

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Scuola di Dottorato in Fisiopatologia, Farmacologia, Clinica e  
Terapia delle Malattie Metaboliche XXIV ciclo



**DIFFERENZIAMENTO E CREAZIONE DI UN MICROAMBIENTE  
RIGENERATIVO NELLA LESIONE MIDOLLARE DA PARTE DEI  
PRECURSORI NEURALI POST MORTEM (PM-NPCs).**

**ANALISI DI TIPO BIOCHIMICO, MORFOLOGICO, ED *IN VIVO* ATTRAVERSO LA  
RISONANZA MAGNETICA ED IL RECUPERO FUNZIONALE DEGLI ARTI  
POSTERIORI**

Direttore scuola di dottorato: Chiar.ma prof.ssa Anna Maria **DI GIULIO**

Docente guida: Chiar.mo prof. Alfredo **GORIO**

Tesi di Dottorato di:

**Davide Merli**

Matr. R08386

Anno Accademico 2010-2011

# INDICE

## INTRODUZIONE

1. La lesione spinale.....	pag.6
1.1 Epidemiologia della lesione spinale.....	pag.6
1.2 Fisiopatologia della lesione spinale.....	pag.8
1.2.1 La lesione spinale primaria.....	pag.8
1.2.2 La lesione spinale secondaria.....	pag.9
1.2.2.1 Fase immediata.....	pag.10
1.2.2.2 Fase acuta.....	pag.11
1.2.2.3 Fase intermedia.....	pag.18
1.2.2.4 Fase cronica.....	pag.18
1.3 Terapia nella lesione spinale.....	pag.21
1.3.1 Terapia cellulare.....	pag.21
1.4 Post Mortem Neural Precursor Cells (PM-NPCs).....	pag.24
2. Imaging <i>in vivo</i> .....	pag.25
2.1 Imaging cellulare.....	pag.27
2.2 Imaging e risonanza magnetica (MRI).....	pag.30

## SCOPO DELLA TESI

3. Scopo della tesi.....	pag.34
--------------------------	--------

## MATERIALI E METODI

4.1 Animali.....	pag.37
4.2 Coltura primaria.....	pag.37
4.3 Colture cellulari.....	pag.38
4.3.1 Conta cellulare.....	pag.39
4.3.2 Differenziamento.....	pag.39
4.3.3 Congelamento.....	pag.41
4.3.4 Scongelamento.....	pag.41
4.3.5 Fissaggio delle cellule differenziate.....	pag.41
4.3.6 Metodi di Marcatura delle PM-NPCs.....	pag.42
4.3.6.1 Marcatura con PKH26.....	pag.42
4.3.6.2 Marcatura con Hoechst.....	pag.42
4.3.6.3 Marcatura con SPIOs.....	pag.43
4.3.7 Colorazione di PERL.....	pag.44
4.3.8 Valutazione dell'efficienza di marcatura.....	pag.45
4.3.9. Valutazione del contenuto di ferro intracellulare.....	pag.45
4.4 Lesione spinale.....	pag.46
4.5 Trapianto delle cellule.....	pag.47
4.6 Valutazione del recupero motorio.....	pag.48
4.7 RM <i>in vivo</i> .....	pag.50
4.8 RM <i>ex vivo</i> .....	pag.50
4.9 Analisi morfologica e immunocitochimica.....	pag.51

4.9.1 Perfusione.....	pag.51
4.9.2 Estrazione del midollo.....	pag.51
4.9.3 Taglio dei tessuti.....	pag.51
4.9.4 Colorazione con cresil-violetto.....	pag.52
4.9.5 Immunofluorescenza.....	pag.52
4.9.5.1 Immunofluorescenza <i>in vivo</i> .....	pag.53
4.9.5.2 Immunofluorescenza <i>in vitro</i> .....	pag.55
4.9.6 Colorazione con fluoromielina.....	pag.56
4.9.7 Valutazione dell'infiammazione.....	pag.57
4.9.7.1 Quantificazione dei neutrofili.....	pag.57
4.9.7.2 Quantificazione dei macrofagi.....	pag.57
4.10 Analisi di citochine.....	pag.59
4.10.1 Estrazione RNA dai tessuti.....	pag.59
4.10.2 Retro trascrizione dell'RNA in cDNA.....	pag.60
4.10.3 Real Time PCR.....	pag.61
4.10.3.1 Primers utilizzati per le Real Time PCR....	pag.62

## RISULTATI

5.1 Attività locomotoria post-traumatica nei topi con lesione midollare.....	pag.65
5.2 Analisi morfometrica della lesione.....	pag.68
5.3 Destino delle PM-NPCs nel midollo leso.....	pag.70
5.4 Effetto neuroprotettivo delle PM-NPCs.....	pag.76
5.5 Proprietà anti-infiammatorie delle PM-NPCs.....	pag.87
5.6 Marcatura delle PM-NPCs con SPIOs.....	pag.100



5.7 Mantenimento delle caratteristiche fisiologiche delle PM-NPCs.....	pag.106
5.8 Analisi in vivo: MRI dopo iniezione intraspinale di PM-NPCs marcate con SPIOs.....	pag.108
5.9 Analisi in vivo: MRI dopo iniezione intravenosa di PM-NPCs marcate con SPIOs.....	pag.110
5.10 Analisi ex vivo: MRI e immunoistochimica dopo iniezione intravenosa di PM-NPCs marcate con SPIOs.....	pag.113

## **DISCUSSIONE**

6. Discussione.....	pag.117
---------------------	---------

## **CONCLUSIONI**

7. Conclusioni.....	pag.135
---------------------	---------

## **BIBLIOGRAFIA**

8. Bibliografia.....	pag.137
----------------------	---------

# **INTRODUZIONE**

# 1 La lesione spinale

La lesione spinale è un evento molto grave che si verifica quando nel midollo si interrompe parzialmente o totalmente la connessione funzionale tra i centri superiori del sistema nervoso centrale ed i nervi periferici: tale tipo di lesione porta differenti complicazioni e cambiamenti nella vita di una persona colpita da tale evento.

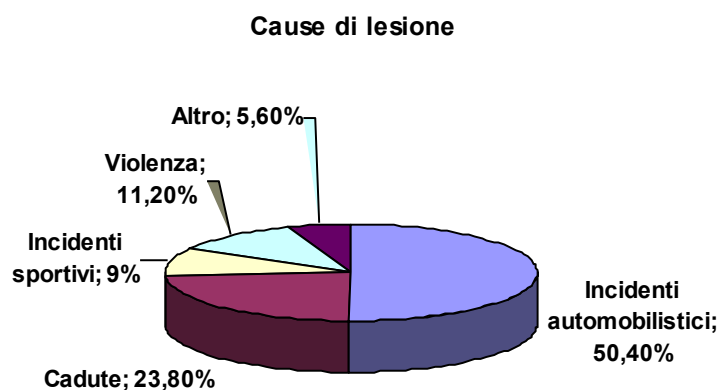
Una lesione midollare ha ripercussioni su tutto l'organismo poiché il trauma che si origina sul midollo spinale causa la mancanza di connessione tra le fibre nervose. La disconnessione tra i nervi che partono dal cervello ed arrivano al midollo spinale causa la paralisi, la perdita di controllo dei visceri, la perdita delle funzionalità dell'apparato riproduttivo, ecc. Invece la sconnessione delle fibre nervose che dal corpo vanno fino al cervello tramite il midollo spinale, causa la perdita della sensibilità e il manifestarsi di allodinia a causa della rigenerazione non fisiologica di fibre sensoriali.

## 1.1 Epidemiologia della lesione spinale

L'incidenza annuale di casi di lesione spinale varia da 15 a 40 casi per milione di persone in tutto il mondo, con gli Stati Uniti al vertice della classifica (Jackson et al, 2004). Tra il 1973 e il 1979 l'età media dei lesionati era tra i 16 e i 30 anni, adesso l'età media è aumentata fino a 37,6 nelle ultime 3 decadi (Ho et al, 2007). E' stato stimato che il costo vitalizio medio delle cure mediche necessarie a un paziente che soffre di tetraplegia cervicale è di 3 US \$ (Priebe et al, 2007).

A parte nei casi di lesione spinale dovuti a violenza, in tutti gli altri casi (incidenti automobilistici, cadute, incidenti sportivi) si è riscontrato questo aumento dell'età media (DeVivo et al, 2002). La percentuale di lesioni al midollo spinale negli adulti di oltre 65 anni è aumentata dal 4,7 % nel 1979 al 10,9 % nel 2000; mentre per quanto riguarda i giovani tra gli 0 a 15 anni la percentuale è diminuita dal 6,4 % al 2,0 % nello stesso periodo, sottolineando l'aumento dell'età media nei lesionati al midollo spinale.

La causa più comune di lesione la midollo spinale è ancora nel 2003 l'incidente automobilistico con il 50,4 %, comunque la percentuale dovuta alle cadute è aumentata progressivamente passando dal 16,5 % nel 1970 al 23,8 % tra il 2000 e il 2003 sebbene esse siano invece la maggior causa di lesione spinale nella popolazione oltre i 60 anni. Gli incidenti sportivi sono causa di lesione spinale nel 9% dei casi mentre la percentuale dovuta a casi di violenza è dell'11,2 % (Ho et al, 2007). Le vittime più giovani sono in grado di assorbire più facilmente l'impatto grazie all'elasticità dei legamenti vertebrali e ad una muscolatura spinale sottosviluppata, che favoriscono l'eccessiva flessione-estensione del midollo (Sekhon and Fehlings, 2001).



**Fig. 1 Diagramma che riporta le principali cause di lesione al midollo spinale e le relative percentuali**

Le lesioni a livello cervicale sono più comuni di quelle a livello toracico e lombare con il 56,6 % probabilmente perché la zona cervicale è più mobile rispetto alle altre zone (Ho et al, 2007; Sekhon and Fehlings, 2001). Per quanto riguarda i tipi di lesione i dati indicano che la tetraplegia incompleta rappresenta l'evento più comune con il 34,5 % di percentuale, seguito da paraplegia completa 23,1 %, tetraplegia completa 18,4 % e infine paraplegia incompleta 17,5 %.

In Italia, l'incidenza di lesioni al midollo spinale è di 18-20 casi per milione di abitanti, uno studio di Pagliacci e colleghi del 2003 ha riscontrato che il rapporto tra uomini e donne che incorrono in una lesione al midollo spinale è di 4:1 e che l'età media a cui si verifica la lesione è 38,5 anni.

Per quanto riguarda le cause principali responsabili del danno, al primo posto ci sono sempre gli incidenti stradali (53,8%), seguiti da caduta (22,6%), incidenti sportivi (7,9%), tentativi di suicidio (4,3%) e ferite da arma da fuoco (1,9%); mentre le categorie neurologiche riscontrate sono suddivise in: paraplegia completa (31,7%), paraplegia incompleta (24,9%), tetraplegia completa (19%), tetraplegia incompleta (20,9%).

## **1.2 Fisiopatologia della lesione spinale**

I danni che conseguono ad una lesione midollare di natura traumatica si sviluppano genericamente in 2 fasi: la lesione primaria conseguente a un danno di tipo meccanico o vascolare che è la diretta conseguenza dell'insulto traumatico che si identifica con il quadro clinico dello shock spinale; e la lesione secondaria in cui il danno si sviluppa progressivamente dopo l'evento traumatico e in cui si instaurano fenomeni sistemici, locali, cellulari e biochimici che nell'insieme determinano complesse alterazioni biochimiche e patologiche che esitano in un'ulteriore compromissione funzionale ed alterazione strutturale del midollo spinale.

### **1.2.1 La lesione spinale primaria**

La gravità del danno subito dal midollo spinale in seguito a lesione si può attribuire ad un anomalo movimento dello stesso midollo imposto dal trauma meccanico e dalla resistenza che la colonna vertebrale pone a questo movimento.

Indipendentemente dal modo in cui il trauma avviene, ci sono 4 meccanismi caratteristici di danno primario: i) impatto più compressione persistente del midollo (è la modalità più comune); ii) impatto senza successiva compressione midollare; iii) distrazione e iv) lacerazione/transezione. (Dumont et al, 2001). Esistono inoltre due teorie che spiegano come avviene il danno a livello del midollo spinale; quella reologica e quella meccanica (Jeager and Blight, 1997). La teoria reologica sostiene che la parte di midollo spinale più vicina al canale ependimale degeneri precocemente poiché in seguito ad una lesione accade che la dura madre venga

compressa obbligando quindi il midollo sottostante a rompersi con i monconi che si spostano in direzione opposta uno caudalmente e l'altro rostralmente. Questo porta ad una differente velocità di movimento da parte del midollo spinale che sarà minore vicino alla superficie e maggiore presso la zona ependimale e quindi a un relativo danno maggiore alle fibre nervose presenti in questa zona.

