipo di trattamento subito dal topo analizzato. Per studiare l'espressione della citochina con il PCR T Real-Time, ad ogni rilevazione (1, 2 e 7 giorni) abbiamo scelto a caso cinque topi da ognuno dei seguenti gruppi: (1) animali non operati (gruppo di controllo); (2) animali con laminectomia a livello T8 senza lesione (gruppo di controllo con chirurgia placebo); (3) animali sottoposti a SCI ai quali erano stati iniettati 100µl di PBS sterile; (4) animali sottoposti a SCI ai quali erano stati iniettati  $1 \times 10^6$  fibroblasti (gruppo di controllo con trapianto di fibroblasti); e (5) animali sottoposti a SCI ai quali erano stati iniettati  $1 \times 10^6$  CSE (gruppo con trapianto di CSE). In questi gruppi nessun animale è stato scartato perché la lesione risultava più lieve del previsto.

### ***Marcatura e preparazione per il trapianto delle CSE***

Le CSE sono state marcate con Hoechst 33258 o con Quantum dots (Qdot), un nuovo marcatore fluorescente della Invitrogen (Chan e al., 2005; Dahan e al., 2003) o in alternativa con proteina fluorescente verde (GFP) (trasdotta con un vettore contenente GFP). Per la colorazione Hoechst, le CSE sono state incubate per 30 minuti a 37 °C con Hoechst 33258 (concentrazione finale di 2 µg/ml, Sigma). Dopo l'incubazione le cellule sono state staccate con tripsina allo 0,1% e lavate due volte con GMEM. Dopo il lavaggio finale le CSE sono state messe in sospensione in PBS sterile alla concentrazione di  $1 \times 10^4$  cellule/µl. La vitalità delle cellule è stata valutata usando l'esclusione Trypan Blue.

Per la marcatura Q-dot, si è usato il Qtracker Cell Labeling Kit (Invitrogen). Abbiamo scelto il Q-dot per caricare le cellule perché non interferiva con la loro proliferazione e le cellule mantengono la marcatura per più di 6 settimane in vitro; inoltre il Q-dot non si trasferiva alle cellule adiacenti dopo il trapianto (Rosen e al., 2007). In breve, le CSE sospese venivano incubate con 10 nM di soluzione di marcatura per 45 min a 37°C. Dopo l'incubazione le cellule venivano lavate due volte con GMEM, messe in sospensione in PBS sterile alla concentrazione di  $1 \times 10^4$  cellule/µl. La vitalità delle cellule è stata valutata usando l'esclusione Trypan Blue.

Per confermare la marcatura della cellula si sono osservate rispettivamente un'aliquota di cellule marcate Hoechst e Q-dot tramite fluorescenza e con il microscopio confocale.

### ***Trapianto delle cellule***

Le cellule (CSE o fibroblasti) sono state messe in sospensione in PBS sterile alla concentrazione di  $1 \times 10^4$  cellule/µl, divise in due dosi di 50µl ciascuna ( $5 \times 10^5$  cellule ciascuna) e poi iniettate per via endovenosa attraverso la vena caudale a 30 min e a 2 ore dopo la SCI. Agli animali di controllo Sham sono stati iniettati solo 100 µl di PBS sterile.

### ***Esame comportamentale***

Il recupero della prestazione motoria degli arti posteriori è stata valutata con la Basso Mouse Scale (BMS) (Basso e al., 2006). La BMS va da un punteggio di 0 che indica completa assenza di movimento spontaneo degli arti posteriori a un punteggio massimo di 9 che corrisponde al topo non leso.

La prestazione degli arti posteriori è stata valutata osservando ciascun topo per 4 minuti in campo aperto in cieco a 1, 4, 7, 11, 14, 18, 21, 25 e 28 giorni dopo la lesione.

## ***Istologia***

Una o quattro settimane dopo la SCI gli animali sono stati anestetizzati profondamente con un sovradosaggio del 4% di idrato di cloralio e con perfusione transcardiaca di paraformaldeide al 4% in PBS; i midolli spinali sono stati sezionati e tenuti per tutta la notte in paraformaldeide al 4% a 4 °C, e poi sono stati sciacquati tre volte in tampone fosfato (PB). Successivamente i midolli sono stati collocati in un tampone fosfato di saccarosio al 15% per 3 ore e in saccarosio al 30% per tutta la notte. I campioni sono stati posti in un composto a temperatura ottimale di taglio (OCT), e congelata su ghiaccio secco. I tessuti sono stati tagliati in sezioni dello spessore di 10 µm usando un criostato e conservati a – 20 °C.

Per studi di immunofluorescenza, le sezioni sono state sciacquate con PBS, trattate con soluzione bloccante e incubate con anticorpi primari per tutta la notte a 4 °C. Abbiamo usato i seguenti anticorpi primari: macrofagi/monociti di ratto anti-topo (MAB1852, Chemicon, 1:25) per scoprire la risposta immunologica dell'ospite (ED1), la proteina antigliale fibrillare acidica monoclonale (GFAP) (MMS-435P, Covance, 1:500) come marcatore degli astrociti e la tubulina neuronale classe III anti-topo (TUJ1, PRB-4357, Covance, 1:200, or MAB1637, Chemicon, 1:200) come marcatore per i neuroni; inoltre, abbiamo usato l'anticorpo proteoglicano solfato Condroitina (NG2), (AB5320, Chemicon, 1:100), e l'anticorpo di topo monoclonale anti-nestina (MAB353, Chemicon, 1:100).

Dopo il trattamento con anticorpi primari, le sezioni sono state lavate con PBS e incubate con anticorpi secondari (capra- anti-ratto 1:100 rodamineconiugato, asino-anti-topo coniugato Alexa 545 e capra-anti-coniglio coniugato Alexa 546 1:200 o asino-anti-topo e capra-anti-topo coniugato Alexa 488) per due ore a temperatura ambiente. Le sezioni sono poi state lavate in PBS, contromarcate con DAPI ( fatta eccezione per i midolli spinali trapiantati con cellule etichettate Hoechst) e montate usando il reagente FluorSave (Calbiochem). Sono stati inclusi i controlli negativi (senza anticorpo primario).

In altri esperimenti abbiamo usato la Lectina Texas Red (Vector laboratories) (Lycopersicon esculentum agglutinina) e la Green FluoroMyelin (Invitrogen) per colorare i vasi sanguigni e la mielina rispettivamente. In breve, le sezioni sono state lavate con PBS e incubate con lectina Texas Red Lectin (2 ore) or FluoroMielina (30 min). Le sezioni sono poi state lavate in PBS, controcolorate con DAPI e montate usando il FluorSave Reagent. Sono stati inclusi i controlli negativi (senza FluoroMielina o Texas Red Lectina).

Abbiamo anche colorato alcune sezioni trasversali e longitudinali con il viola Cresyl per evidenziare la struttura neuronale nel tessuto del midollo spinale lesa e sono state effettuate altre immunocolture usando di-amino benzidina.

Le sezioni sono state osservate con la fluorescenza e il microscopio confocale.

## ***Immunocitochimica microscopica ottica***

Le sezioni sono state incubate in sequenza in 0.05 M NH<sub>4</sub>Cl in PB per 30 minuti per eliminare i gruppi di aldeide libera, in 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per 10 min per disattivare la perossidasi endogena e in 0.01 M pH 7.4 di soluzione salina di tamponato di fosfato contenente 1% di albumina di siero bovino (BSA) e 0.2% di Triton X-100 (30 min). Le sezioni sono poi state incubate in sequenza nell'antisiero primario per tutta la notte a temperatura ambiente e in un antisiero secondario biotinilato per 75 minuti. La reazione anticorpo-antigenica è stata rivelata con il metodo standard di perossidasi-ABC usando il kit Vectastain ABC kit (Vector) e il tetraidrocloruro diaminobenzidina (DAB) come cromogeno.

## ***L'isolamento del RNA e il PCR in tempo reale***

Con l'analisi BMS è stata presa in esame la prestazione motoria dei topi lesi, i quali successivamente sono stati anestetizzati e soppressi mediante decapitazione. La laminectomia è stata praticata fra T5 e T12 ed è stato esposto il midollo spinale. L'area lesa e le regioni situate nella regione rostrale e caudale rispetto a questa area sono state rimosse. Abbiamo preso 4mm di tessuto spinale per ciascuna di queste tre regioni e l'abbiamo posto immediatamente in 1 ml di reagente TRIZOL® Reagent (Invitrogen). Abbiamo tenuto i tessuti a – 80 °C fino al loro impiego.

L'RNA totale è stato isolato usando il Trizol Reagent seguendo le istruzioni del produttore. Le concentrazioni totali di RNA sono state determinate rilevando la sua assorbanza con uno spettrofotometro. Il DNA genomico è stato asportato con il trattamento DNase I (1 U for 5 µg of RNA) (BioLabs).

Poi 1 µg di RNA totale è stato sottoposto a trascrizione inversa usando 200U M-MuLV Reverse Transcriptase (BioLabs) secondo il protocollo del produttore. Il PCR in tempo reale è stato eseguito con MJ Opticon 2. La reazione di 25-µl conteneva iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad), primers a gene specifico senso e antisenso (Tabella 1) e template di cDNA. È stato usato il gene housekeeping GAPDH (deidrogenasi di gliceraldeide 3-fosfato) per la normalizzazione dell'espressione della citochina. Dopo l'incubazione a 95 °C per 10 min, i campioni sono stati sottoposti a 40 cicli a 95 °C per 30 s, 56 °C per 1 min, e 72 °C per 1 min. I controlli negativi (RNA non inversamente trascritti) sono stati inclusi per escludere la presenza del DNA genomico. Gli esperimenti sono stati fatti tre volte e in ciascun esperimento lo stesso campione è stato passato in duplicato. La relativa espressione dei geni della citochina con il GAPDH come gene di riferimento è stata determinata usando il metodo 2-Ct. Abbiamo usato questo metodo perché sia i geni target sia quelli di riferimento sono stati amplificati con efficacia simile prossima al 100%. La costruzione del primer è stata effettuato con l'impiego del programma DNASTAR Lasergene.