La teoria meccanica sostiene invece che le fibre nervose di diametro maggiore siano più sensibili al danno spinale rispetto a quello di diametro minore; questo si spiega poiché nei grandi assoni mielinizzati i punti corrispondenti ai nodi di Ranvier non sono ricoperti di guaina mielinica risultando molto più rigidi e meno deformabili e quindi più soggetti alla forza dell'impatto traumatico.

La lesione primaria raramente taglia o distrugge completamente la continuità del midollo spinale, è molto comune che alcuni assoni attraversino la lesione, spesso passando attraverso una striscia marginale di tessuto neurale in zona sub-piale che contiene assoni a lunga decorrenza sopravvissuti al danno ma demielinizzati o in via di demielinizzazione (Nashimi et al, 2001; McDonald et al, 2006).

### **1.2.2 Lesione spinale secondaria:**

E' un evento che segue la lesione primaria che innesca numerosi processi fisiopatologici e che può durare anche per diversi giorni. Durante questo periodo di tempo si susseguono diversi eventi molecolari a cascata che alterano notevolmente la normale fisiologia neuronale fino a portarne la morte per apoptosi. A questo livello si ha un'ulteriore perdita di neuroni che non erano morti in seguito all'impatto ma sono andati in apoptosi in seguito ai processi secondari sviluppatisi. Gli agenti che giocano un ruolo importante nella lesione secondaria sono molti e tra questi troviamo: shock neurogeno, danni vascolari, ischemia/riperfusione, alterazione della concentrazione di ioni, danno mitocondriale e molti altri. Questi eventi del danno secondario possono essere suddivisi temporalmente in diverse fasi che si susseguono: immediata; acuta; intermedia e cronica (Rowland et al, 2008).

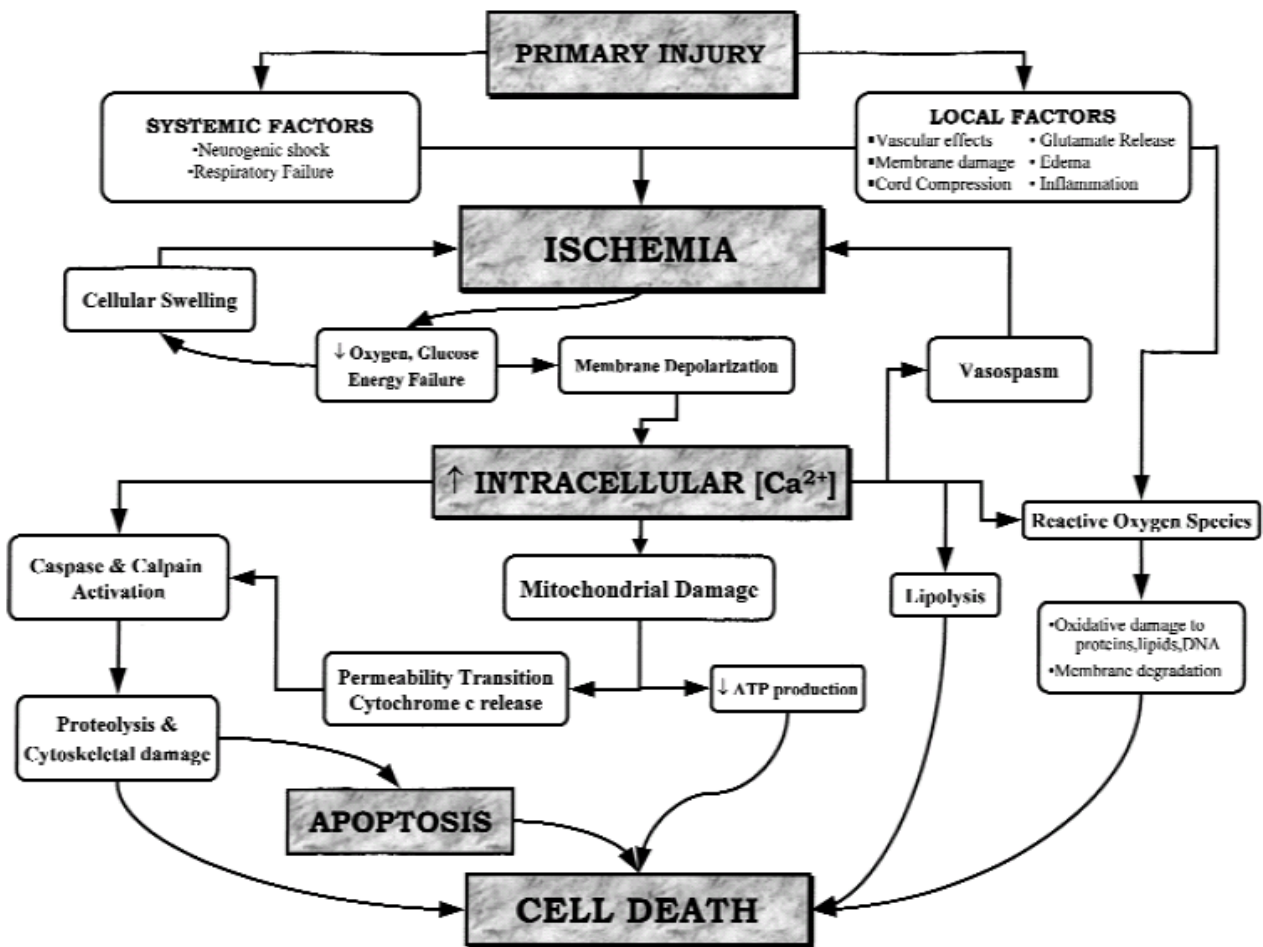


Fig. 2 Schema dei principali meccanismi responsabili del danno secondario dopo trauma spinale. Da *Acute Spinal Cord Injury, Part I: Pathophysiologic Mechanisms*

### 1.2.2.1 Fase immediata

La fase immediata incomincia nel momento del danno e per dura all'incirca 2 ore. Questa fase è dominata sostanzialmente dalla conseguenza diretta dello stesso evento lesivo: la rottura degli assoni in seguito al trauma; la morte immediata dei neuroni e della glia coinvolti direttamente nel trauma meccanico e il fenomeno dello shock spinale (Ditunno et al, 2004) che si accompagna alla lesione. La conseguenza di questi eventi porta all'immediata perdita della funzione neurologica a partire dal sito di lesione e anche al di sotto di esso.

Il primo cambiamento patologico riscontrabile in seguito alla lesione, è solitamente il rigonfiamento del midollo spinale, spesso accompagnato da un'emorragia nella

zona centrale della sostanza grigia, nella quale le cellule vanno repentinamente in contro a morte necrotica a causa della distruzione meccanica diretta delle membrane cellulari o a causa del danno ischemico conseguente alla rottura dei vasi (Kakulas 2004; Tator and Koyanagi, 1997). L'emorragia e il rigonfiamento concorrono a creare un ambiente ischemico che può estendersi per molti segmenti spinali sia rostralmente che caudalmente al sito di lesione.

Sebbene profondi cambiamenti istopatologici possano essere non ancora apprezzabili in maniera consistente nella fase immediata, alcuni processi dannosi per il tessuto midollare sono già iniziati, ad esempio: l'attivazione della microglia inizia quasi istantaneamente dopo il trauma (Donnelly and Popovich, 2008), e anche l'upregolazione delle citochine infiammatorie come TNF $\alpha$  e IL- $\beta$  è rilevabile nel giro di alcuni minuti (Pineau et al, 2007). I valori di glutammato extracellulare possono raggiungere livelli eccitotossici entro pochi minuti dal danno (Wrathall JR et al, 1996).

### **1.2.2.2 Fase acuta**

E' il periodo in cui il danno secondario diventa dominante, è anche la fase in cui hanno i maggiori effetti gli interventi che mirano alla neuroprotezione del tessuto midollare. La fase acuta è suddivisa a sua volta in: *fase acuta precoce* e *fase subacuta*.

#### Fase acuta precoce

La fase acuta precoce nella SCI comincia 2 ore dopo la lesione e dura fino a 48 ore dal danno. Questa fase è caratterizzata da un'emorragia continuativa, da un aumento dell'edema tissutale e da infiammazione, inoltre, in questa fase iniziano alcuni processi addizionali coinvolti nel danno secondario come produzione di radicali liberi dell'ossigeno; la disregolazione ionica; l'eccitotossicità mediata dal glutammato e la neurotossicità immuno-mediata che contribuiscono ad un ulteriore danno assonale e morte cellulare.

Il danno vascolare, l'emorragia e la conseguente ischemia sono componenti centrali di questa cascata di danno secondario (Tator et al, 1991; Tator et al, 1997).



La distruzione del microcircolo, la perdita dei normali meccanismi di autoregolazione, l'ipotensione globale e l'aumento della pressione interstiziale sottolineano il prolungato stato di ipoperfusione che si ha in seguito a SCI. (Tator et al, 1991; Tator et al, 1997; Kwon et al 2004). L'ischemia porta a un rigonfiamento cellulare citotossico che colpisce sia i neuroni che la glia; anche il rigonfiamento assonale è comune in questa patologia e porta al blocco del potenziale d'azione (Kakulas, 2004).

Disregolazione ionica: la perdita dell'omeostasi ionica immediatamente dopo la lesione è una caratteristica comune nella morte cellulare in seguito a SCI sia per quanto riguarda la necrosi che per quanto riguarda l'apoptosi. In particolare la disregolazione nella concentrazione di calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) è un elemento molto comune nella morte cellulare (Schanne et al, 1979). la quale innesca una serie di processi dannosi che includono l'attivazione delle calpaine, la disfunzione mitocondriale; e la produzione di radicali liberi dell'ossigeno che culminano quindi con la morte delle cellule.

A brevissimo tempo dalla lesione il  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulare penetra nelle cellule a causa dell'aumento della permeabilità di membrana e la sua concentrazione a livello extracellulare può diminuire fino a 100 volte rispetto al valore fisiologico. L'aumento della concentrazione del  $\text{Ca}^{2+}$  all'interno delle cellule è mediato anche dal funzionamento inverso dello scambiatore  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  che fisiologicamente utilizza la differenza di concentrazione di  $\text{Na}^+$  tra ambiente intra ed extracellulare per portare il  $\text{Ca}^{2+}$  fuori dalla cellula; ma che in caso di perdita di permeabilità della membrana o aumento dell' $\text{Na}^+$  intracellulare inverte la sua funzione trasportando all'interno della cellula il  $\text{Ca}^{2+}$  e all'esterno il  $\text{Na}^+$  (Blaustein et al, 1991; Stys et al, 1991). Le conseguenze di questo grande influsso di  $\text{Ca}^{2+}$  determinano infine necrosi a livello della sostanza grigia a breve tempo dalla lesione mentre la sostanza bianca risulta essere ancora preservata. Questo perché i nuclei della sostanza grigia sono più sensibili alle alte concentrazioni di  $\text{Ca}^{2+}$  poiché essi presentano una maggior concentrazione di gruppi fosfato che portano alla formazione e alla precipitazione di cristalli d'idrossiapatite dannosi per le cellule. L'aumento della concentrazione cellulare di  $\text{Ca}^{2+}$  è inoltre responsabile dell'attivazione proteasi e lipasi calcio-dipendenti come la calpaina, la fosfolipasi A2, la lipossigenasi, la ciclossigenasi e le

mielinasi; della disfunzione mitocondriale e della produzione di radicali liberi dell'ossigeno che culminano quindi con la morte delle cellule.

Eccitotossicità: è il risultato dell'eccessiva attivazione dei recettori del glutammato che portano ad un eccessivo afflusso intracellulare di  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$  attraverso i recettori N-methyl-D-aspartate (NMDA) e  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate-kainate (AMPA-kainate). Si pensa che questo meccanismo giochi un ruolo nella morte sia dei neuroni che della glia in seguito a diverse forme di trauma del tessuto neurale, inclusa la lesione al midollo spinale (Park et al, 2004). In seguito ad una lesione, i livelli di glutammato extracellulari aumentano rapidamente a causa del danno diretto subito dalle cellule e dalla perdita della funzionalità dei trasportatori energia-dipendenti, in particolare il trasportatore di membrana  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasi che normalmente regola le concentrazioni extracellulari di ioni, glutammato e altre molecole (Lipton et al, 1994). Il blocco della pompa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasi contribuisce ad aumentare la concentrazione di  $\text{Na}^+$  all'interno della cellula che a sua volta richiama acqua portando ad un rigonfiamento della cellula e la perdita di  $\text{K}^+$ . Il legame del glutammato al recettore NMDA porta ad un massiccio ingresso di  $\text{Ca}^{2+}$  nella cellula contribuendo ulteriormente all'attivazione di proteasi, lipasi e mielinasi e interferisce anche con i processi mitocondriali (McAdoo et al, 2005). Inoltre, la neurotossicità del glutammato è legata alla formazione di radicali liberi dell'ossigeno.