**Tabella1**

Sequenze e dimensione del prodotto con PCR primer in tempo reale (Invitrogen)

Gene	Sequenza del Primer (5'– 3')	Dimensione
GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)	Forward: cggagtcaacggatttgctgat Reverse: agccttccatgggtgaagac	300 bp
BDNF (Brain-derived neurotrophic factor)	Forward: cattacctctctcatctgttg Reverse: cgtggacgtttacttttcatgg	158 bp
CNTF (Ciliary neurotrophic factor)	Forward: acatcagctcctccggggcattag Reverse: ttctccgtggctttggggttc	151 bp
IL-6 (Interleukin-6)	Forward: gacaaccacggccttccctac Reverse: cgttggtcatacaatcagaattgcc	169 bp
LIF (Leukemia inhibitory factor)	Forward: aacgtggaaaagctatgtcgc Reverse: gcgaccatccgatacagctc	101 bp
NGF (Nerve growth factor)	Forward: tgggcccaataaagttttgcc Reverse: tgggcttcaggagacagctctcc	165 bp
NT3 (Neurotrophic factor-3)	Forward: acgtccctggaaatagtcacacg Reverse: ttggatgccacggagataagc	109 bp
TNF $\alpha$ (Tumor necrosis factor alpha)	Forward: tctatggcccagaccctcacac Reverse: cagccactccagctgctctc	100 bp
MIP2 (macrophage inflammatory protein-2)	Forward: acgccccaggaccccactg Reverse: ggacagcagcccaggctcctcc	168 bp

**Il conteggio delle cellule**

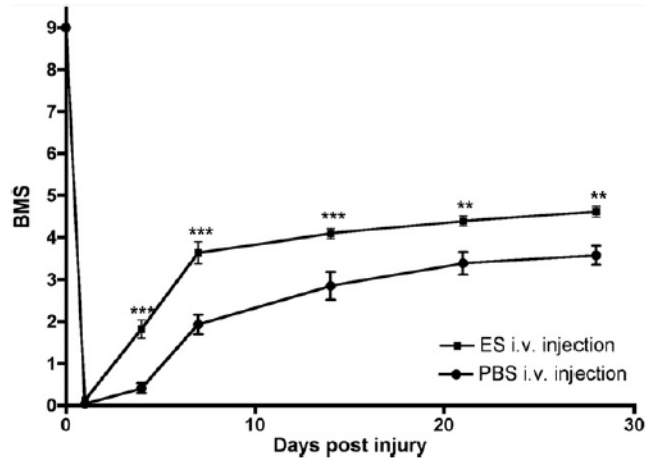
Le cellule sono state considerate positive al Q-dot quando la fluorescenza era visibile con il microscopio confocale e se gli spots avevano una lunghezza d'onda di emissione di 655 nm che corrisponde all'emissione dei nanocristalli Q-dot. Come riferimento negativo all'analisi confocale abbiamo usato sezioni ottenute da animali trapiantati con CSE non marcate. Il conto delle cellule è stato effettuato valutando le cellule positive al Qdot nelle sezioni trasversali in una regione di 4mm con il centro sul sito della lesione. L'epicentro della lesione è stato individuato in sezioni trasversali come la regione con il minimo tessuto di riserva. Si è fatta una media delle cellule positive al Q-dot presenti in un gruppo di tre sezioni consecutive (dello spessore di 10 $\mu$ m , e abbiamo ripetuto questo conteggio per ogni 400  $\mu$ m, una cellula era positiva per la marcatura Q-dot quando i nanocristalli (uno o più) erano collocati in diretta prossimità di un nucleo. Il numero totale di cellule marcate è stato ricavato integrando la curva ottenuta calcolando la media di ogni sezione su un tratto di 4 mm intorno all'epicentro della lesione. (Coggeshall, 1992).

**Computo del numero dei macrofagi sul sito di lesione**

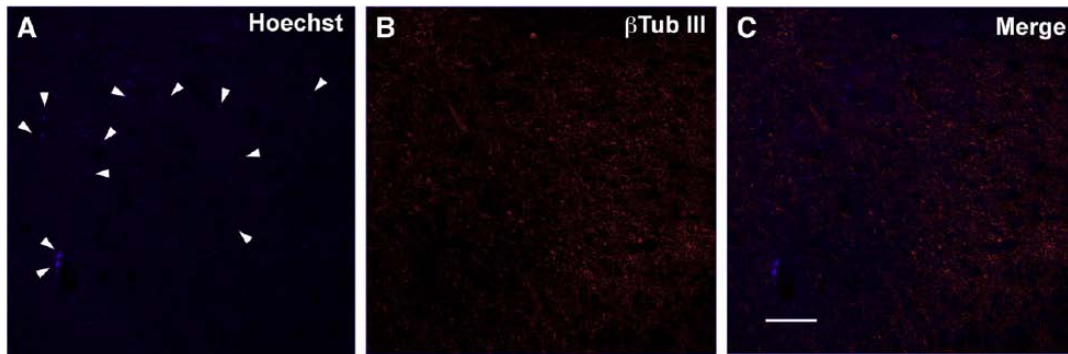
Sono state contate le cellule ED1 positive nelle sezioni trasversali in una regione di 4 mm posta al centro del sito della lesione. Come riferimento negativo per l'analisi confocale abbiamo usato una sezione consecutiva che era colorata con l'omissione dell'anticorpo primario. Il livello zero è stato tarato su questo riferimento, e usato nel corso di tutta l'analisi (abbiamo usato un nuovo riferimento zero per ogni nuova coloritura). Come controlli ulteriori abbiamo usato sezioni ottenute da animali trapiantati con CSE non marcate. Si è fatta la media delle cellule ED1 positive presenti in un gruppo di tre sezioni consecutive (dello spessore di 10  $\mu$ m ) e abbiamo ripetuto questo conteggio ogni 400  $\mu$ m). Abbiamo ottenuto il numero totale di cellule ED1 positive integrando la media all'interno di un volume di 4mm intorno all'epicentro della lesione (Coggeshall, 1992).

**Valutazione dell'estensione della mielinizzazione nell'area della lesione**

La conservazione della mielina è stata valutata paragonando i livelli della mielina nella sostanza ventrale bianca a 0.4 mm dall'epicentro della lesione nei topi trattati con PBS e CSE, dal momento che è stato dimostrato che la conservazione di vie motorie discendenti e segmentali situate nei funicoli laterali e ventrali che contengono le vie motorie discendenti, contribuisce in maniera sostanziale alla funzione locomotoria nel ratto sottoposto a SCI; abbiamo in precedenza riferito che la quantificazione della mielina ventrale di riserva, valutata in una sezione semi-sottile, dava risultati paragonabili quando si usava la fluoromielina (Vitellaro-Zuccarello e al., 2007). La scelta della sostanza ventrale bianca si è basata sulla conoscenza che la via spinale reticolare discende principalmente nei funicoli ipsilaterali dorso e ventrolaterali ed è direttamente coinvolta nella regolazione del movimento del piede del topo. (Vitellaro-Zuccarello e al., 2007).



**Fig. 1.** Effetto dei trattamenti con PBS e con CSE sulla guarigione dell'attività motoria in campo aperto dopo la SCI. Il recupero dell'attività locomotoria è stato valutato per un periodo di un mese e la valutazione si è basata sulla scala 9-point BMS. I valori rappresentano medie  $\pm$ SEM. Abbiamo analizzato le differenze statistiche con il test ANOVA seguito dal metodo post-test Bonferroni • Animali trattati con NSC (n=14). • Topi trattati con PBS (n=10). Simbologia : p<0.001; p<0.01. BMS: Basso Mouse Scale.

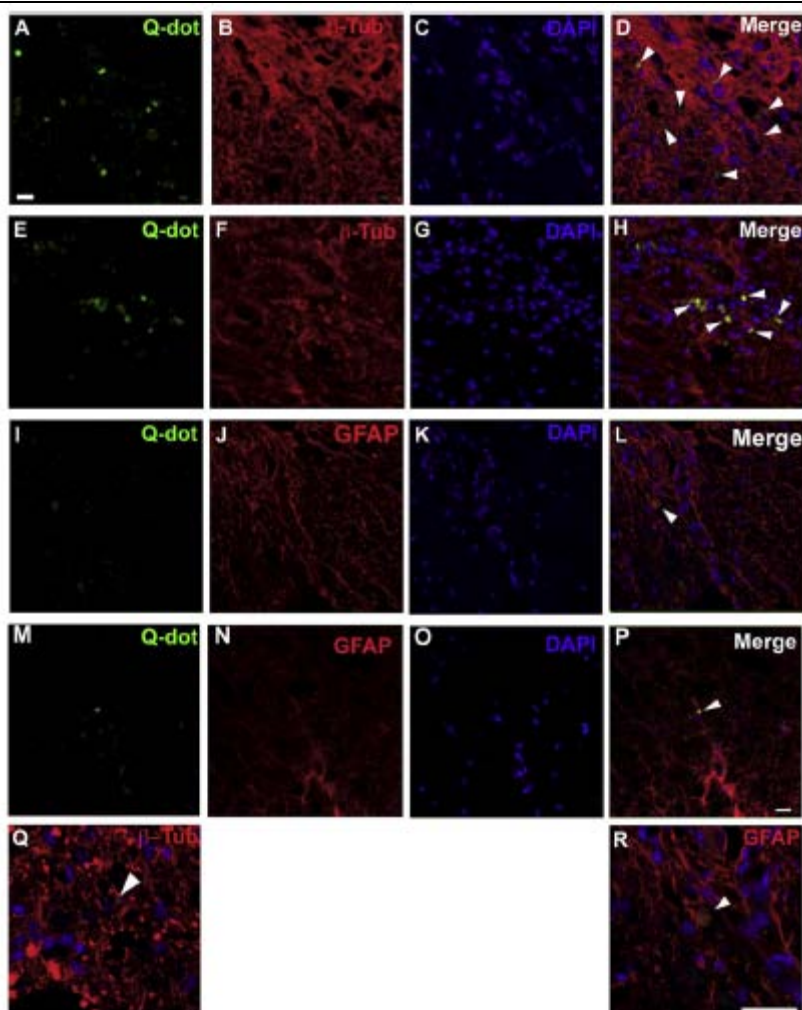


**Fig. 2.** Localizzazione delle CSE sul sito di lesione, 1 settimana dopo il trapianto. Analisi confocale di una sezione trasversale dello spessore di 10  $\mu$ m. I nuclei delle CSE sono stati marcati Hoechst e indicati dalla punta delle frecce in A. (A) Coloratura Hoechst ; (B)coloratura beta -tubulina III ; (C) Merge. La scala (50  $\mu$ m) vale per tutte le immagini.

Per effettuare un'analisi omogenea, la coloratura con fluoromielina è stata effettuata su sezioni di controllo e gli animali trattati sono stati posti sulla stessa copertura in vetro. Le immagini al microscopio confocale dei topi di controllo e dei topi trattati con CSE sono stati ottenute impiegando la stessa intensità, lo stesso stenopeico, la stessa lunghezza d'onda e lo stesso spessore dell'acquisizione. Come riferimento abbiamo usato sezioni vicine a quelle analizzate e non trattate con fluoromielina.

### **Valutazione del volume del letto vascolare nell'area lesa**

Si è valutato il volume relativo del letto vascolare per unità di sostanza grigia con il metodo di conteggio dei punti. (Weibel, 1979). Una griglia puntinata è stata sovrapposta casualmente su immagini confocali (tre per ogni animale) di sezioni trasverse di corno ventrale immunomarcate con lectina che si lega al glicocalice endoteliale.



**Fig. 3.** Differenziazione delle CSE trapiantate sul sito della lesione. Analisi confocale di una sezione trasversale di 10  $\mu$ m. I topi trapiantati con cellule CSE marcate Q-dot e soppressi dopo una settimana (A, B, C, D, I, J, K, L, Q e R) o 1 mese (E, F, G, H, M, N, O e P). (A, E, I e M) CSE marcate Q-dot (colorate in verde come colore falso); (B e F) cellule positive alla beta-tubulina III (colorate in rosso); (J e N) cellule positive GFAP (colorate in rosso); (C, G, K e O) nuclei positivi DAPI (colorati in blu); Merge (D, H, L, P, Q e R). La scala in P 20  $\mu$ m è rappresentativa di tutte le immagini tranne Q e R. La scala (Q e R) è 20  $\mu$ m.

L'area associata a ciascun punto era di 50  $\mu$ m<sup>2</sup>. La dimensione del vaso è stata valutata contando i punti che si trovavano su ciascun profilo vascolare e classificata in quattro classi arbitrarie: vasi interessati da 1 o 2 punti, da 3 o 4 punti, da 5-10 punti e da più di 10 punti.

### **Valutazione dell'infiltrazione del tessuto neutrofilo**

I neutrofili sono stati identificati in sezioni seriali che si estendevano per 4 mm all'epicentro della lesione tramite la tecnica cloroacetato di naftolo AS-D per l'esterasi. Il sostrato è stato dissolto in dimetil sulfossido/Triton X-100 (9:1; v/v), e successivamente si è aggiunto idrocloruro di pararosanilina in una soluzione salina tamponata come descritto altrove (Schlayer e al., 1988). Si è fatta la media delle cellule positive colorate in rosso presenti in un gruppo di tre sezioni consecutive (dello spessore di 10  $\mu$ m) e abbiamo ripetuto questo conteggio ogni 400  $\mu$ m). Si è ottenuto il numero totale di neutrofili integrando la media all'interno del volume relativo a 4 mm intorno all'epicentro (Coggeshall, 1992).

### ***Valutazione del tessuto spinale di riserva***

Si è determinata la quantità di tessuto spinale in cieco in sezioni criostatiche orizzontali dello spessore di 10 µm colorate in viola Cresyl; l'area del tessuto danneggiato ("tessuto perso" e "tessuto infiltrato") è stata determinata in una media di tre sezioni ad intervalli di 400 µm intorno all'epicentro della lesione e nella parte caudale a livello T10. (Patist e al., 2004).

### ***Analisi statistica***

I dati sono espressi come media (AV)±errore standard media (SEM). I dati dai punteggi BMS, PCR in tempo reale sono stati valutati usando il test ANOVA seguito dal post-test Bonferroni. La differenza statistica del letto vascolare è stata valutata con ANOVA, seguita da un test post-hoc Tukey. Le differenze statistiche della mielina, dell'espressione del NG2, dell'infiltrazione di macrofagi e neutrofili sono state valutate con un t-test non appaiato. I risultati sono stati considerati statisticamente significativi con  $P < 0.05$ .

## **RISULTATI**

### ***Il trapianto di CSE migliora il recupero della funzione degli arti posteriori***

Si è inferta la lesione ai topi usando una forza di 50 kdyn sul midollo spinale esposto, poi è stata analizzata la funzione motoria in campo aperto e il punteggio è stato determinato in base alla Basso Mouse Scale (Basso e al., 2006). Gli animali da esperimento, esaminati il giorno precedente la lesione avevano il punteggio massimo (9 punti) nella scala; tuttavia il punteggio BMS si abbassava a 0 in seguito alla SCI (Fig. 1). I topi trattati con veicolo hanno rivelato un graduale recupero che ha raggiunto il suo massimo ( $3.58 \pm 0.23$  punti della scala BMS,  $n=10$ ) entro 4 settimane (Fig. 1). Questo punteggio corrisponde alla posizione plantare con o senza sostegno del peso. I topi lesi trattati con CSE (vedi Materiali e Metodi) hanno rivelato un grado di recupero più precoce e migliore (fino a  $4.61 \pm 0.13$  al giorno 28,  $n=14$ ), che corrispondeva a un movimento plantare scoordinato occasionale o frequente. Tale miglioramento è stato raggiunto entro i primi 7 giorni e mantenuto per tutto il periodo di sperimentazione (Fig. 1). I trattamenti con il veicolo o i fibroblasti hanno prodotto un grado simile di recupero come già riferito dal nostro gruppo (Bottai e al., 2008).

### ***Homing delle CSE verso il sito della lesione, sopravvivenza e espressione dell'antigene***

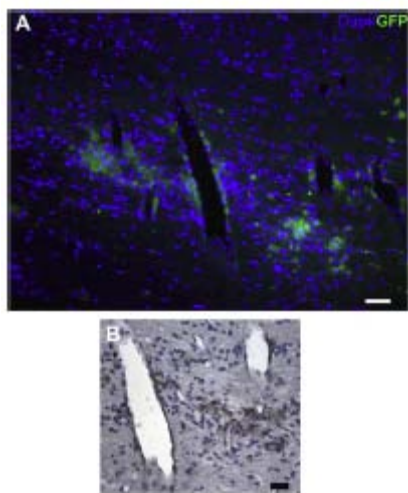
Per identificare le cellule trapiantate nel midollo spinale le CSE sono state marcate con Hoechst 33342 (Fig. 2) o con Q-dot (Fig. 3). Le CSE accumulate sul sito della lesione sono state rintracciate e contate a 7 giorni (Figs. 2A, B, C e 3A, B, C, D, I, J, K, L, Q e R e Figura 3 supplementare) e a 30 giorni (Figs. 3E, F, G, H, M, N, O, e P) dopo il trapianto. Abbiamo sezionato e analizzato in serie 3 midolli spinali dopo il trapianto con CSE marcate Q-dot, come descritto in Materiali e Metodi. Si è trovata una media di cellule  $6269 \pm 2138$  (0.6% delle cellule iniettate) nel sito della lesione 7 giorni dopo la lesione mentre il numero medio si è ridotto a  $385 \pm 94$  dopo un mese (0.04% del totale trapiantato).

La maggior parte delle cellule marcate Q-dot, collocate in prossimità della lesione hanno rivelato marcatori neuronali e gliali come la beta-tubulina III e GFAP. Una settimana dopo il trapianto (Fig. 2 A, B, C e 3A, B, C, D, I, J, K, L, Q e R e figura supplementare 3) l'87% e l'83% delle cellule marcate con Q-dot hanno espresso rispettivamente beta-tubulina III e GFAP (il 70% delle cellule marcate con Q-dot) hanno espresso entrambi gli antigeni (figura supplementare 3). Queste percentuali erano ancora confrontabili a 1 mese dopo il trapianto (Fig. 3E, F, G, H, M, N, O e P). Non è stata osservata alcuna distribuzione differenziale fra la sostanza bianca e la grigia. Le CSE applicate non si sono differenziate dal punto di vista morfologico nel midollo lesio e hanno mantenuto una forma rotonda (Fig. 3).