Danno mediato dai radicali liberi dell'ossigeno: I radicali liberi dell'ossigeno sono composti altamente reattivi che originano dalla riduzione incompleta di questo elemento, essi sono solitamente eliminati dagli antiossidanti come: la vitamina E, l'acido ascorbico e il glutathione e sono trasformati in molecole non dannose da alcuni enzimi tra cui: la superossido dismutasi (SOD), la glutathione perossidasi e la catalasi di cui il sistema nervoso è molto ricco (Hall et al, 1993).

Il danno mediato dai radicali liberi dà un importante contributo al mantenimento e all'accrescimento del danno secondario dopo il trauma, attraverso la perossidazione lipidica mediata dai radicali liberi che contribuisce alla distruzione assonale e alla morte di neuroni e glia. La perossidazione lipidica è un processo che si auto-mantiene, in cui le reazioni biochimiche innescate dai radicali liberi danneggiano le membrane portando alla lisi cellulare; alla disfunzione degli

organelli e contribuiscono all'alterazione dell'omeostasi del calcio. La rilevazione del picco delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) avviene circa 12 ore dopo il danno e i valori rimangono a questi livelli elevati per circa una settimana, dopodichè, in 4-5 settimane ritornano a livelli basali (Donnelly and Popovich, 2008; Xiong et al, 2007). La produzione di ROS è associata sia all'ischemia che si instaura immediatamente dopo il danno, sia in seguito alla riperfusione (Sakamoto et al, 1991). Una grande varietà di ROS contribuisce al danno da radicali liberi, come ad esempio il perossido di idrogeno, e il radicale ossidrile; recentemente inoltre, è stato dimostrato che un fattore chiave del danno mediato dai ROS è il radicale perossinitrito generato dalla reazione tra l'ossido nitrico e il radicale superossido (Xiong et al, 2007). Il perossinitrito è stato associato direttamente con l'induzione all'apoptosi nei neuroni di ratti in seguito a SCI (Bao et al, 2003).

Permeabilità della barriera emato-ecnefalica o *blood brain barrier* (BBB): Nel sistema nervoso non danneggiato, la BBB funziona come un filtro ad elevata selettività che limita il trasporto delle molecole sia in entrata che in uscita dal sistema nervoso. In seguito a SCI si ha un enorme aumento della permeabilità della BBB dovuto sia alla distruzione meccanica conseguente al danno primario sia agli effetti che hanno sulle cellule endoteliali i numerosi mediatori infiammatori e gli altri componenti che vengono up-regolati in seguito alla SCI.

In seguito a SCI contusiva nel ratto, è stato dimostrato che il picco di permeabilità vascolare delle BBB si trova a 24h dalle lesione e che la permeabilità ritorni poi a valori fisiologici nel giro di due settimane (Noble et al, 1989). Le tempistiche dell'alterazione delle BBB dell'uomo in dopo lesione al midollo spinale non sono ancora state definite in maniera precisa, sebbene si pensi che siano molto simili a quelle riscontrate nel ratto. Sebbene, l'iniziale aumento della permeabilità è principalmente dovuto alla distruzione meccanica delle cellule endoteliali e dei processi astrocitari che formano la BBB (è quasi un fenomeno immediato in seguito alla lesione), è risaputo che anche un elevato numero di mediatori infiammatori implicati nella cascata del danno secondario hanno un importante effetto sulla permeabilità vascolare. Due citochine infiammatorie (TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) sono up-regolate in seguito a SCI (Pineau et al, 2007) ed è noto il loro effetto di incrementare la permeabilità vascolare (Schnell et al, 1999). Anche altre molecole

rilasciate dalle cellule gliali o dalle cellule infiammatorie infiltranti il sito di lesione si crede che abbiano un ruolo nell'aumento della permeabilità vascolare della BBB; tra queste molecole ci sono: i ROS; l'ossido nitrico (ON); l'istamina; le metallo-proteasi della matrice e l'elastasi (Donnelly and Popovich, 2008). Il passaggio di soluti che richiamano conseguentemente acqua all'interno della BBB portano alla formazione di edema a livello del sito di lesione che può accumularsi a livello del canale ependimale o a livello della sostanza bianca tra la dura e la pia madre. La conseguenza è che il tessuto nervoso risulta essere compresso e soggetto quindi ad un ulteriore danno meccanico.

Mediatori dell'infiammazione e cellule del sistema immunitario: La fase acuta precoce include l'infiltrazione delle cellule infiammatorie e l'attivazione delle cellule microgliali residenti. Il processo infiammatorio conseguente alla SCI è molto complesso e coinvolge numerose popolazioni cellulari come: astrociti; microglia; linfociti T; neutrofili e monociti circolanti. Anche un certo numero di mediatori non cellulari come il TNF $\alpha$ ; gli interferoni e le interleuchine giocano un ruolo molto importante in questa fase (Donnelly and Popovich, 2008; Fleming et al, 2006; Popovich et al, 1997). Il campo che prevede lo studio della neuroinfiammazione che segue la SCI è cresciuto enormemente negli ultimi anni rivelando quanto essa sia un processo estremamente complesso, con alcuni aspetti della risposta infiammatoria che contribuiscono in maniera deleteria al danno secondario e altri che invece contribuiscono in maniera positiva; rimuovendo ad esempio i detriti cellulari o promuovendo l'instaurarsi di un microambiente favorevole alla rigenerazione (Fleming et al, 2006). La doppia natura della risposta immunitaria che segue il danno midollare è ben dimostrata se si guarda ai multipli ruoli che ha il TNF $\alpha$  dopo un danno al CNS. Il TNF $\alpha$  è una molecola infiammatoria chiave che è fortemente up-regolata nei neuroni; nella glia e nelle cellule endoteliali in seguito a SCI (Yan et al, 2001). L'inibizione del *signaling* di TNF $\alpha$  attraverso l'utilizzo di anticorpi neutralizzanti ha dimostrato incrementare il recupero della funzionalità neurologica in seguito a SCI (Bethea et al, 1999). Allo stesso tempo, il *signaling* di TNF $\alpha$  è stato dimostrato avere anche effetti neuroprotettivi sia *in vitro* (Cheng et al, 1994) che *in vivo* in seguito a SCI (Kim et al, 2001).

Morte cellulare e demielinizzazione: La morte cellulare in seguito a SCI avviene sia per necrosi che per apoptosi. Durante la necrosi, si ha un rigonfiamento della cellula, la distruzione degli organelli, la lisi della membrana e quindi la fuoriuscita del contenuto intracellulare che provoca una risposta infiammatoria. L'apoptosi, invece, è un processo di morte cellulare programmata in cui si ha la riduzione di volume della cellula con frammentazione del DNA e degli organelli in corpi apoptotici che vengono riconosciuti e fagocitati dai macrofagi senza che si scateni una risposta infiammatoria. In particolare, la morte dei neuroni avviene in tutte le fasi della SCI quasi sempre attraverso la necrosi (Beattie et al, 2002b), anche se ci sono delle evidenze che indicano che l'apoptosi giochi un ruolo importante nella morte neuronale in seguito a SCI nell'essere umano (Emerey et al, 1998; Keane et al, 2001), sebbene sia stata riscontrata anche nella SCI animale (Lou et al, 1998; Yong et al, 1998). In contrasto con questo invece, gli oligodendrociti, che come i neuroni sono molto sensibili al danno ischemico, vanno rapidamente incontro a morte per apoptosi in seguito a SCI (Crowe et al, 1997). Questo processo è almeno in parte dipendente dall'attivazione del recettore di Fas presente sugli oligodendrociti da parte della microglia attivata che invece esprime il ligando di Fas (Casha et al, 2001; Casha et al, 2005) ed è regolato dal recettore della neurotropina p75 (Beattie et al, 2002a; Chu et al, 2007).

Poiché la morte per apoptosi è un processo attivo, dato che richiede energia e la sintesi di proteine *de novo*, essa rappresenta un possibile bersaglio per l'intervento terapeutico attraverso l'inibizione selettiva (Park et al, 2004).

La maggior parte delle cellule apoptotiche si riscontra al bordo del tessuto sopravvissuto che circonda il centro della lesione, la morte delle cellule in questa regione fornisce una possibile spiegazione per la progressiva espansione dell'area di lesione (Lu et al, 2000).

Gli oligodendrociti sono inoltre suscettibili alla morte citotossica in seguito al danno a causa dell'espressione sulla loro superficie cellulare dei recettori NMDA (Stys et al, 2007). La perdita degli oligodendrociti porta alla demielinizzazione assonale, che raggiunge il suo apice 24 ore dopo la lesione (Totou et al, 2005).

Demielinizzazione persistente e altre forme di danno assonale come la distruzione meccanica; la perossidazione lipidica e il rigonfiamento ischemico, sono associate

con l'atrofia e quindi la probabile morte dei rispettivi corpi cellulari (Norenberg et al, 2004; Quencer et al, 1996; Tetzlaff et al, 1994). Studi animali hanno dimostrato che in seguito a SCI contusiva sono presenti assoni demielinizzati sopravvissuti, e che essi possono rappresentare un importante bersaglio terapeutico per il trattamento di questa patologia (Totoiu et al, 2004).

### Fase subacuta

La fase subacuta si ritiene che duri da circa 2 giorni dopo la lesione fino a 2 settimane; questo è il periodo nel quale la terapia cellulare quando viene utilizzata da gli effetti migliori. La risposta fagocitica è massima durante la fase subacuta e ha l'importante funzione di rimuovere i detriti cellulari dall'area di lesione, inoltre, essa può contribuire a promuovere la ricrescita assonale attraverso la rimozione delle molecole inibitorie della crescita presenti sui detriti mielinici (Donnelly and Popovich, 2008). In seguito a SCI, gli astrociti nel centro della lesione sono soggetti ad edema citotossico e vanno incontro a morte per necrosi cellulare tra le prime ore e pochi giorni dal danno. Nella fase subacuta inizia anche una risposta astrocitaria ritardata, nella quale gli astrociti alla periferia della zona di lesione diventano ipertrofici e cominciano a proliferare; questa attivazione delle cellule gliali è correlata ad un aumento dell'espressione della proteina dei filamenti intermedi astrocitari, chiamata *glial fibrillary acidic protein* (GFAP). Da questi astrociti reattivi, partono molti processi citoplasmatici di grosse dimensioni che si interconnettono tra di loro a formare la cicatrice gliale. Questa cicatrice rappresenta una barriera sia chimica che fisica alla rigenerazione assonale (Rowland et al, 2008). Nonostante la formazione della cicatrice, gli astrociti hanno anche una funzione positiva in seguito a SCI, essi infatti promuovono il ristabilimento dell'omeostasi ionica e dell'integrità della BBB, che è molto importante il riassorbimento dell'edema e per limitare l'infiltrazione delle cellule immunitarie (Herrmann et al, 2008).

### **1.2.2.3 Fase intermedia**

La fase intermedia è caratterizzata dall'avanzamento nella formazione della cicatrice gliale e dai tentativi di rigenerazione assonale mediante ricrescita e ramificazione delle fibre sopravvissute (Hill et al, 2001). In modelli murini di lesione spinale contusiva, gli assoni del tratto cortico-spinale mostrano segni di ricrescita da 3 settimane a 3 mesi dopo la lesione, mentre gli assoni del tratto rubro-spinale è stato osservato che iniziano a ricrescere dai 3 agli 8 mesi dopo il danno (Hill et al, 2001). Sebbene questi tentativi di rigenerazione siano chiaramente insufficienti per portare ad un recupero funzionale significativo dopo una lesione di grado severo; è senza dubbio incoraggiante sapere che ci sia del potenziale rigenerativo anche nel midollo spinale adulto.