Sono state trovate CSE anche nel midollo sacrale intatto dei topi con lesione del midollo spinale; l'accumulo di CSE era anche pronunciato in prossimità dei vasi dilatati (Fig. 4). Queste cellule erano positive sia alla nestina sia alla beta-tubulina (dati non riportati) e negative al GFAP.

### ***Infiltrazione di macrofagi e neutrofili nel sito della lesione***

Sono state valutate quantitativamente le cellule ED1-positive infiltrate nel sito della lesione dopo 1 settimana e dopo 1 mese per mezzo dell'immunocoloratura anticorpo ED1e dell'analisi confocale. Il numero di cellule ED-1-positive negli animali trattati con PBS era di  $12.685 \pm 1575$  ( $n=2$ ) una settimana dopo il trapianto (Fig. 5M), e rimaneva immutata dopo un mese (Fig. 5N.) Questo dato era molto inferiore nei topi trattati con CSE:  $5056 \pm 59$  ( $n=3$ ) a 1 settimana ed è sceso ulteriormente a  $1493 \pm 296$  ( $n=2$ ) dopo un mese (Fig. 5M, N). La differenza con i topi trattati con PBS era significativa a livello  $P < 0.01$ . Nessuna delle cellule ED1 positive era anche positiva al Q-dot, indicando che la valutazione del numero di cellule trapiantate 1 settimana e 1 mese dopo il trapianto non era stata sopravvalutata. Il livello dell'espressione di ED1 nei topi trattati con CSE (Figs. 5 J, K, and L) dopo il trapianto era molto inferiore di quella dei topi trattati con PBS, e indicava che molto probabilmente il trattamento con CSE riduce l'attivazione di queste cellule invasive.

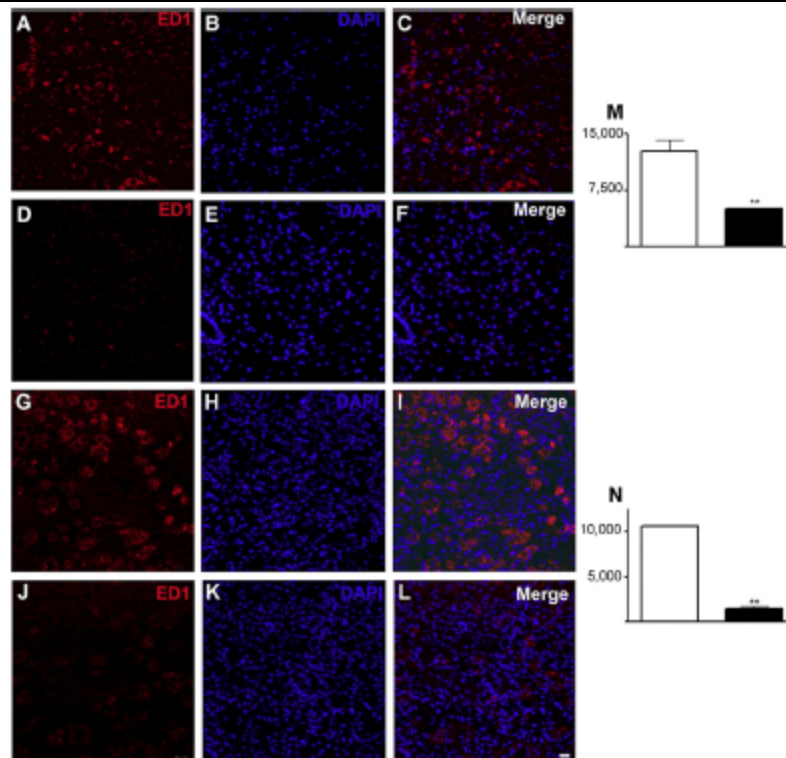


**Fig. 4. (A)** Erronea collocazione delle cellule trapiantate marcate con GFP nella regione caudale del midollo spinale lesio. Notare i vasi allargati. Questa è una sezione longitudinale del midollo spinale lesio a un mese dal trapianto delle CSE. Sezione trasversale criostatica seriale dello spessore di  $10 \mu\text{m}$ . **(B)** La successiva sezione seriale longitudinale è stata colorata per la nestina usando DAB. Sono state individuate molte cellule positive alla nestina nella vicinanza di un vaso allargato.

Si è osservato un risultato analogo quando abbiamo quantificato l'infiltrazione neutrofila. Una settimana dopo il trapianto il numero di neutrofili nell'ambito di 3 mm dall'epicentro della lesione era più di 10 volte superiore nei topi trattati con PBS ( $303,260 \pm 1847$ ) che nei topi a cui erano state trapiantate le CSE ( $26,282 \pm 1876$ ) (Figura supplementare 2). La differenza era significativa a livello  $P < 0.01$ . Come previsto, il numero di neutrofili diminuiva con il passare del tempo ed era di molto ridotto e paragonabile fra i due gruppi 1 mese dopo la lesione.

### **Chemochina mediata dalle CSE ed espressione del fattore di crescita nel midollo spinale lesio**

La precoce azione che favoriva il recupero della funzione motoria suggeriva una modificazione dell'ambiente del sito della lesione da parte delle CSE. Abbiamo quindi analizzato la produzione di fattori neurotrofici e di citochine infiammatorie sul sito della lesione (Gorio e al., 2002, 2005, 2007; Thoenen and Sendtner, 2002). Questa valutazione è stata effettuata 1, 2 e 7 giorni dopo la somministrazione delle CSE. Abbiamo analizzato i livelli di mRNA di sette diverse chemochine (Fig. 6), in particolare BDNF; CNTF; NT3; NGF; TNF-alfa; IL6 e LIF. La valutazione è stata effettuata paragonando la regione lesa a livello T8 di animali trattati con PBS, fibroblasti o CSE e la regione a livello T8 del midollo spinale di topi non lesi o laminectomizzati. Ciascuno di questi gruppi era composto di cinque topi e abbiamo effettuato tre Q-RT-PCRs per punto temporale (in ogni esperimento abbiamo eseguito un duplicato per campione e un PCR parallelo per il gene di interesse e il gene di riferimento Deidrogenasi trifosfata di Gliceraleide).



**Fig. 5.** Cellule marcate ED1 sul sito della lesione (400  $\mu\text{m}$  in posizione rostrale rispetto all'epicentro delle lesione). Analisi confocale di sezione trasversale di 10 $\mu\text{m}$ . Paragone fra topi trattati con PBS (A, B e C) 1 settimana e (G, H and I) 1 mese dopo la lesione ) e topi trattati con CSE (D, E e F) 1 settimana (J, K e L) 1 mese dopo la lesione). Coloratura ED1(A, D, G e J); (B, E, H e K) coloratura DAPI s; (C, F, I and L) Merge. (La scala 25  $\mu\text{m}$ ) è rappresentativa per tutte le immagini). M e N (PBS barra bianca, e CSE, barra nera) quantificazione delle differenze relative dei livelli dei macrofagi (ED1 positive) sul sito della lesione rispettivamente 1 settimana e 1 mese dopo il trapianto.  $P < 0.01$ . Le differenze sono state valutate con il t-test non parametrico.

La maggior parte delle chemochine sono aumentate dopo la lesione, ma non si sono osservate differenze significative negli animali trattati con CSE. Solo l'espressione del LIF e del TNF-alfa è stata interessata dal trattamento con CSE paragonata ai topi trattati con PBS (Fig. 6). Entro 48 ore dalla lesione le CSE hanno provocato una significativa diminuzione di LIF mentre il TNF-alfa aumentava. Questo effetto era probabilmente dovuto alla presenza di CSE dal momento che non era presente in animali trattati con fibroblasti. Non si è trovata alcuna variazione per le altre citochine in nessuno momento testato dopo il trapianto.

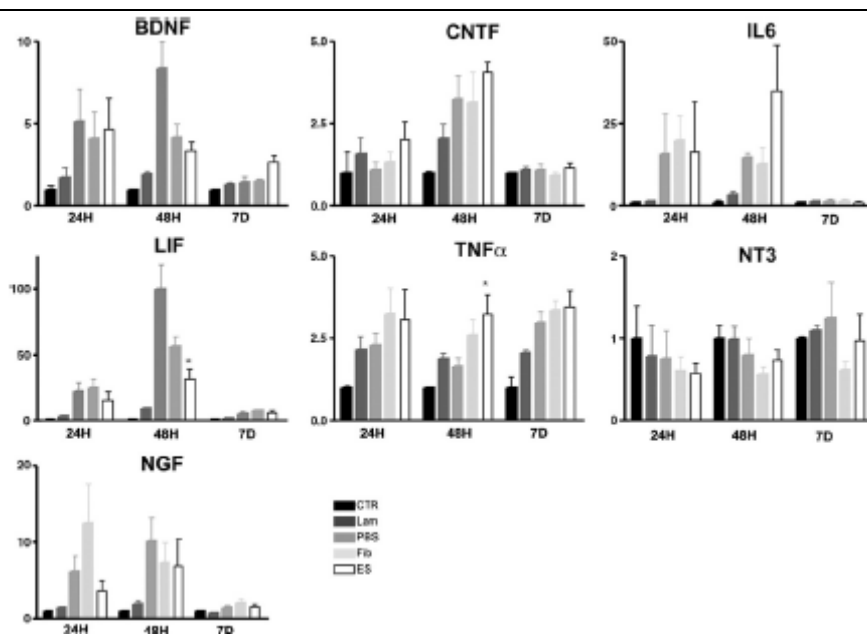
### **Conservazione della mielina ventrale**

Parecchi studi sulla SCI in modelli animali si sono concentrati sui tratti corticospinali (CST) o rubrospinali dal momento che questi tratti corrono come fasci piuttosto distinti nel midollo spinale dorsale e quindi possono essere asportati e/o esaminati istologicamente abbastanza facilmente. Mentre questi tratti hanno ruoli principali nel controllo dei movimenti motori fini, il loro coinvolgimento nella funzione locomotoria è parziale (Whishaw e al., 1998). Un percorso importante nella stimolazione della locomozione è il tratto reticolospinale che scende principalmente nei funicoli dorsali ipsilaterali e ventrolaterali. La sua funzione nello stimolare l'attività delle reti spinali che coordinano i movimenti ritmici dell'andatura è stata dimostrata in studi elettrofisiologici in midolli di controllo e lesi (Ballermann and Fouad, 2006; Mori e al., 1998). In questa regione la mielina è stata valutata a 0.4 mm rostrali rispetto al sito della lesione. Criosezioni trasversali sono state colorate con fluoromielina ed è

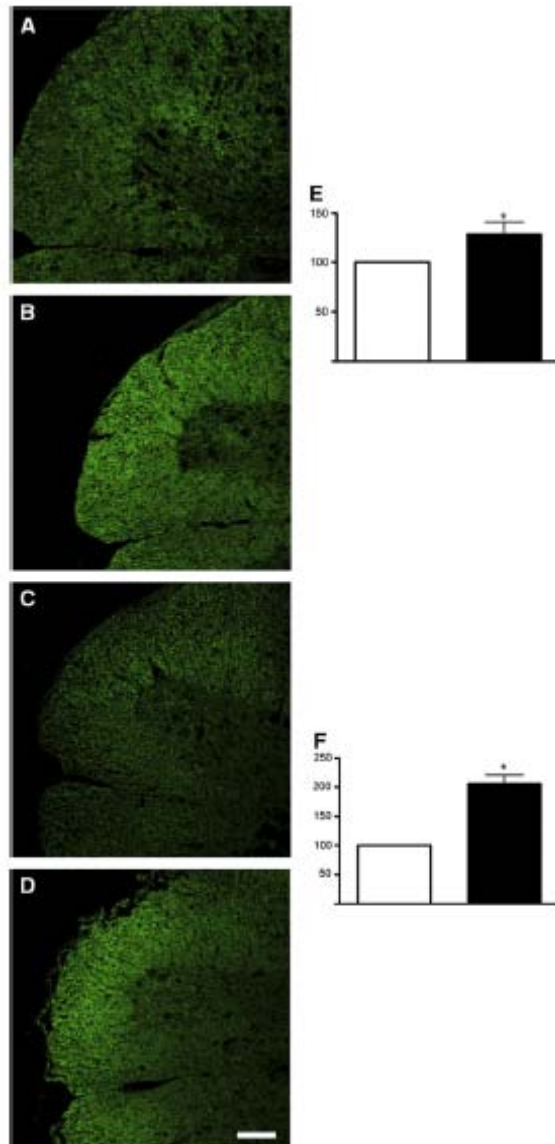
stata confrontata la fluorescenza del corno ventrale dei topi trattati con PBS e CSE. Sono poi state valutate successive sezioni alla distanza di 100 $\mu$ m e la Fig. 7 mostra il risultato di un esperimento rappresentativo. La fluorescenza delle tre preparazioni è stata confrontata con il microscopio confocale, mantenendo voltaggio, stenopeico e area di analisi costante. I livelli di mielina nei topi trattati con CSE erano significativamente più alti (29 $\pm$ 11%) dopo 1 settimana e ancor più dopo un mese (106 $\pm$ 14%) (Fig. 7 E e F rispettivamente, P<0.05) che nei topi trattati con PBS. Il trattamento con CSE ha anche favorito la conservazione del tessuto nel sito della lesione. Il tessuto di riserva nei topi trattati con CSE era significativamente più alto (75% $\pm$ 3) (media $\pm$ SEM) che nei topi di controllo PBS (58.4% $\pm$ 1.4) (P<0.05). Questa differenza non era presente a livello T10 dove più del 90% del tessuto era di riserva. (Figura supplementare).

### Espressione del NG2 sul sito della lesione

Il miglioramento delle condizioni della mielina nei topi trattati con CSE potrebbe essere in correlazione con i livelli più alti dei precursori degli oligodendrociti sul sito della lesione. Nella Fig. 8 si vede che la densità di cellule NG2-positive è molto più alta nei topi trattati con CSE (Figg. 8 A e B) 1 settimana dopo la lesione. Tuttavia, nessuna delle cellule NG2-positive erano marcate Q-dot il che suggerisce che i precursori degli oligodendrociti potrebbero non derivare dalle CSE esogene marcate Q-dot.



**Fig. 6.** PCR in tempo reale dell'espressione di diverse citochine: BDNF (Fattore neurotrofico derivato dal cervello), CNTF (Fattore neurotrofico ciliare), IL-6 (Interleucina-6), LIF (Fattore inibitore della leucemia), NGF (Fattore di crescita nervosa), NT3 (Fattore-3 neurotrofico), TNF-alfa (Fattore di necrosi tumorale), MIP2 (Proteina-2 del macrofago infiammatorio). Le barre indicano la differenza di quantità dei livelli di RNA negli animali trattati paragonata agli animali di controllo non trattati  $\pm$ SEM. 24 ore; 48 ore e 7 giorni significa che l'analisi è stata fatta rispettivamente 24, 48 ore e 7 giorni dopo il trapianto. Barre nere: animali di tipo selvatico; barre grigio scuro: animali laminectomizzati; barre grigio medio: animali trattati con PBS; barre grigio chiaro: animali trattati con fibroblasti; barre bianche: animali trattati con CSE. Le differenze significative sono indicate solo per gli animali trattati con CSE quando il loro effetto era diverso in modo significativo dai topi trattati con PBS e quanto l'effetto del trapianto con fibroblasti non era significativo  $P < 0.05$ . Le differenze sono state valutate con ANOVA seguito dal post-test Bonferroni.



**Fig. 7.** Espressione della mielina rostrale a 0,4 mm dal sito della lesione. E' stato analizzato il corno ventrale sinistro. Analisi confocale di una sezione trasversale dello spessore di 10 μm . (A, B, C e D). Coloratura della fluoromielina. Paragone fra topi trattati con PBS (A a 1 settimana e C a 1 mese dopo la lesione) e topi trattati con CSE (B a una settimana e D a 1 mese dopo la lesione). (La scala (100 μm) è rappresentativa per tutte le immagini). E e F (PBS, barra bianca e CSE barra nera ) quantificazione delle differenze relative di livelli di mielina nella sostanza ventrale bianca fra i topi trattati con PBS e i topi trattati con CSE rispettivamente 1 settimana e 1 mese dopo il trapianto.  $P < 0.05$ . Le differenze sono state valutate con un test non parametrico.

### **Analisi del compartimento vascolare**

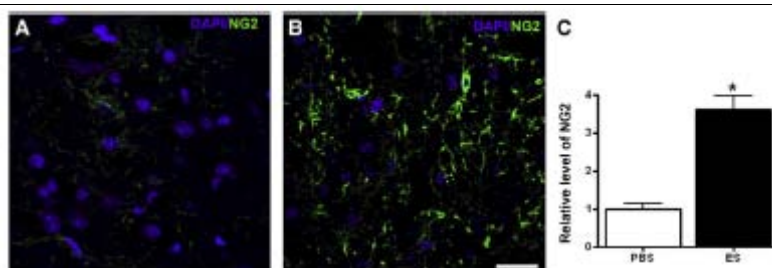
Il volume del compartimento vascolare nel corno ventrale sul sito della lesione era paragonabile fra i due gruppi (trattati con CSE e controlli) sia a 1 settimana sia a 1 mese dopo la lesione.

## **DISCUSSIONE**

I risultati del nostro studio confermano ulteriormente la validità del trattamento cellulare per favorire la guarigione dopo SCI. Non è stata osservata alcuna ricostituzione spinale del tessuto, e non è stato determinato alcun cambiamento nella produzione di citochine, ma la conservazione della mielina è stata un effetto piuttosto importante e può essere il risultato della neutralizzazione dell'invasione delle cellule infiammatorie. Il rapido miglioramento della funzione motoria degli arti posteriori favorita dalle CSE entro i primi 7 giorni è stata piuttosto stabile e non si sono registrati successivamente grandi cambiamenti. Questa mancanza di ulteriori miglioramenti può essere dovuta al piccolo numero di CSE (6269) migrate verso l'area della lesione e alla loro successiva scarsa sopravvivenza. Esperimenti in vitro non hanno rivelato alcuna interferenza della marcatura Q-dot con la proliferazione delle CSE e il Q-dot è stato mantenuto per più di 6 settimane in vitro (Bottai, Cigognini e Gorio, risultati inediti). Quindi l'esiguo numero di CSE rilevate è improbabile che sia dovuto alla perdita della marcatura.