### **1.2.2.4 Fase cronica**

La fase cronica inizia 6 mesi circa dopo la lesione e continua per tutta la vita del paziente con la SCI. Questa fase è caratterizzata dalla maturazione/stabilizzazione della lesione in cui continua la formazione della cicatrice gliale e si ha lo sviluppo di cisti e/o fistole. In questa fase è in corso anche il processo della degenerazione Walleriana che subiscono gli assoni danneggiati o tagliati; essa è un processo che descrive i cambiamenti che subisce la parte terminale di un assone dopo la separazione a causa di un trauma dal suo soma neuronale. Nella lesione spinale si accompagna alla morte degli oligodendrociti per apoptosi che porta ad una conseguente demielinizzazione neuronale. Nei primi minuti successivi alla sezione, distalmente al piano in cui si è verificata e fino a una distanza di 5 mm da esso, si ha la retrazione della mielina dai nodi di Ranvier e la dilatazione delle incisure di Schmidt-Lanterman. Nelle ore successive le lesioni si estendono gradatamente interessando le cellule di Schwann. Dopo circa un'ora dalla lesione la matrice citoplasmatica della cellula di Schwann si trasforma in spirali e globi. A circa 12 ore dalla sezione, gli assoni distali cominciano a mostrare segni di degenerazione con un accumulo di mitocondri in prossimità dei nodi. Cominciano a gonfiarsi anche le

fibre amieliniche che vanno incontro al cosiddetto fenomeno della "imperlinatura". A 24 ore dalla sezione, la degenerazione dell'assone distale diventa evidente, con frammentazione dei neurofilamenti, dei neurotubuli e del reticolo endoplasmatico. La degenerazione delle fibre amieliniche dopo 24 ore è estesa a tutta la fibra nervosa. In quelle mieliniche, la mielina si scinde nella linea intraperiodica e la cellula di Schwann inizia il processo di espansione per coprire i nodi di Ranvier: aumenta la sintesi proteica e i nuclei iniziano a dividersi con frequenza maggiore anche nelle settimane successive, fenomeno visibile soprattutto nei nervi composti da grandi fibre mielinizzate. A circa 48 ore, la degenerazione delle guaine mieliniche distali alla sezione sono notevoli, le lamelle mieliniche si allentano e la fibra si gonfia. Dopo 3 giorni nel citoplasma della cellula di Schwann si osserva la distruzione estensiva della mielina che assume la forma di grandi ovoidi; i detriti mielinici sono asportati da macrofagi provenienti dai vicini vasi sanguigni. Dopo 15 giorni dalla sezione, l'asportazione delle guaine mieliniche da parte dei macrofagi è ormai conclusa, sebbene anche dopo tre mesi dalla sezione del nervo sia possibile osservare macrofagi schiumosi contenenti frammenti mielinici (Warden et al, 2001; Bierowski et al, 2005). Possono essere necessari degli anni prima che i residui assonali e dei corpi cellulari vengano completamente rimossi (Beattie et al, 2002b; Coleman et al, 2002; Ehlers, 2004). Nonostante possano esserci ancora alcuni miglioramenti della funzionalità neurologica anche dopo alcuni anni dalla lesione, (McDonald et al, 2002), si può ritenere che dopo 1-2 anni dal trauma, il deficit neurologico si sia ormai stabilizzato e la lesione si può considerare completamente maturata. La lesione a questo punto è fisicamente caratterizzata da una cavità cistica e da mielomalacia (un rammollimento del midollo spinale); che rappresentano la fase finale della morte necrotica dopo SCI.

La lesione, sfortunatamente, non sempre rimane una condizione statica, e la formazione di fistole che avviene in circa il 30% dei pazienti soggetti a SCI può causare delle disfunzioni neurologiche ritardate (ad esempio paralisi ascendente o sintomi cerebrali) e dolore neuropatico (Stoodley, 2000).



Phases and Key Events	Time After SCI				
	≤2 Hours	≤ 48 Hours	≤14 Days	≤ 6 Months	≥ 6 Months
injury phase	primary immediate	early acute	secondary subacute	intermediate	chronic/late
key processes and events	primary mechanical injury traumatic severing of axons grey matter hemorrhage hemorrhagic necrosis microglial activation released factors: IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6, & others	vasogenic & cytotoxic edema ROS production: lipid peroxidation glutamate-mediated excitotoxicity continued hemorrhage & necrosis neutrophil invasion peak BBB permeability early demyelination (oligodendrocyte death) neuronal death axonal swelling systemic events (systemic shock, spinal shock, hypotension, hypoxia)	macrophage infiltration initiation of astroglial scar (reactive astrogliosis) BBB repair & resolution of edema	continued formation of glial scar cyst formation lesion stabilization	prolonged Wallerian degeneration persistence of spared, demyelinated axons potential structural & functional plasticity of spared spinal cord tissue
therapeutic aims	neuroprotection	neuroprotection immune modulation cell-based remyelination approaches glial scar degradation		glial scar degradation	rehabilitation neuroprostheses

**Tab. 1: Fasi della lesione spinale ed eventi patologici chiave. Da *Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon*, Rowland et al, 2008**

## **1.3 Terapia nella lesione spinale**

Sebbene negli ultimi anni i progressi fatti nel campo della lesione spinale abbiano migliorato notevolmente le condizioni e le aspettative di vita dei pazienti, a tutt'oggi non esistono soluzioni che consentano la guarigione da una lesione midollare. La ricerca ha tuttavia raggiunto negli ultimi anni risultati incoraggianti per quanto riguarda la modulazione del processo infiammatorio senza però riuscire a indurre la rigenerazione dei neuroni persi a seguito del trauma.

### **1.3.1 Terapia cellulare**

Uno dei più recenti (temporalmente parlando) approcci terapeutici utilizzati nel trattamento della lesione spinale è il trapianto cellulare, dove il campo più promettente è sicuramente quello che utilizza le cellule staminali. Il trapianto cellulare dopo SCI ha diversi scopi: preservare la maggior quantità possibile di tessuto neurale nell'area di lesione, creare un ambiente favorevole per la ricrescita assonale e sostituire il tessuto danneggiato con nuovo tessuto funzionale attraverso il differenziamento delle cellule trapiantate.

Nelle ultime 2 decadi il trapianto cellulare come terapia per la SCI ha acquisito sempre più importanza ed è stato il soggetto di molti studi pre-clinici. Numerosi tipi cellulari sono stati utilizzati negli studi che si sono occupati di lesione spinale in virtù delle loro differenti caratteristiche e proprietà; come: la capacità di produrre mielina, la capacità di promuovere e guidare la crescita assonale in modo tale da bypassare la lesione o l'abilità di differenziamento in cellule neurali. Non bisogna inoltre dimenticare che molti tipi cellulari sono in grado di secernere fattori trofici che possono avere un effetto neuroprotettivo e/o possono promuovere la plasticità del tessuto sopravvissuto al danno nel midollo spinale. Quindi, i benefici dovuti alla terapia cellulare possono essere multifattoriali ed è spesso difficile attribuire l'effetto terapeutico ad un singolo meccanismo (Tetzlaff et al, 2011). I tipi cellulari più studiati per il trattamento della lesione spinale sono: i) cellule di Schwann; ii) olfactory ensheathing glial cells; iii) neural stem/progenitor cells (adulte e embrionali); iv) cellule staminali mesenchimali.

Cellule di Schwann: Sono le cellule che formano la mielina nel sistema nervoso periferico (PNS), ed è stato dimostrato che non solo sono in grado di ri-mielinizzare gli assoni dopo essere state trapiantate in seguito a lesione midollare, ma che creano anche un substrato permissivo per la crescita degli assoni rigeneranti. Queste cellule hanno il vantaggio di essere molto studiate e hanno dimostrato avere un provato effetto terapeutico nel trattamento della SCI (Duncan and Milward, 1995), possono essere prelevate direttamente dal paziente e quindi è possibile effettuare trapianti autolghi, inoltre, si sono dimostrate efficaci anche quando utilizzate in fase cronica della lesione. Queste cellule hanno però lo svantaggio di provocare una reazione astrocitaria molto più marcata rispetto ad altri tipi cellulari utilizzati e inoltre, nella maggior parte dei casi da sole non hanno effetto ma necessitano di un co-trattamento adiuvante per incrementarne l'efficacia (ad es. matrigel; cAMP, fattori neurotrofici) (Tetzlaff et al, 2011).

Olfactory ensheathing glial cells (OECs): le OECs sono localizzate nello strato delle fibre nervose del bulbo olfattorio o nella mucosa olfattoria nasale; queste cellule hanno suscitato un numero sempre maggiore di attenzioni per merito della loro capacità di facilitare la continua rigenerazione degli assoni olfattori dalla mucosa olfattoria nasale posta nel PNS al bulbo olfattorio situato nel CNS (Doucette, 1991). Le OECs derivanti dal bulbo olfattorio di roditori adulti sono le più studiate rispetto a quelle derivanti dalla lamina propria della mucosa olfattiva. I vantaggi nell'utilizzo di queste cellule sono: la loro buona integrazione all'interno del midollo spinale ospite, che è necessaria per ottenere la rigenerazione/ramificazione assonale che si riscontra utilizzando queste cellule; il miglioramento della locomozione che è riportato frequentemente in seguito a trattamento con OECs e la possibilità di eseguire trapianti autologhi. Per contro, l'utilizzo di queste cellule in modelli traumatici di entità più severa non sembra avere molta efficacia, e inoltre, anche in questo caso, per aumentare l'efficacia del trattamento è necessario utilizzare degli adiuvanti (cellule di Schwann, Matrigel, cAMP, fattori neurotrofici) (Tetzlaff et al, 2011).

Neural stem/progenitor cells: questo tipo di cellule staminali sono solitamente ottenuti dalla zona sottoventricolare (SVZ) del cervello o dal midollo spinale, e sono amplificate in colture come neurosfere all'interno delle quali sono presenti non solo

le NSCs/NPCs ma anche celle neurali a differenti gradi di maturazione (Gritti et al, 1996).

Quando trapiantate in seguito a SCI queste cellule sembrano riuscire a integrarsi bene nel midollo spinale ospite e numeri studi che valutano il recupero funzionale neurologico hanno mostrato un miglioramento del comportamento; questo miglioramento funzionale è stato riscontrato in modelli sperimentali differenti e utilizzando specie animali diverse. Le limitazioni nell'utilizzo di questi tipi cellulari (NSCs/NPCs) riguardano principalmente la loro tendenza a differenziare per la maggior parte in astrociti e solo in minima parte in oligodendrociti e soprattutto neuroni, inoltre, non sembrano particolarmente efficaci nel generare un substrato adeguato per la rigenerazione assonale in modo da poter creare un ponte di tessuto neurale tra i margini della lesione (Tetzlaff et al, 2011).

Bone-marrow-derived stromal cells (BMSCs) - Cellule staminali mesenchimali: le BMSCs sono sostanzialmente un insieme di cellule stromali che supportano la crescita delle cellule staminali ematopoietiche e delle cellule staminali mesenchimali. Queste cellule vengono usate molto di frequente nel trattamento delle SCI e di altre patologie di carattere ischemico (Parr et al, 2007b); esse hanno il vantaggio di poter essere raccolte molto facilmente e di poter essere utilizzate in trapianti autologhi (sia in modelli animali che negli esseri umani), hanno dimostrato di avere un'efficacia sul recupero motorio nei roditori e sono state utilizzate anche in modelli di SCI cronica. Le BMSCs sembrano inoltre avere la capacità di creare un substrato che permette l'invasione da parte delle cellule di Schwann endogene. Hanno però lo svantaggio di avere un'integrazione nel midollo lesionato estremamente limitata e una scarsa tendenza a differenziare in cellule neurali (Tetzlaff et al, 2011).

#### **1.4 Post Mortem Neural Precursor Cells (PM-NPCs)**

Poiché il microambiente che si viene a formare in seguito a lesione del midollo spinale è caratterizzato da un'importante area ischemica, le cellule utilizzate per la terapia della SCI una volta giunte in sede di lesione devono sopravvivere in un ambiente molto sfavorevole e con una perfusione molto scarsa, almeno nelle fasi più immediate del danno. Sarebbe quindi di grande utilità utilizzare per il trattamento della SCI un tipo di cellule staminale neurale che oltre ad avere i vantaggi e le potenzialità descritte nel precedente paragrafo, fosse anche in grado di sopravvivere nell'ambiente sfavorevole che è quello della lesione spinale (Molcanyi et al, 2007; Popovich et al, 2003).

Nel nostro laboratorio sono state isolate dalla SVZ di topi CD1 adulti, delle cellule staminali neurali in seguito a ischemia globale prolungata chiamate Post Mortem – Neural Precursor Cells (PM-NPCs) (Marfia et al, 2011) che hanno proprietà differenti dalle cellule staminali classiche e che possono rappresentare un utile strumento nella terapia della lesione spinale.

## 2 Imaging *in vivo*

Le osservazioni morfologiche hanno guidato il corso della biologia fin da quando è stato costruito il primo microscopio sul finire del XVI secolo.

Nonostante nel campo della ricerca biologica di base gli studi *in vitro* abbiano fornito, e continuano tuttora a fornire diverse informazioni fondamentali per definire le vie biochimiche e di espressione genica, tali approcci risultano meno utili nello studio dell'organismo in toto, in cui ogni processo è sottoposto a molteplici e complesse influenze (Livingston 1999).