Il Q-dot non si trasferisce alle cellule adiacenti dopo il trapianto in vivo (Rosen et al., 2007), a meno che le cellule marcate Q-dot non siano state fagocitate da cellule infiammatorie. Si sa che la somministrazione esogena di alcune citochine può migliorare il recupero funzionale dopo la SCI (Giehl e Tetzlaff, 1996; Ruitenberg e al., 2004; Sayer e al., 2002), e, infatti, il miglioramento nella guarigione favorita da NSC adulte è stata accompagnata da un aumento significativo dell'espressione della citochina (Bottai e al., 2008); tuttavia, nel presente studio noi abbiamo determinato solo un effetto marginale delle CSE sulla loro espressione. Ciononostante è stata osservata una notevole riduzione dell'invasione di neutrofili e macrofagi nel sito della lesione, e questo suggerisce un chiaro effetto sulle componenti cellulari della reazione infiammatoria scatenata dalla SCI; potrebbe essere che la riduzione del numero dei macrofagi contribuisca a diminuire la retrazione degli assoni lesi tramite le interazioni fisiche intercellulari, come dimostrato di recente (Horn e al., 2008). I neutrofili e i macrofagi ematogenici invadono il midollo spinale danneggiato e raggiungono un picco rispettivamente 12–24 ore e 5–7 giorni dopo la SCI (Popovich e al., 1997; Taoka e al., 1997) e rilasciano citochine pro-infiammatorie e specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto (Popovich e al., 1999; Taoka e Okajima, 1998). È stato evidenziato che i trattamenti anti infiammatori interrompevano selettivamente l'azione iniziale distruttiva mediata dai leucociti nel midollo lesio, lasciando un'opportunità per successivi interventi rigenerativi e risposte di rigenerazione della ferita (Gorio et al., 2007; Gris e al., 2004). La ridotta componente cellulare promossa dalle CSE può essere la radice degli effetti di mielina di riserva. Viene spesso riferito un qualche spontaneo recupero della funzione nei primi periodi dopo la lesione al midollo (SCI) nell'uomo e negli animali sperimentali. Questo potrebbe essere attribuito agli assoni di riserva e alla riorganizzazione dei tratti discendenti reticolo spinali ventrali e cortico spinali (Courtine e al., 2008; Weidner e al., 2001). Questo concorda con studi precedenti che dimostrano che la riserva anche di piccole porzioni del funicolo ventrolateale che contiene le vie motorie discendenti è un fattore importante per ottenere il recupero funzionale e conferma il contributo significativo delle vie ventrali per la locomozione dei roditori (Ballermann e Fouad, 2006; Little e al., 1988; Schucht e al., 2002) e può essere fondamentale nel limitare il deficit funzionale (Vitellaro-Zuccarello e al., 2007).

In seguito a una contusione la sostanza ventrale bianca viene inizialmente messa in riserva e poi viene progressivamente coinvolta e la demielinizzazione peggiora con l'infiltrazione dei macrofagi/microglia; anche l'astrocitosi reattiva contribuisce a questo evento (Frei e al., 2000; Popovich e al., 2002; Popovich e al., 1999; Shuman e al., 1997). La demielinizzazione dovuta alla morte dell'oligodendrocita si verifica sia negli umani (Bunge e al., 1993) sia nei modelli animali lesi da SCI (Blight, 1985). Anche l'apoptosi è coinvolta come contribuente fondamentale nella morte dell'oligodendrocita, specialmente nei tratti di sostanza bianca lontani dal sito della lesione (Beattie e al., 2002; Crowe e al., 1997). Le terapie volte a prevenire la morte degli oligodendrociti possono spiegare la ri-mielinizzazione di assoni precedentemente de-mielinizzati da parte degli oligodendrociti sopravvissuti, e questo può aiutare a migliorare il recupero funzionale (Springer e al., 2000). In uno studio analogo l'aumento di riserva di sostanza bianca ventrale nei ratti trattati con rhEPO è stato associato a un significativo aumento numerico di cellule progenitrici di oligodendrociti (OPC) (Vitellaro-Zuccarello e al., 2007). Analogamente le CSE hanno aumentato la riserva di sostanza bianca e hanno aumentato il numero di precursori degli oligodendrociti (OPC). Anche l'aumento di cellule positive al NG2 dopo il trauma è stato descritto nelle lesioni corticali del topo (Hampton e al., 2004; Levine, 1994). Nel midollo spinale adulto una piccola sottosezione di cellule che esprimono NG2 possono non essere OPC e possono essere in grado di reagire alla SCI in modo vigoroso (McTigue et al., 2006), quindi è possibile che parte delle cellule positive al NG2 osservate nella riserva di sostanza bianca non siano costituite da precursori cellulari degli oligodendrociti. Tuttavia, il grande miglioramento della condizione della mielina osservata nei topi trattati con CSE è a sostegno dell'ipotesi di un aumento della popolazione di precursori dell'oligodendrocita. In un lavoro esemplare i topi sono stati trapiantati con CSE indifferenziate (con e senza induzione di neutralizzazione usando il trattamento con acido retinoico) e i trapianti sono sopravvissuti nel 100% dei topi ospitanti, esibendo una dimensione e una morfologia variabile e sviluppando un grande numero di cellule con un fenotipo neuronale.



**Fig. 8.** Cellule NG2-positve (in verde) sul sito della lesione. Analisi confocale di sezione trasversale dello spessore di 10  $\mu$ m. Paragone fra topi trattati con PBS (A) e topi trattati con CSE (B) 1 settimana dopo la lesione.

(La scala 20  $\mu$ m) è rappresentativa per tutte le immagini). I nuclei colorati con DAPI sono indicati in blu. (C) Espressione relativa del NG2 fra i topi trattati con PBS (barra bianca), e CSE (barra nera), il livello di espressione del NG2 è stato calcolato misurando l'OD della sostanza ventrale bianca di sei sezioni di due animali trattati (PBS) e tre (CSE) in una regione che si estendeva di 1 mm rostralmente e caudalmente rispetto alla lesione.  $P < 0.05$ , le differenze sono state valutate con un t-test non appaiato.

Trapianti tipici di 5–10 mm (3) contenevano 10–20.000 neuroni TH (Deacon e al., 1998). Quindi il CNS è in grado di indurre la differenziazione di una frazione significativa di CSE trapiantate. Anche il trapianto di CSE a diversi gradi di differenziazione per il sistema nervoso centrale di animali in salute (Bjorklund e al., 2002) o animali lesi (McDonald e al., 1999) ha prodotto neuroni e cellule gliali differenziate.

Tuttavia nelle nostre condizioni le CSE promuovono il recupero della funzione, aumentano la riserva di mielina, e neutralizzano le cellule infiammatorie, senza provocare una differenziazione morfologica. La maggior parte delle cellule trapiantate, individuate nel midollo spinale, erano positive al primo marcatore neuronale beta-tubulina e al GFAP, indicando la loro incompleta differenziazione. Questo è coerente con la recente scoperta che i precursori neurali situati nella zona sub ventricolare esprimono marcatori come LeX e sono anche positivi per la beta-tubulina (Mo e al., 2007). Inoltre, durante lo sviluppo dei mammiferi e degli uccelli, la beta-tubulina è considerata essere una delle proteine marcatrici citoscheletriche associate ai neuroni; la loro espressione, o immediatamente prima o durante la mitosi terminale, suggerisce che la beta-tubulina può essere regolata da fattori di trascrizione necessari per l'impegno della linea neuronale e la prima differenziazione morfologica (Katssetos e al., 2003).

Non abbiamo trovato formazioni tumorali in alcun organo nel lasso di tempo del nostro studio. Tuttavia abbiamo individuato una vasta popolazione di CSE marcate nel midollo spinale sacrale e molto lontano dal sito della lesione. Qui le cellule staminali si erano differenziate attraverso l'espressione di nestina e di beta-tubulina III. Quindi il nostro studio suggerisce anche che le CSE possono essere meno target specifiche (verso il sito della lesione) dei precursori neurali adulti (Bottai e al., 2008).

## RINGRAZIAMENTI

Per il loro continuo sostegno ringraziamo i dottori Guglielmo Brayda, Fabio Colbucci, Roberto Piperno, Maria Taricco, Giulio Cicognani, del Comitato scientifico della Fondazione Montecatone onlus, Via Montecatone 43, 40026 Imola (BO).

## REFERENCES

- Agudo, M., Woodhoo, A., Webber, D., Mirsky, R., Jessen, K.R., McMahon, S.B., 2008.
- Schwann cell precursors transplanted into the injured spinal cord multiply, integrate and are permissive for axon growth. *Glia* 56, 1263–1270.
- Alvarez, A., Gomez-Urquijo, S., Ramos, A., Hilario, E., 2004. Cells from the inner mass of blastocyst as a source of neural derivatives for differentiation studies. *Histol. Histopathol.* 19, 371–379.
- Ankeny, D.P., McTigue, D.M., Jakeman, L.B., 2004. Bone marrow transplants provide tissue protection and directional guidance for axons after contusive spinal cord injury in rats. *Exp. Neurol.* 190, 17–31.
- Arnhold, S., Lenartz, D., Kruttwig, K., Klinz, F.J., Kolossov, E., Hescheler, J., Sturm, V., Andressen, C., Addicks, K., 2000. Differentiation of green fluorescent protein-labeled embryonic stem cell-derived neural precursor cells into Thy-1-positive neurons and glia after transplantation into adult rat striatum. *J. Neurosurg.* 93, 1026–1032.
- Ballermann, M., Fouad, K., 2006. Spontaneous locomotor recovery in spinal cord injured rats is accompanied by anatomical plasticity of reticulospinal fibers. *Eur. J. Neurosci.* 23, 1988–1996.
- Barritt, A.W., Davies, M., Marchand, F., Hartley, R., Grist, J., Yip, P., McMahon, S.B., Bradbury, E.J., 2006. Chondroitinase ABC promotes sprouting of intact and injured spinal systems after spinal cord injury. *J. Neurosci.* 26, 10856–10867.
- Basso, D.M., Fisher, L.C., Anderson, A.J., Jakeman, L.B., McTigue, D.M., Popovich, P.G., 2006. Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. *J. Neurotrauma* 23, 35–659.
- Beattie, M.S., Harrington, A.W., Lee, R., Kim, J.Y., Boyce, S.L., Longo, F.M., Bresnahan, J.C., Hempstead, B.L., Yoon, S.O., 2002. ProNGF induces p75-mediated death of oligodendrocytes following spinal cord injury. *Neuron* 36, 375–386.
- Bethea, J.R., 2000. Spinal cord injury-induced inflammation: a dual-edged sword. *Prog. Brain Res.* 128, 33–42.
- Biernaskie, J., Sparling, J.S., Liu, J., Shannon, C.P., Pleml, J.R., Xie, Y., Miller, F.D., Tetzlaff, W., 2007. Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells that promote remyelination and functional recovery after contusion spinal cord injury. *J. Neurosci.* 27, 9545–9559.
- Bjorklund, L.M., Sanchez-Pernate, R., Chung, S., Andersson, T., Chen, I.Y., McNaught, K.S., Brownell, A.L., Jenkins, B.G., Wahlestedt, C., Kim, K.S., Isacson, O., 2002. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 2344–2349.
- Blight, A.R., 1985. Delayed demyelination and macrophage invasion: a candidate for secondary cell damage in spinal cord injury. *Cent. Nerv. Syst. Trauma* 2, 299–315.
- Bottai, D., Madaschi, L., Di Giulio, A.M., Gorio, A., 2008. Viability-dependent promoting action of adult neural precursors in spinal cord injury. *Mol. Med.* 14, 634–644.
- Bunge, R.P., Puckett, W.R., Baccera, J.L., Marcillo, A., Quencer, R.M., 1993. Observations on the pathology of human spinal cord injury. A review and classification of 22 new cases with details from a case of chronic cord compression with extensive focal demyelination. *Adv. Neurol.* 59, 75–89.
- Buss, A., Pech, K., Merkler, D., Kakulas, B.A., Martin, D., Schoenen, J., Noth, J., Schwab, M.E., Brook, G.A., 2005. Sequential loss of myelin proteins during Wallerian degeneration in the human spinal cord. *Brain* 128, 356–364.
- Chan, P., Yuen, T., Ruf, F., Gonzalez-Maeso, J., Sealton, S.C., 2005. Method for multiplex cellular detection of mRNAs using quantum dot fluorescent in situ hybridization. *Nucleic Acids Res.* e161, 33.
- Coggeshall, R.E., 1992. A consideration of neural counting methods. *Trends Neurosci.* 15, 9–13.
- Conti, L., Pollard, S.M., Gorba, T., Reitano, E., Toselli, M., Biella, G., Sun, Y., Sanzone, S., Ying, Q.L., Cattaneo, E., Smith, A., 2005. Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell. *PLoS Biol.* e283, 3.
- Conti, L., Reitano, E., Cattaneo, E., 2006. Neural stem cell systems: diversities and properties after transplantation in animal models of diseases. *Brain Pathol. (Zurich Switzerland)* 16, 143–154.
- Courtine, G., Song, B., Roy, R.R., Zhong, H., Herrmann, J.E., Ao, Y., Qi, J., Edgerton, V.R., Sofroniew, M.V., 2008. Recovery of supraspinal control of stepping via indirect propriospinal relay connections after spinal cord injury. *Nat. Med.* 14, 69–74.
- Crowe, M.J., Bresnahan, J.C., Shuman, S.L., Masters, J.N., Beattie, M.S., 1997. Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nat. Med.* 3, 73–76.
- Dahan, M., Levi, S., Luccardini, C., Rostaing, P., Riveau, B., Triller, A., 2003. Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking. *Science* 300, 442–445.
- Deacon, T., Dinsmore, J., Costantini, L.C., Ratliff, J., Isacson, O., 1998. Blastula-stage stem cells can differentiate into

- dopaminergic and serotonergic neurons after transplantation. *Exp. Neurol.* 149, 28–41.
- Deshpande, D.M., Kim, Y.S., Martinez, T., Carmen, J., Dike, S., Shats, I., Rubin, L.L., Drummond, J., Krishnan, C., Hoke, A., Maragakis, N., Shefner, J., Rothstein, J.D., Kerr, D.A., 2006. Recovery from paralysis in adult rats using embryonic stem cells. *Ann. Neurol.* 60, 32–44.
- Evans, M.J., Kaufman, M.H., 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154–156.
- Finley, M.F., Kulkarni, N., Huettner, J.E., 1996. Synapse formation and establishment of neuronal polarity by P19 embryonic carcinoma cells and embryonic stem cells. *J. Neurosci.* 16, 1056–1065.
- Fouad, K., Klusman, I., Schwab, M.E., 2004. Regenerating corticospinal fibers in the Marmoset (*Callitrix jacchus*) after spinal cord lesion and treatment with the anti-Nogo-A antibody IN-1. *Eur. J. Neurosci.* 20, 2479–2482.
- Frei, E., Klusman, I., Schnell, L., Schwab, M.E., 2000. Reactions of oligodendrocytes to spinal cord injury: cell survival and myelin repair. *Exp. Neurol.* 163, 373–380.
- Giehl, K.M., Tetzlaff, W., 1996. BDNF and NT-3, but not NGF, prevent axotomy-induced death of rat corticospinal neurons in vivo. *Eur. J. Neurosci.* 8, 1167–1175.
- Gozenbach, R.R., Schwab, M.E., 2008. Disinhibition of neurite growth to repair the injured adult CNS: focusing on Nogo. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 161–176.
- Gorio, A., Gokmen, N., Erbayraktar, S., Yilmaz, O., Madaschi, L., Cichetti, C., Di Giulio, A.M., Vardar, E., Cerami, A., Brines, M., 2002. Recombinant human erythropoietin counteracts secondary injury and markedly enhances neurological recovery from experimental spinal cord trauma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 9450–9455.
- Gorio, A., Torrente, Y., Madaschi, L., Di Stefano, A.B., Pisati, F., Marchesi, C., Belicchi, M., Di Giulio, A.M., Bresolin, N., 2004. Fate of autologous dermal stem cells transplanted into the spinal cord after traumatic injury (TSCI). *Neuroscience* 125, 179–189.
- Gorio, A., Madaschi, L., Di Stefano, B., Carelli, S., Di Giulio, A.M., De Biasi, S., Coleman, T., Cerami, A., Brines, M., 2005. Methylprednisolone neutralizes the beneficial effects of erythropoietin in experimental spinal cord injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 16379–16384.
- Gorio, A., Madaschi, L., Zadra, G., Marfia, G., Cavalieri, B., Bertini, R., Di Giulio, A.M., 2007. Reparixin, an inhibitor of CXCR2 function, attenuates inflammatory responses and promotes recovery of function after traumatic lesion to the spinal cord. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 322, 973–981.
- Gris, D., Marsh, D.R., Oatway, M.A., Chen, Y., Hamilton, E.F., Dekaban, G.A., Weaver, L.C., 2004. Transient blockade of the CD11d/CD18 integrin reduces secondary damage after spinal cord injury, improving sensory, autonomic, and motor function. *J. Neurosci.* 24, 4043–4051.
- Hall, E.D., 1992. The neuroprotective pharmacology of methylprednisolone. *J. Neurosurg.* 76, 13–22.
- Hampton, D.W., Rhodes, K.E., Zhao, C., Franklin, R.J., Fawcett, J.W., 2004. The responses of oligodendrocyte precursor cells, astrocytes and microglia to a cortical stab injury, in the brain. *Neuroscience* 127, 813–820.
- Hatch, M.N., Nistor, G., Keirstead, H.S., 2009. Derivation of high-purity oligodendroglial progenitors. *Methods Mol. Biol.* 549, 59–75.
- Horn, K.P., Busch, S.A., Hawthorne, A.L., van Rooijen, N., Silver, J., 2008. Another barrier to regeneration in the CNS: activated macrophages induce extensive retraction of dystrophic axons through direct physical interactions. *J. Neurosci.* 28, 9330–9341.
- Horvat, J.C., 1991. Transplants of fetal neural tissue and autologous peripheral nerves in an attempt to repair spinal cord injuries in the adult rat. An overall view. *Paraplegia* 29, 299–308.
- Houle, J.D., Reier, P.J., 1988. Transplantation of fetal spinal cord tissue into the chronically injured adult rat spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 269, 535–547.
- Katsetos, C.D., Herman, M.M., Mork, S.J., 2003. Class III beta-tubulin in human development and cancer. *Cell Motil. Cytoskelet.* 55, 77–96.
- Kim, S.S., Gwak, S.J., Choi, C.Y., Kim, B.S., 2005. Skin regeneration using keratinocytes and dermal fibroblasts cultured on biodegradable microspherical polymer scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res., B Appl. Biomater.* 75, 369–377.
- Klein, S., Svendsen, C.N., 2005. Stem cells in the injured spinal cord: reducing the pain and increasing the gain. *Nat. Neurosci.* 8, 259–260.
- Kleinsmith, L.J., Pierce Jr, G.B., 1964. Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. *Cancer Res.* 24, 1544–1551.
- Klussmann, S., Martin-Villalba, A., 2005. Molecular targets in spinal cord injury. *J. Mol. Med.* 83, 657–671.
- Kyung, K.S., Ho, C.W., Kwan, C.B., 2007. Potential therapeutic clue of skin-derived progenitor cells following cytokine-mediated signal overexpressed in injured spinal cord. *Tissue Eng.* 13, 1247–1258.
- Lavdas, A.A., Papastefanaki, F., Thomaidou, D., Matsas, R., 2008. Schwann cell transplantation for CNS repair. *Curr. Med. Chem.* 15, 151–160.
- Levine, J.M., 1994. Increased expression of the NG2 chondroitin-sulfate proteoglycan after brain injury. *J. Neurosci.* 14, 4716–4730.
- Little, J.W., Harris, R.M., Sohlberg, R.C., 1988. Locomotor recovery following subtotal spinal cord lesions in a rat model. *Neurosci. Lett.* 87, 189–194.
- Liu, S., Qu, Y., Stewart, T.J., Howard, M.J., Chakraborty, S., Holekamp, T.F., McDonald, J.W., 2000. Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 6126–6131.
- Marshall, C.T., Lu, C., Winstead, W., Zhang, X., Xiao, M., Harding, G., Klueber, K.M., Roisen, F.J., 2006. The therapeutic potential of human olfactory-derived stem cells. *Histol. Histopathol.* 21, 633–643.
- McDonald, J.W., Liu, X.Z., Qu, Y., Liu, S., Mickey, S.K., Turetsky, D., Gottlieb, D.I., Choi, D.W., 1999. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat. Med.* 5, 1410–1412.
- McTigue, D.M., Tripathi, R., Wei, P., 2006. NG2 colocalizes with axons and is expressed by a mixed cell population in spinal cord lesions. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65, 406–420.
- Mo, Z., Moore, A.R., Filipovic, R., Ogawa, Y., Kazuhiro, I., Antic, S.D., Zecevic, N., 2007. Human cortical neurons originate from radial glia and neuron-restricted progenitors. *J. Neurosci.* 27, 4132–4145.
- Mori, S., Matsui, T., Kuze, B., Asanome, M., Nakajima, K., Matsuyama, K., 1998. Cerebellar-induced locomotion: reticulospinal control of spinal rhythm generating mechanism in cats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 860, 94–105.
- Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W., Roder, J.C., 1993. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 8424–8428.
- Nussbaum, J., Minami, E., Laflamme, M.A., Virag, J.A., Ware, C.B., Masino, A., Muskheli, V., Pabon, L., Reinecke, H., Murry, C.E., 2007. Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. *FASEB J.* 21, 1345–1357.
- Patist, C.M., Mulder, M.B., Gautier, S.E., Maquet, V., Jerome, R., Oudega, M., 2004. Freeze-dried poly(D,L-lactic acid) macroporous guidance scaffolds impregnated with brain-derived neurotrophic factor in the transected adult rat thoracic spinal cord. *Biomaterials* 25, 1569–1582.
- Popovich, P.G., Jones, T.B., 2003. Manipulating neuroinflammatory reactions in the injured spinal cord: back to basics. *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 13–17.
- Popovich, P.G., Wei, P., Stokes, B.T., 1997. Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. *J. Comp. Neurol.* 377, 443–464.
- Popovich, P.G., Guan, Z., Wei, P., Huitinga, I., van Rooijen, N., Stokes, B.T., 1999. Depletion of hematogenous macrophages promotes partial hindlimb recovery and neuroanatomical repair after experimental spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 158, 351–365.
- Popovich, P.G., Guan, Z., McLaughly, V., Fisher, L., Hickey, W.F., Basso, D.M., 2002. The neuropathological and behavioral consequences of intraspinal microglial/macrophage activation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 61, 623–633.
- Puceat, M., Ballis, A., 2007. Embryonic stem cells: from bench to bedside. *Clin. Pharmacol. Ther.* 82, 337–339.
- Reier, P.J., 2004. Cellular transplantation strategies for spinal cord injury and translational neurobiology. *NeuroRx* 1, 424–451.
- Reubinoff, B.E., Pera, M.F., Fong, C.Y., Trounstein, A., Bongso, A., 2000. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat. Biotechnol.* 18, 399–404.