I recenti progressi nel campo della biologia cellulare e molecolare hanno permesso di estendere direttamente in soggetti viventi, lo studio di molti processi finora valutati *in vitro* (Massoud et al, 2003). Ciò è stato reso possibile grazie allo sviluppo di numerose tecniche di imaging *in vivo*, le quali permettono di ottenere rappresentazioni visive del processo in esame, fornendo informazioni circa la morfologia e la localizzazione di organi e di tessuti (imaging morfologico) ma possono anche consentire di individuare, caratterizzare e quantificare i processi biologici a livello cellulare e molecolare coinvolti sia in condizioni fisiologiche che patologiche (imaging funzionale).

In generale, l'imaging condotto su animali vivi offre diversi vantaggi rispetto alle convenzionali tecniche che utilizzano colture cellulari. Con i modelli animali *in vivo*, infatti, è possibile valutare anche fenomeni complessi come la tolleranza, la complementazione, la ridondanza in pathway biologici e le interazioni tra essi (Massoud et al, 2003; Gassmann et al, 1998).

A seconda del processo indagato, è possibile distinguere tra imaging *in vivo* molecolare e cellulare; tali metodiche permettono di caratterizzare e quantificare in maniera non invasiva e ripetitiva rispettivamente macromolecole target e popolazioni cellulari, direttamente negli organismi viventi (Lucignani et al, 2006).

L'imaging molecolare *in vivo* permette di ottenere anche informazioni quantitative del fenomeno biologico che si sta osservando. Questi dati sono da considerarsi maggiormente significativi rispetto a quelli ottenuti nell'analisi *in vitro* perché il soggetto in esame viene mantenuto in una condizione fisiologica (eccezione a

questa regola riguarda il caso in cui l'anestesia dell'animale in esame porti ad un'alterazione delle normali funzioni biologiche che si stanno osservando). Gli studi in vivo infatti permettono di determinare la biodistribuzione spaziale e temporale di una sonda molecolare e i processi biologici correlati nell'ambito dell'intero organismo. Si può ottenere quindi una visualizzazione più realistica delle funzioni e delle interazioni di un particolare gene.

Un ulteriore vantaggio dell'analisi in vivo consiste nella possibilità di effettuare studi ripetuti sullo stesso modello animale e in tal modo produrre una visione dinamica dei progressivi cambiamenti dei parametri biologici d'interesse (Gassmann et al, 1998). L'utilizzo di queste metodologie permette di ottenere risultati di alta qualità e di ridurre il numero di animali necessari allo studio (in accordo con il principio delle 3R: Refine, Reduce, Replace), i tempi per l'acquisizione dei dati e i costi. Inoltre, la possibilità di effettuare studi longitudinali nel tempo sullo stesso animale facilita la traslazione dei protocolli di ricerca dalla preclinica all'ambito clinico umano.

I metodi di monitoraggio in vivo hanno acquisito una notevole importanza anche nel campo della ricerca farmaceutica: animali transgenici sono spesso utilizzati come modelli per l'identificazione di nuove proteine bersaglio dell'azione dei farmaci, per studi di tossicologia, per seguire l'evoluzione di una patologia o l'efficacia di una terapia. L'utilizzo dell'imaging molecolare nella "Drug discovery" offre la possibilità di verificare direttamente in vivo la farmacocinetica e la farmacodinamica del composto che si vuole testare in modo molto semplice e diminuendo i tempi degli studi preclinici (Martelli et al, 2009).

In tutte le metodiche di imaging in vivo è necessario che le cellule o i processi molecolari oggetto di studio, per poter essere visualizzati, generino un segnale differente e riconoscibile rispetto a quello proveniente dai tessuti che li circondano. Per questo motivo, sono state sviluppate diverse strategie di marcatura in modo da riuscire a marcare con una sonda specifica il componente cellulare o il fenomeno che si vuole visualizzare. Le tecniche di imaging molecolare di solito sfruttano sonde molecolari specifiche per la visualizzazione di processi molecolari altrettanto specifici. L'interazione tra la sonda e la molecola target da analizzare, misurata mediante tecniche di imaging in vivo, permette di ottenere informazioni sulla localizzazione e sulla quantificazione dell'espressione della molecola target nel

tempo. Le conoscenze sempre crescenti circa nuovi bersagli molecolari e cellulari stanno sicuramente dando una grossa spinta allo sviluppo di sonde per protocolli di imaging molecolare.

Questa strategia richiederebbe la costruzione di sonde molecolari specifiche per ogni molecola target da analizzare. Tuttavia, la produzione di sonde adeguatamente specifiche è un processo lungo, costoso e complesso che comporta l'impegno di chimici, fisici e biologi per lo sviluppo della molecola, la sua caratterizzazione biologica e chimica, la sua marcatura e infine lo studio della molecola marcata in termini di farmacocinetica e farmacodinamica in vitro e in vivo. È facile intuire che questo iter non può essere seguito per l'enorme numero di bersagli da analizzare; per tale ragione, si è reso necessario lo sviluppo di protocolli di imaging semplici e generalizzabili.

L'avvento dell'utilizzo di geni reporter per la generazione di modelli molto efficienti per la valutazione dell'attività di promotori specifici, attraverso l'utilizzo di sonde marcate relativamente semplici da produrre.

## 2.1 Imaging cellulare

Nell'ambito delle terapie cellulo-mediate, l'imaging in vivo permette di monitorare in tempo reale la distribuzione delle cellule iniettate, la loro sopravvivenza, localizzazione e di valutare nel tempo, la proliferazione, il differenziamento, e anche le interazioni tra le stesse cellule con l'ambiente circostante.

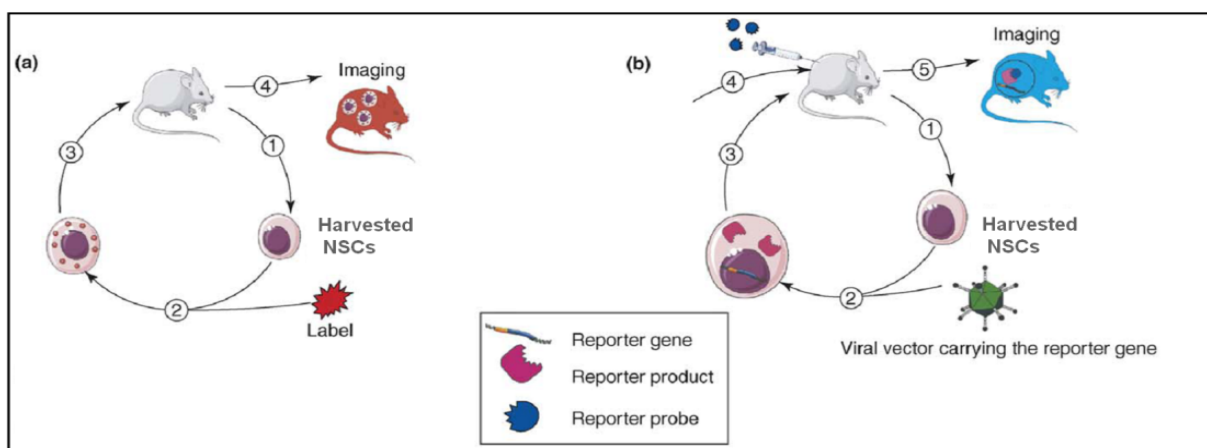
Due diverse tipologie di marcatura possono essere applicate per rendere rilevabili le popolazioni cellulari in studio: una marcatura chiamata diretta e una indiretta:

- **Marcatura diretta:** questo tipo di protocollo prevede la marcatura *ex vivo* di una determinata popolazione cellulare mediante l'internalizzazione di un agente facilmente rilevabile (un agente di contrasto, un radionuclide o una sonda fluorescente, in base alla tecnica di visualizzazione utilizzata) prima della loro



re-infusione nel soggetto in esame. Questa metodica si è rivelata utile per monitorare il *trafficking* cellulare e può essere utilizzata in alcuni protocolli di terapia cellulo-mediata per monitorare il destino nell'organismo delle cellule marcate, sebbene la buona riuscita della metodica dipenda anche dalla capacità delle cellule stesse di trattenere la marcatura. Questa tecnica infatti non permette il monitoraggio a lungo termine della vitalità o della proliferazione cellulare poiché l'agente di contrasto viene perso o diluito, rispettivamente in seguito a processi di apoptosi e mitosi.

- **Marcatura indiretta:** in questo caso la marcatura delle cellule di interesse si basa sulla modificazione genetica *ex vivo* delle cellule con un gene reporter esogeno la cui espressione sia rilevabile mediante tecniche di imaging *in vivo*. In questo caso le cellule potranno essere monitorate nel tempo senza alcuna diluizione del segnale poiché il gene reporter una volta integrato nel genoma cellulare viene trasferito alla mitosi alle cellule figlie. Questo approccio è fondamentale per la visualizzazione di popolazioni di cellule proliferanti, e per lo studio delle funzioni cellulari post-trapianto (differenziamento, attivazione, etc). In clinica, tuttavia, l'utilizzo di questo approccio è limitato dalla necessità di modificare a livello genetico la popolazione cellulare terapeutica.



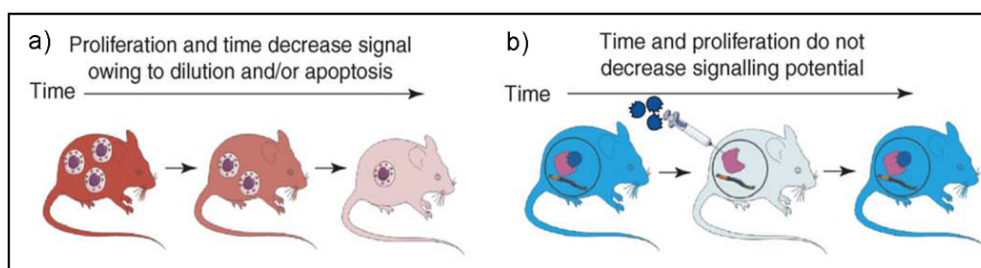
**Fig. 3: Rappresentazione schematica delle strategie di marcatura cellulare diretta(a) e indiretta (b) .**

La figura 3 mostra le diverse fasi della marcatura diretta e indiretta. Entrambe le strategie presentano aspetti positivi, ma anche negativi.

Il vantaggio principale dei protocolli di marcatura diretta rispetto a quella indiretta è la semplicità della realizzazione della marcatura diretta rispetto alla difficoltà dell'ingegnerizzazione genetica.

Tuttavia, le tecniche di marcatura diretta sono limitate dalla necessità di validare per ognuna di esse un protocollo specifico a seconda della capacità della popolazione cellulare di internalizzare la sonda o della necessità di utilizzare molecole carrier che ne facilitino il passaggio attraverso la membrana cellulare. Inoltre, questo approccio non permette il monitoraggio a lungo termine della vitalità e della proliferazione cellulare a causa della diluizione del marcatore durante i cicli di segregazione mitotica.

Al contrario, la marcatura indiretta, basata sull'ingegnerizzazione cellulare, nonostante le difficoltà dovute alla modificazione genetica, risulta essere molto utile (Martelli et al, 2009). Oltre a permettere un monitoraggio nel tempo della vitalità, della proliferazione e dell'eventuale differenziamento, senza perdere l'intensità del segnale (fig. 4), mediante utilizzo di promotori specifici e geni reporter ben caratterizzati, permette di pianificare protocolli di visualizzazione altamente informativi.



**Fig. 4: Imaging in vivo nel tempo nel caso di marcatura cellulare diretta (a) e indiretta (b).**

In ogni caso la modalità di marcatura scelta non deve perturbare le caratteristiche fenotipiche e funzionali fisiologiche della popolazione cellulare in esame.

Infine problemi, quali la biocompatibilità, la tossicità e la sicurezza dei marcatori utilizzati devono essere presi in considerazione non solo nei confronti delle cellule, ma anche per quanto riguarda l'organismo ricevente il trapianto.

La marcatura cellulare diretta è un metodo semplice e può permettere di visualizzare la localizzazione di cellule terapeutiche, mentre l'ingegnerizzazione delle cellule, anche se più complessa, permette di effettuare studi a lungo termine di variabili quali la sopravvivenza, proliferazione e il differenziamento.

Combinando le due diverse tecniche di marcatura cellulare, si ha l'opportunità di superare le limitazioni delle singole metodiche e di ottenere quindi dei risultati più completi. La possibilità di eseguire studi a lungo termine infatti, potrebbe permettere di sviluppare e valutare protocolli terapeutici, permettendo di individuare punti di controllo precoci in grado di fornire informazioni utili alla valutazione dell'efficacia dei trattamenti cellulo-mediati utilizzando procedure facilmente traslabili nelle pratiche cliniche.