- Rosen, A.B., Kelly, D.J., Schuldt, A.J., Lu, J., Potapova, I.A., Doronin, S.V., Robichaud, K.J., Robinson, R.B., Rosen, M.R., Brink, P.R., Gaudette, G.R., Cohen, I.S., 2007. Finding fluorescent needles in the cardiac haystack: tracking human mesenchymal stem cells labeled with quantum dots for quantitative in vivo three-dimensional fluorescence analysis. *Stem Cells* 25, 2128–2138.
- Ruitenbergh, M.J., Blits, B., Dijkhuizen, P.A., te Beek, E.T., Bakker, A., van Heerikhuizen, J.J., Pool, C.W., Hermens, W.T., Boer, G.J., Verhaagen, J., 2004. Adeno-associated viral vector-mediated gene transfer of brain-derived neurotrophic factor reverses atrophy of rubrospinal neurons following both acute and chronic spinal cord injury. *Neurobiol. Dis.* 15, 394–406.
- Sayer, F.T., Oudega, M., Hagg, T., 2002. Neurotrophins reduce degeneration of injured ascending sensory and corticospinal motor axons in adult rat spinal cord. *Exp. Neurol.* 175, 282–296.
- Schlager, H.J., Laaff, H., Peters, T., Woort-Menker, M., Estler, H.C., Karck, U., Schaefer, H.E., Decker, K., 1988. Involvement of tumor necrosis factor in endotoxin-triggered neutrophil adherence to sinusoidal endothelial cells of mouse liver and its modulation in acute phase. *J. Hepatol.* 7, 239–249.
- Schucht, P., Raineteau, O., Schwab, M.E., Fouad, K., 2002. Anatomical correlates of locomotor recovery following dorsal and ventral lesions of the rat spinal cord. *Exp. Neurol.* 176, 143–153.
- Schultz, S.S., 2005. Adult stem cell application in spinal cord injury. *Curr. Drug Targets* 6, 63–73.
- Sharp, J., Keirstead, H.S., 2007. Therapeutic applications of oligodendrocyte precursors derived from human embryonic stem cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 434–440.
- Shuman, S.L., Bresnahan, J.C., Beattie, M.S., 1997. Apoptosis of microglia and oligodendrocytes after spinal cord contusion in rats. *J. Neurosci. Res.* 50, 798–808.
- Simonen, M., Pedersen, V., Weinmann, O., Schnell, L., Buss, A., Ledermann, B., Christ, F., Sansig, G., van der Putten, H., Schwab, M.E., 2003. Systemic deletion of the myelin-associated outgrowth inhibitor Nogo-A improves regenerative and plastic responses after spinal cord injury. *Neuron* 38, 201–211.
- Snyder, E.Y., Macklis, J.D., 1995. Multipotent neural progenitor or stem-like cells may be uniquely suited for therapy for some neurodegenerative conditions. *Clin. Neurosci.* 3, 310–316.
- Snyder, E.Y., Yoon, C., Flax, J.D., Macklis, J.D., 1997. Multipotent neural precursors can differentiate toward replacement of neurons undergoing targeted apoptotic degeneration in adult mouse neocortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 11663–11668.
- Springer, J.E., Azbill, R.D., Nottingham, S.A., Kennedy, S.E., 2000. Calcineurin-mediated BAD dephosphorylation activates the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury. *J. Neurosci.* 20, 7246–7251.
- Taoka, Y., Okajima, K., 1998. Spinal cord injury in the rat. *Prog. Neurobiol.* 56, 341–358.
- Taoka, Y., Okajima, K., Uchiba, M., Murakami, K., Kushimoto, S., Johno, M., Naruo, M., Okabe, H., Takatsuki, K., 1997. Role of neutrophils in spinal cord injury in the rat. *Neuroscience* 79, 1177–1182.
- Tessler, A., 1991. Intraspinal transplants. *Ann. Neurol.* 29, 115–123.
- Thoenen, H., Sendtner, M., 2002. Neurotrophins: from enthusiastic expectations through sobering experiences to rational therapeutic approaches. *Nat. Neurosci.* 5 Suppl, 1046–1050.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M., 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145–1147.
- Tiedemann, H., Asashima, M., Grunz, H., Knochel, W., 2001. Pluripotent cells (stem cells) and their determination and differentiation in early vertebrate embryogenesis. *Dev. Growth Differ.* 43, 469–502.
- Tom, V.J., Houle, J.D., 2008. Intraspinal microinjection of chondroitinase ABC following injury promotes axonal regeneration out of a peripheral nerve graft bridge. *Exp. Neurol.* 211, 315–319.
- Trounson, A., 2005. Human embryonic stem cell derivation and directed differentiation. *Ernst Schering Res. Found. Workshop* 27–44.
- Vats, A., Bielby, R.C., Tolley, N.S., Nerem, R., Polak, J.M., 2005. Stem Cells *Lancet* 366, 592–602.
- Vitellaro-Zuccarello, L., Mazzetti, S., Madaschi, L., Bosisio, P., Gorio, A., De Biasi, S., 2007. Erythropoietin-mediated preservation of the white matter in rat spinal cord injury. *Neuroscience* 144, 865–877.
- Weibel, E.R., 1979. *Stereological Methods. Practical Methods for Biological Morphometry*, Vol. I. Academic Press, New York.
- Weidner, N., Ner, A., Salimi, N., Tuszyński, M.H., 2001. Spontaneous corticospinal axonal plasticity and functional recovery after adult central nervous system injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 3513–3518.
- Whishaw, I.Q., Gorny, B., Sarna, J., 1998. Paw and limb use in skilled and spontaneous reaching after pyramidal tract, red nucleus and combined lesions in the rat: behavioral and anatomical dissociations. *Behav. Brain Res.* 93, 167–183.
- Zeng, X., Rao, M.S., 2007. Human embryonic stem cells: long term stability, absence of senescence and a potential cell source for neural replacement. *Neuroscience* 145, 1348–1358.