L'integrazione di tecniche di imaging della bioluminescenza e della MRI sui modelli animali combinando l'alta sensibilità e la semplicità d'uso del primo approccio con l'ottima risoluzione spaziale del secondo, risulta essere sicuramente una procedura promettente per la valutazione dell'efficacia di protocolli terapeutici cellulo-mediati sia immunitari che rigenerativi.

## **2.2 Imaging a Risonanza Magnetica (MRI)**

L'imaging con risonanza magnetica (MRI) è una tecnica di generazione di immagini incentrata sul principio fisico della risonanza magnetica nucleare (NMR). La risonanza magnetica nucleare è basata sulla capacità di nuclei dotati di spin, chiamati dipoli magnetici, di allinearsi in modo parallelo o antiparallelo quando posti in un campo magnetico.

Quando la NMR è usata per l'imaging, si parla di MRI (imaging a risonanza magnetica). In teoria, sarebbe possibile effettuare misurazioni rilevando il segnale emesso da una grande varietà di nuclei atomici, come ad esempio il sodio, il fosforo, il carbonio e l'idrogeno, impostando la frequenza di risonanza delle bobine a

radiofrequenza al valore appropriato. Tuttavia in campo diagnostico viene attualmente usato quasi esclusivamente l'idrogeno come fonte di segnale.

Nello scanner per MRI, un grosso magnete produce il campo magnetico in cui viene immerso il soggetto in esame. Bobine all'interno dello scanner determinano un gradiente nel campo magnetico prodotto nelle tre direzioni X, Y e Z. Una bobina a radiofrequenza produce impulsi che fanno variare l'allineamento degli spin. Al cessare dell'impulso, i dipoli magnetici tornano al loro orientamento iniziale. Questo processo viene captato dalla bobina a radiofrequenza come un cambiamento nel flusso elettromagnetico (onde in radiofrequenza tra 1 e 100 MHz). Lo scanner è in grado di rilevare la velocità con cui i dipoli rilassano tornando all'orientamento di base; questo processo viene convertito in un segnale di risonanza magnetica (MR). La risonanza magnetica può essere definita come una tecnica di imaging multiplanare e multiparametrica:

Multiplanare si riferisce alla sua abilità di acquisire immagini a fette di un oggetto in modo non invasivo su piani assiali, coronali o sagittali ad ogni arbitraria posizione, spessore e orientazione. Lo spessore delle fette può essere variato cambiando la pendenza del gradiente (all'aumentare del gradiente diminuisce lo spessore delle fette). Un'immagine in risonanza magnetica è essenzialmente una rappresentazione bidimensionale dell'intensità delle proprietà magnetiche dei nuclei osservati in funzione della loro disposizione spaziale.

Multiparametrica perché ci sono diversi fattori che contribuiscono a determinare l'intensità e il contrasto del segnale di un'immagine a risonanza. Tali fattori possono essere intrinseci (densità protonica e i tempi di rilassamento T1 e T2) oppure estrinseci o sperimentali (parametri di acquisizione). I due tempi di rilassamento dipendono fortemente dal tipo di tessuto analizzato e dal suo stato di ossigenazione. Per questo motivo è possibile sfruttare queste variabili per migliorare il contrasto delle immagini variando la durata e gli intervalli degli impulsi di risonanza utilizzati. Infatti i dipoli in ambienti fisico-chimici differenti hanno diversi tempi di rilassamento e quindi sono in grado di generare segnali diversi riconoscibili (Jacobs et al, 2001). Per esempio i dipoli presenti in un tessuto grasso hanno un tempo di rilassamento molto più breve rispetto ai dipoli in ambiente acquoso.

Il contrasto dell'immagine può essere ottimizzato per uno scopo specifico e la scelta della sequenza di eccitazione determina la qualità dell'immagine. Esiste ad oggi una grande varietà di sequenze oltre a quelle convenzionali (Spin Echo e Gradient Echo Sequences) come la fast imaging e l'ultra fast imaging che permettono di ottimizzare l'acquisizione in base al soggetto analizzato e alla problematica in studio.

Rispetto alle tecniche che utilizzano sonde radioattive, la risonanza magnetica fornisce una risoluzione spaziale migliore (micrometri invece che millimetri) ed immagini che contengono contemporaneamente informazioni fisiologiche/molecolari e anatomiche. Tuttavia questa tecnica è molto meno sensibile (circa 3-6 ordini di grandezza) rispetto alla PET e all'imaging ottico, che offrono una sensibilità di circa 10-12 moli/l per i substrati nella PET e 10-15 moli/l nel caso della bioluminescenza. La scarsa sensibilità dell'MRI comporta la necessità che una maggiore quantità di sonda sia trattenuta a livello del sito bersaglio per essere rilevata e che quindi ne vengano iniettate quantità maggiori nell'animale. Esiste però un limite fisico nella quantità di sonda iniettabile in vivo, che dipende dal volume sanguigno totale del soggetto in esame e corrisponde circa al 10% del volume ematico totale (in un topo il volume di sangue medio è di 2,5ml che corrisponde ad un massimo volume iniettabile di 0,25ml).

La scarsa sensibilità della MRI si basa sul fatto che la percentuale di dipoli magnetici che si allineano preferenzialmente quando sono sottoposti ad un campo magnetico è molto piccola (circa 10 su 10<sup>6</sup> di dipoli in un campo di 1.5 Tesla a temperatura ambiente). Esistono diversi metodi utilizzati per aumentare il rapporto segnale-rumore in esperimenti di micro-MRI su piccoli animali, come incrementare l'intensità del campo magnetico, aumentare i tempi d'acquisizione o utilizzare dei sistemi d'amplificazione. Inoltre studiando piccoli animali, i dati anatomico-morfologici vanno elaborati con software dedicati allo studio dell'animale in esame per migliorare l'analisi dei dati ottenuti (Gassmann et al, 1998).

# **SCOPO DELLA TESI**

### 3. Scopo della tesi

Nel tentativo di curare le gravi conseguenze della lesione traumatica del midollo spinale sono stati messi a punto dei protocolli terapeutici che hanno disatteso le speranze. L' esempio chiave è rappresentato dal metilprednisolone, dai cui studi clinici non sono risultati segni di miglioramento della condizione del paziente mieloleso. La terapia chirurgica d'altro canto fornisce invece solo dei mezzi meccanici che permettono al paziente una migliore posizione supina o seduta, senza alcun miglioramento funzionale. Anche per questa procedura però non c'è consenso unanime.

La maggior parte dei nuovi farmaci utilizzati nella ricerca sperimentale e quelli in sviluppo clinico vengono in realtà utilizzati nelle fasi acutissime della mielolesione e sembrano e sembrano agire attraverso una diminuzione dell'entità della degenerazione. Questa riduzione dell'entità del danno si riflette in un miglior recupero motorio nell'animale mieloleso.

La terapia con cellule staminali rappresenta uno strumento promettente per la rigenerazione della lesione spinale. Se l'applicazione di queste cellule risultasse in un recupero tissutale nervoso nell'area lesa, potrebbe rappresentare una base importante per sostenere la rigenerazione e la ricostituzione delle connessioni perse con la lesione traumatica.

Recentemente è stato ipotizzato l'uso di cellule staminali che sono ottenibili da embrioni, sia ad uno stadio precoce di sviluppo che ad uno tardivo, nonché dagli organi adulti come il midollo osseo, il derma e il tessuto nervoso.

Da diversi anni presso il nostro laboratorio si studia il comportamento di diversi tipi di cellule staminali sia *in vitro* che *in vivo*. Questo studio consiste nell'analisi del comportamento di cellule staminali neurali prelevate a seguito di ischemia prolungata indotta per mezzo di occlusione carotidea. Le cellule, già ampiamente caratterizzate dal punto di vista biologico *in vitro*, sono state trapiantate in un modello murino di trauma spinale contusivo a livello toracico. Questa ricerca si propone quindi di studiare come le cellule staminali migrino e si differenzino nel tessuto ospite, ed inducano recupero funzionale. La ricerca si propone inoltre di

studiare l'espressione genica di citochine e molecole coinvolte nella modulazione del processo infiammatorio innescato dal trauma, e di fattori neurotrofici coinvolti nel processo di rigenerazione.

A tal fine è stato creato un modello sperimentale nel topo, che riproduce una condizione di paraplegia: gli animali sono stati sottoposti a laminectomia e a successiva lesione a livello di T9 di intensità pari a 50 Kd, mediante IH *Spinal Cord Impactor*. E' stata scelta la modalità di somministrazione delle cellule staminali mediante iniezione per via endovenosa, al fine di valutarne la capacità di migrazione in sede di lesione. Dopo aver dimostrato le caratteristiche di staminalità e la capacità di differenziamento in senso neuronale in vitro, le cellule staminali sono state trapiantate negli animali mielolesi.

La valutazione del recupero funzionale negli animali è stata condotta mediante test comportamentali (BMS) ad intervalli prestabiliti, a partire dal giorno successivo alla data di lesione.

Al termine del 28° giorno dalla lesione, gli animali sono stati sacrificati mediante perfusione intraventricolare. Si è quindi proceduto all'estrazione del midollo spinale, al fine di valutare la sopravvivenza, migrazione e differenziamento delle cellule trapiantate, mediante analisi immunoenzimatiche e di immunofluorescenza.

Le cellule sono state inoltre marcate con particelle ferrose superparamagnetiche (SPIOs) al fine di poterle visualizzare nell'animale *in vivo* mediante risonanza magnetica, allo scopo di poter valutare i parametri già analizzati in precedenza in tempo reale durante il trattamento.



# **MATERIALI E METODI**

## **4.1 Animali**

Per questo studio sono stati utilizzati topi adulti CD1 (Charles River) del peso di circa 30 grammi. Gli animali sono stati mantenuti in stabulario in condizioni ambientali standard (22°C di temperature, 65% di umidità, luce artificiale dalle 08.00 alle 20,00) e sottoposti ad una dieta standard solida ed acqua ad libitum. Tutti i protocolli sperimentali sono stati approvati dal Comitato Etico del Dipartimento di Medicina, Chirurgia e Odontoiatria del Polo Universitario San Paolo e sono conformi alle linee guida italiane per laboratori in cui vengono utilizzati animali, le quali a loro volta sono uniformate alle Direttive della Comunità Europea del Novembre 1986 (86/609/EEC) e alla attuale normativa vigente dello Stato Italiano che regola la sperimentazione e il welfare degli animali da esperimento (legge 116 del 1991)

## **4.2 Colture primaria**

I tessuti sono stati prelevati da cervelli ottenuti da ceppi CD1.

L'animale viene sacrificato per dislocazione cervicale e 6 ore dopo il sacrificio, la cute viene lavata con etanolo (BDH) al 70% allo scopo di ridurre la possibilità che vengano incidentalmente inclusi alcuni peli nella coltura.

Il cranio viene inciso mediante taglio mediale in direzione rostro-caudale per rimuovere la pelle. Tramite piccole forbici per preparazione, viene praticata un'incisione lungo la sutura sagittale prestando particolare attenzione a non danneggiare il tessuto nervoso sottostante. Dopo avere rimosso le ossa della scatola cranica, l'encefalo viene estratto mediante l'utilizzo di una spatola e posto nella soluzione 1 (sol 1) contenente: 50 ml di PBS (Gibco) 10 X, 5 ml di penicillina-streptomina (Euroclone) alla concentrazione finale di 100 U/ml, 10 ml di glucosio 30% alla concentrazione finale di 0,6% e 435 ml di acqua sterile.

La regione da cui vengono preparate le cellule staminali è la zona sottoventricolare (SVZ). Essa viene prelevata tagliando una porzione di 2 mm circa in sezione coronale a livello della metà della lunghezza rostro-caudale del cervello. Una volta isolati, i tessuti vengono tagliati in frammenti di piccole dimensioni allo scopo di facilitare la successiva digestione enzimatica che viene effettuata per un'ora a 37°C, ponendo il tessuto nella soluzione 2 (sol 2) contenente: Cisteina (Sigma) 0,2

mg/ml, EDTA (Sigma) 0,2 mg/ml e Papaina (DBA) 1 mg/ml disciolte in EBSS (Sigma) e filtrate prima dell'uso. La papaina contenuta nella soluzione è un enzima in grado di digerire le proteine extracellulari facilitando così la liberazione delle cellule dalla matrice stessa.

Terminata la digestione, il tessuto digerito viene centrifugato (Beckam Coluter) a 800 rpm per 10', il surnatante viene rimosso completamente e sostituito con 1 ml di terreno EBSS. Il tessuto viene disgregato con l'ausilio di una pipetta Gilson P1000 µl. Vengono poi aggiunti 7 ml di EBSS ed effettuata una successiva centrifugazione con gli stessi parametri della precedente. Il surnatante viene rimosso quasi completamente, il pellet viene ulteriormente dissociato in terreno fresco utilizzando una pipetta Gilson P200 µl e le cellule vengono contate con una camera di Burker (Sigma). Il preparato viene infine piastrato ad una concentrazione di 3500 cellule/cm<sup>2</sup> in Petri (Greiner Bio-One) da 3,5 cm<sup>2</sup> in terreno Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco) addizionato con fattori proliferativi come Epidermal Growth Factor (EGF) 20 ng/ml (PeproTech) e basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) 10 ng/ml (PeproTech).

### **4.3 Colture cellulari**

La sospensione cellulare ottenuta dalla coltura primaria viene piastrata in terreno di crescita, contenente cioè quei fattori che favoriscono la proliferazione delle cellule staminali neurali; ovvero EGF 20 ng/ml e bFGF 10 ng/ml. In queste condizioni le cellule staminali sono indotte a crescere formando delle strutture sferoidi dette appunto neurosfere che dopo 3-5 giorni raggiungono un diametro di circa 100-150 µm e a questo punto è opportuno effettuare una dissociazione meccanica delle stesse in modo tale da poterle ri-piastrare ad una concentrazione adeguata sotto forma di singole cellule. A tale scopo le cellule vengono raccolte e centrifugate a 700 rpm per 10'. Il surnatante viene aspirato quasi completamente lasciandone circa 20 µl e il pellet viene dissociato meccanicamente mediante l'utilizzo di una pipetta Gilson P200, I passaggi ripetuti di aspirazione ed espulsione attraverso il puntale della pipetta P200 consentono di ottenere una sospensione di singole cellule che possono essere successivamente piastrate in Flask di dimensioni

adeguate. Le colture vengono quindi incubate in incubatore (Heraeus) alla temperatura di 37°C e al 5% di CO<sub>2</sub> in ambiente umido. A ogni passaggio successivo la coltura si arricchirà in cellule staminali, anche se è importante ricordare che la neurosfera è una struttura eterogenea costituita da cellule staminali, ma anche da progenitori, cellule apoptotiche e in fase di differenziazione.

#### **4.3.1 Conta cellulare**

Al fine di piastrare le cellule ad una densità ottimale è necessario effettuare il conteggio delle cellule ottenute dalla dissociazione delle neurosfere. La conta cellulare è stata effettuata mediante camera di Burker prelevando una piccola aliquota della sospensione cellulare alla quale viene aggiunto il colorante vitale Trypan Blue (Sigma). Utilizzando un microscopio ottico (Leica) con un ingrandimento 100x si contano le cellule che appaiono chiare e brillanti presenti in tutti i quadrati della camera di Burker e poi si moltiplica questo valore per 10 che è il fattore di diluizione della camera di Burker e si moltiplica anche per il fattore di diluizione delle cellule nel Trypan Blue; il valore risultante ci consente di sapere la concentrazione n° cellule/ µl. Conoscendo il volume totale della sospensione cellulare si potrà ricavare il numero totale di cellule.

#### **4.3.2 Differenziamento**

Al fine di verificare la multi potenzialità delle cellule staminali neurali, queste vengono sottoposte a test di differenziamento in vitro, che mediante specifica induzione permette di ottenere cellule differenziate nei tre tipi cellulari presenti nel SNC adulto: neuroni, oligodendrociti ed astrociti.

L'induzione al differenziamento è ottenuta ponendo le cellule in coltura in multiwell da 48 pozzetti su cui è stato precedentemente creato uno strato di Matrigel (Daco) con terreno contenente siero (1%) e in assenza di fattori di crescita ad azione mitogena.

Per ottenere cellule differenziate, facilmente processabili per ulteriori analisi dei marcatori di differenziamento quali  $\beta$ -tubulina per i neuroni, galC/O4 per gli oligodendrociti e GFAP per gli astrociti, si piastrano le cellule staminali in pozzetti da 1 cm<sup>2</sup> di una multiwell (Greiner Bio-One) su cui vengono adagiati vetrini porta oggetto del diametro di 1 cm precedentemente ricoperti con 200  $\mu$ l di Matrigel e mantenuti in incubatore a 37°C per almeno 1 ora alla densità di 60,000 cellule/pozzetto. Le cellule in fase di differenziamento vengono inizialmente coltivate in terreno F costituito da DMEM contenente il solo FGF come fattore di crescita; dopo due giorni di coltura in terreno F, il medium di coltura viene sostituito con Terreno Controllo costituito da DMEM in assenza di fattori mitogeni ma addizionato con Fetal Bovine Serum (FBS) (Euroclone) alla concentrazione finale di 1% e le cellule vengono incubate per 5 in queste condizioni a 37°C e 5% di CO<sub>2</sub>.

### **4.3.3 Congelamento**

Le cellule staminali murine hanno un tasso di crescita molto elevato. Risulta quindi utile col procedere della coltura congelare parte delle cellule in eccesso che possono essere conservate in contenitori criogenici e scongelate quando necessario. Quando la coltura contiene delle neurosfere di dimensioni adeguate al congelamento, esse vengono raccolte e centrifugate a 700 rpm per 10', a questo punto si aspira tutto il soprannatante e si risospende il pellet in 1,5 ml di terreno di coltura contenente dimetilsolfossido (DMSO) (Sigma) ad una concentrazione finale del 10%. Il DMSO è un composto chimico crioprotettivo che esplica la sua azione inibendo la formazione di cristalli di ghiaccio durante la procedura di congelamento, che danneggerebbero notevolmente e in maniera irrimediabile le membrane cellulari.

Le neurosfere vengono risospese blandamente con una pipetta Gilson P1000 senza però essere dissociate e trasferite in criovials (Nalgene). La fase di congelamento si svolge in 2 fasi; inizialmente le criovials contenenti le cellule vengono poste in un contenitore di plastica a temperatura ambiente immerso nell'isopropanolo (BDH) che consente un abbassamento della temperatura graduale di 1°C al minuto e messe in un congelatore alla temperatura di -80°C overnight (O/N). Il

giorno seguente le vials contenenti le cellule vengono poste in azoto liquido dove possono essere conservate per periodi di tempo molto lunghi.

#### **4.3.4 Scongellamento**

Le neurosfere conservate in azoto liquido, possono essere messe nuovamente in coltura dopo il loro scongelamento. La criovial contenente le cellule di interesse viene prelevata dal contenitore dell'azoto liquido e posta in un bagnetto termostato alla temperatura di 37°C fino ad avvenuto scongelamento che deve essere il più rapido possibile in quanto il DMSO sebbene funga da protezione per le cellule a bassa temperatura risulta avere su di esse effetti tossici a temperatura ambiente. Una volta avvenuto lo scongelamento si preleva la sospensione cellulare e la si trasferisce in un tubo da 15 ml a cui viene poi aggiunto terreno di coltura previamente riscaldato alla temperatura di 37°C per evitare ulteriori shock termici alle cellule fino ad arrivare ad un volume di 10 ml e si centrifuga a 700 rpm per 10'. In questo modo vengono lavati i residui DMSO tossici per le cellule che vengono poi aspirati con tutto il surnatante. Il pellet così ottenuto viene risospeso in 1 ml di terreno di coltura mediante pipetta Gilson P1000 e posto con adeguato volume di terreno in una Flask. Il giorno seguente le neurosfere scongelate possono essere dissociate, contate e ripiastrate nuovamente come descritto in precedenza.

#### **4.3.5 Fissaggio delle cellule differenziate**

Al settimo giorno dall'inizio del differenziamento, si può verificare al microscopio l'avvenuto differenziamento, riscontrabile per la presenza di numerosi neuroni bipolari, astrociti ed oligodendrociti. Le cellule possono dunque essere fissate ed essere così rese disponibili a successivi studi di immunocitochimica.

La procedura di fissazione prevede: lavaggio con PBS 0,01 M, (un tampone fosfato salino in cui è disciolto: NaCl 1,5 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20mM e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 80 mM) per 5' per eliminare i residui del terreno di coltura e successivo trattamento con Paraformaldeide (Sigma) al 4% per 10' così da poter fissare i gruppi aldeidici delle proteine cellulari. Si effettuano poi altri 2 lavaggi da 5' con PBS 1X e le cellule così fissate possono quindi essere conservate a 4°C.

## **4.3.6 Metodiche di marcatura delle PM-NPCs**

### **4.3.6.1 Marcatura con PKH26**

La marcatura con PKH26 è utilizzata per riconoscere le cellule trapiantate quando si effettuano le analisi di immunofluorescenza. Il PKH26 è un marcatore delle membrane cellulari che si intercala nel doppio strato lipidico. Il protocollo di marcatura prevede la conta delle cellule come descritto nel punto 4.3.1, dopodichè, le cellule vengono pellettate tramite centrifugazione per 10' a 1200 rpm, il surnatante viene aspirato e il pellet viene risospeso in eluente. Alla sospensione viene poi aggiunto un ugual volume di soluzione contenente eluente e PKH26  $4 \times 10^{-6}M$ , la miscela viene miscelata vigorosamente ed incubata per 5' a RT e poi viene aggiunto un ugual volume di siero per inibire la reazione di marcatura. Alla fine della reazione di marcatura le cellule vengono lavate in terreno, centrifugate 10' a 1200 rpm e risospese 1/2 volte, dopodichè sono pronte per essere trapiantate.

### **4.3.6.2 Marcatura con Hoechst**

L'Hoechst rientra nella famiglia di molecole fluorescenti leganti il DNA ed è visibile al microscopio a fluorescenza e al FACS. E' utilizzato sia per visualizzare i mitocondri, sia per identificare i nuclei, similmente al DAPI. Si è quindi pensato di utilizzarlo per marcare le cellule da trapiantare negli animali, così da poterne seguire il percorso e verificarne l'attecchimento. Il protocollo di marcatura utilizzato impiega l'Hoechst 33342 (Sigma), perché molto lipofilico, e quindi più facilmente penetrante le membrane. Il colorante viene aggiunto alla concentrazione di  $1\mu l/ml$  alla soluzione cellulare da iniettare negli animali; tale miscela viene poi messa a  $37^{\circ}C$  per 1h e agitata ogni 10'-15' al fine di raggiungere una marcatura ottimale.

#### 4.3.6.3 Marcatura con SPIOs

La marcatura diretta delle NSC è stata ottenuta mediante l'incorporazione di nanoparticelle paramagnetiche (SPIOs), facendo riferimento al lavoro svolto da Politi et al (Politi et al, 2007).

Non avendo naturali capacità fagocitiche, questo tipo di cellule necessita dell'aiuto di un agente trasfettante per l'internalizzazione del marcatore.

Per la messa a punto del protocollo di marcatura, sono state testate diverse concentrazioni di ferro, diversi tempi di incubazione delle cellule con il terreno marcato e diversi agenti trasfettanti.

- Le PM-NPCs sono state piastrate in piastre da 6 pozzetti ad una concentrazione di  $5 \times 10^5$  cellule per pozzetto in un volume di terreno pari a 2 ml.
- Dopo 6 ore dalla piastratura, è stato aggiunto, ad ogni pozzetto, uno stesso volume di terreno contenente la sospensione di particelle paramagnetiche di tipo commerciale Endorem® (Guerbet; 11,2 mg Fe/ml), in modo da avere una concentrazione finale pari rispettivamente a 0 - 100 - 200 e 400 µg Fe/ml.
- Il terreno contenente le diverse concentrazioni di SPIO è stato aggiunto alle cellule immediatamente o previa incubazione per 30 minuti a 37°C con diversi agenti trasfettanti quali poli-L-lisina (PLL, Sigma-Aldrich; da 2,4 mg/ml), polybrene (PB, Sigma-Aldrich; soluzione madre 10 mg/ml, usato in concentrazione 10 µg/ml) e protamina solfato (PS, Sigma-Aldrich; da 10 mg/ml). PLL e PS sono state testate in diversi rapporti rispetto al ferro (Fe/PLL 1:0,03, 1:0,06 e 1:0,09 ; Fe/PS 1:0,025 e 1:0,05).
- Le cellule sono state lasciate incubare con il terreno marcato per 24, 48 o 72 ore a 37°C .
- Al termine dell'incubazione, le cellule sono state lavate tre volte con PBS addizionato con eparina (1U/ml) e contate per analizzare la vitalità mediante colorazione con Trypan Blue.



Le eventuali influenze della marcatura sulla vitalità cellulare sono state valutate tramite test di esclusione del Trypan Blue; mentre il mantenimento della morfologia e delle caratteristiche fenotipiche e funzionali da parte delle NSC marcate, è stato studiato mediante tecniche di microscopia ottica e di immunofluorescenza (valutazione dell'espressione della nestina).

L'efficienza della marcatura è stata valutata mediante colorazione di Perl ed analisi spettrofotometrica del contenuto di ferro intracellulare.

Una parte delle cellule marcate è stata successivamente ripiastrata e tenuta in coltura per i successivi 5 o 7 giorni per analizzarne rispettivamente il mantenimento delle capacità di autorinnovamento e il mantenimento delle capacità differenziative.

#### **4.3.7 Colorazione di PERL**

Dopo l'incubazione con le nanoparticelle paramagnetiche, è stata utilizzata la colorazione di Perl (acido ferrocianuro) per rilevare la presenza di ferro intracellulare. La reazione prevede la riduzione dello ione ferrico  $Fe^{3+}$  allo stato ferroso con la formazione di un precipitato blu.

- 150.000 NSC marcate, dopo essere state lavate e dissociate meccanicamente, sono state spottate su un vetrino da microscopio mediante cytopspin (5 minuti a 900 rpm).
- Le cellule sono state poi fissate con una soluzione alcolica (Cervix fixative, J.T Baker).
- I vetrini con le cellule sono stati incubati in una miscela 1:1 di 2% HCl (BDH Laboratory Supplies) e 2% ferrocianuro di potassio ( $FeK_4(CN)_6$ , Merck) per 45 minuti a temperatura ambiente.
- Le membrane cellulari sono state contro-colorate incubando i vetrini con una soluzione a base di Safranina (Merck) per 1 minuto.
- I vetrini sono stati montati utilizzando un montante da istologia.

#### **4.3.8 Valutazione dell'efficienza di marcatura**

L'efficienza di marcatura è stata valutata tramite microscopia ottica dopo colorazione di Perl ed è stata espressa come percentuale di cellule positive alla colorazione sul totale di cellule contate (minimo 500 cellule per vetrino). Per ogni campione sono stati considerati un minimo di 7 campi diversi.

#### **4.3.9 Valutazione del contenuto di ferro intracellulare**

Il contenuto di ferro per cellula è stato valutato mediante analisi spettrofotometrica

- Il pellet di un numero noto di NSC marcate è stato risospeso in 200  $\mu$ l di 5M HCl e incubato a 37°C per 24h.
- Sono poi stati aggiunti 100  $\mu$ l di 5% FeK<sub>4</sub>(CN)<sub>6</sub> e lasciati reagire per 15 minuti a temperatura ambiente.
- Il volume totale è stato portato a 1 ml mediante aggiunta di 700  $\mu$ l di acqua distillata.
- L'assorbanza (densità ottica) dei campioni è stata misurata utilizzando uno spettrofotometro diode array Hewlett Packard 8452A (Hewlett Packard) a una lunghezza d'onda di 630 nm.

La quantificazione del ferro è stata ottenuta mediante estrapolazione dei dati per confronto con una curva standard di campioni di ferro a concentrazione nota in 5M HCl (Tab. 2).

Il bianco consiste in 700  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 200  $\mu$ l di 5M HCl e 100  $\mu$ l di 5% FeK<sub>4</sub>(CN)<sub>6</sub>. Le concentrazioni così ottenute sono state divise per il numero di cellule di partenza.

Punto della curva	Concentrazione di ferro ( $\mu\text{g/ml}$ )
9	200
8	100
7	50
6	25
5	12,5
4	6,25
3	3,125
2	1,5626
1	0,78125
bianco	0

**Tab. 2: Curva standard delle concentrazioni di ferro**

#### **4.4 Lesione spinale**

Gli animali sono stati anestetizzati attraverso la somministrazione per via intraperitoneale, di cloralio idrato al 4% (Sigma), diluito in H<sub>2</sub>O distillata ad una dose pari ad 1 ml di soluzione/Kg di peso. Successivamente si è proceduto alla rasatura a livello delle vertebre toraciche e al posizionamento sul tavolo operatorio. La cute è stata tagliata ed è stato asportato parte del tessuto adiposo presente sopra la muscolatura della schiena. L'incisione, di un paio di centimetri, deve permettere di operare sulle vertebre con comodità ma non deve arrecare inutili disturbi all'animale. Si è poi provveduto al distacco dei legamenti della muscolature dorsale dal processo spinoso delle vertebre intorno alla nona vertebra toracica (T9).

Una volta messe a nudo le vertebre è stato asportato l'arco vertebrale di T9. Successivamente, gli animali sono stati posti sotto il pistone dell'impactor IH device, posizionato 1 mm sopra il midollo esposto e programmato per uno spostamento di 3 mm. E' stata applicata una forza di 50 Kd per 2 secondi, poi il pistone è stato automaticamente ritratto. E' stata registrata automaticamente l'estensione del pistone e i movimenti del midollo spinale. Dopo l'impatto, la zona interessata è stata lavata con soluzione fisiologia sterile (Sodio Cloruro 0,9%) (Bieffe Medital), quindi si è proceduto alla suture della muscolatura dorsale con filo riassorbibile (Etichon), mentre la colonna vertebrale è stata lasciata priva dell'arco posteriore asportato. Esternamente i lembi di cute della ferita sono stati riuniti tramite punti metallici. Infine, allo scopo di prevenire sepsi post-operatorie, a ciascun topo è stata somministrata per via sottocutanea una soluzione di 100 µl di ampicillina (Farmitalia) alla dose di 100 mg/Kg di peso ed è stata inoltre somministrata sempre per via sottocutanea una dose di 1 ml di soluzione fisiologica. Successivamente, gli animali sono stati tenuti sotto osservazione fino al risveglio e in assenza di complicazioni, sono stati riposti nelle gabbie dello stabulario. Nei giorni successivi gli animali sono stati seguiti giornalmente per quanto riguarda la minzione, che spesso doveva essere assistita tramite compressione meccanica della vescica e per i 2 giorni successivi alla lesione sono stati trattati con 100 µl di ampicillina alla dose di 100 mg/Kg di peso e 1 ml di soluzione salina entrambe somministrate per via sottocutanea.

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

Il trapianto delle cellule staminali neurali derivate dalla SVZ prevede 2 protocolli diversi: trattamento acuto e trattamento cronico. Per quanto riguarda il trattamento acuto è stato effettuato subito dopo la lesione al midollo spinale, le cellule sono state dissociate e contante come precedentemente descritto, sono poi state risospese in adeguato volume con PBS sterile. Il trapianto è avvenuto in due tempi distinti, 30' e 2 h dopo la lesione mediante iniezione endovenosa, ogni iniezione conteneva  $5 \times 10^5$  cellule. Nel trapianto cronico, le cellule sono state preparate in maniera analoga e iniettate a livello del sito di lesione 30 giorni dopo il trauma .

mediante riesposizione a livello T9 del midollo. Le cellule vengono somministrate in un volume di 10  $\mu$ l alla concentrazione di 15.000 cell/ $\mu$ l. In entrambi i protocolli, le cellule prima di essere iniettate sono state opportunamente marcate allo scopo di riconoscerne la migrazione a livello del sito di lesione.

Per ciascun gruppo sono stati effettuati i rispettivi controlli mediante iniezione di soluzione salina.

#### **4.6 Valutazione del recupero motorio**

I topi, ad intervalli regolari (3 giorni) e per la durata di 60 giorni sono stati sottoposti a prove comportamentali, per valutare gli eventuali recuperi funzionali dopo la lesione spinale. Le prove comportamentali effettuate si ispirano a quelle eseguite da D.M. Basso, del Dipartimento di Biologia Cellulare, Neurobiologia ed Anatomia dell'Università dell' Ohio *Basso Mouse Scale* (BMS) (Basso et al, 2006). Per superare il problema della soggettività nella valutazione del comportamento animale, due persone, che osservavano contemporaneamente gli animali, hanno provveduto all'assegnazione dei valori. Dopo ogni test eseguito sono stati assegnati dei valori numerici da 0 a 9 corrispondenti al diverso comportamento dell'animale, dove valori sempre più alti indicano una funzionalità motoria sempre maggiore e più simile a un topo normale (tab. 3).

La valutazione della funzionalità motoria è riferita alle zampe posteriori, in quanto una lesione a livello della vertebra T9 influisce sulla funzionalità delle sole zampe posteriori.

0	Nessun movimento della caviglia
1	Piccolo movimento della caviglia (rotazione < 90°)
2	Esteso movimento della caviglia (rotazione >90°)
3	Posizionamento plantare delle zampe con o senza supporto del peso OPPURE Passo dorsale occasionale, frequente o consistente ma non passo plantare
4	Passo plantare occasionale
5	Passo plantare frequente o consistente, senza coordinazione OPPURE Passo plantare frequente o consistente, coordinazione parziale, zampe ruotate al contatto <u>e</u> al distacco
6	Passo plantare frequente o consistente, coordinazione parziale, zampe parallele al contatto OPPURE Passo plantare frequente o consistente, coordinazione prevalente, zampe ruotate al contatto e al distacco
7	Passo plantare frequente o consistente, coordinazione prevalente, zampe parallele al contatto <u>e</u> ruotate al distacco OPPURE Passo plantare frequente o consistente, coordinazione prevalente, zampe parallele al contatto <u>e</u> al distacco e instabilità del tronco severa
8	Passo plantare frequente o consistente, coordinazione prevalente, zampe parallele al contatto <u>e</u> al distacco e instabilità del tronco moderata OPPURE Passo plantare frequente o consistente, coordinazione prevalente, zampe parallele al contatto <u>e</u> al distacco, instabilità del tronco normale e coda su & giu'
9	Passo plantare frequente o consistente, coordinazione prevalente, zampe parallele al contatto <u>e</u> al distacco, instabilità del tronco normale e coda sempre su

**Tab. 3: scala di valutazione BMS**

## 4.7 RM in vivo

Tutti gli animali sono stati visualizzati mediante uno strumento 7T MRI System (Pharmascan, Bruker Biospin).

Gli animali sono stati anestetizzati con isofluorano, posizionati supini sul lettino e inseriti nella bobina a radiofrequenza (38 mm di diametro) dentro il magnete.

Sono state acquisite immagini controllo trasversali per confermare il corretto posizionamento della regione di interesse.

Sono state utilizzate diverse sequenze di risonanza magnetica:

- Sequenza Spin Echo (MSME), (matrice 256x128; TR/TE: 1200/12 ms; 2 medie; tempo di acquisizione: 5' 7"; con soppressione dei lipidi)
- Sequenza Gradient Echo (FLASH), (matrice 256x128; TR/TE: 1200/10 ms; 2 medie; tempo di acquisizione: 5' 7")
- Sequenza Fast Spin Echo (RARE) (matrice 256x128; TR/TE: 2000/56 ms; 2 medie; tempo di acquisizione: 4'16")

Tutti gli animali sono stati acquisiti in modo da ottenere immagini sagittali, coronali (5 fette con spessore di 0.7 mm; campo di vista (Field of View, FOV) 4x4 cm e risoluzione spaziale di 156 x 312  $\mu\text{m}$ ) e assiali (12 fette con spessore di 0.7 mm; FOV 3x3 cm e risoluzione spaziale di 117 x 234  $\mu\text{m}$ ).

## 4.8 RM ex vivo

Dopo essere stati acquisiti mediante MRI in vivo, al fine di confermare i dati, ogni settimana un piccolo gruppo di animali è stato sacrificato per poter condurre le analisi ex vivo.

Gli animali sono stati perfusi con paraformaldeide al 4% ed i midolli spinali sono stati prelevati, inclusi in formalina al 4% (Sigma Aldrich), acquisiti ex vivo mediante MRI (sequenze FLASH-3D: FOV=2x2x1.6 cm; matrice 256x128x64; risoluzione spaziale di 78  $\mu\text{m}$ ; TR/TE: 30/6.2 ms; flip angle=15; 30 averages; tempo di acquisizione: 2h 2') e sezionati (fette sagittali dello spessore di 16 $\mu\text{m}$ ) al fine di effettuare la colorazione di Perl specifica per il ferro. Le sezioni del midollo sono state osservate al microscopio ottico ad ingrandimenti 5X, 20X e 40X.

## **4.9 Analisi morfologica e immunocitochimica**

### **4.9.1 Perfusione**

Ad un periodo di tempo prestabilito dopo la lesione al midollo spinale con successivo trapianto di cellule staminali neurali o PBS, gli animali sono stati perfusi allo scopo di poter effettuare esperimenti di immunocitochimica. I topi sono stati anestetizzati con un sovradosaggio di cloralio idrato al 4%, dopodiché sono stati immobilizzati in posizione supina sopra un supporto solido e posti sotto cappa chimica. Il torace del topo è stato lavato con etanolo, è stata tagliata la cute in senso cranio-caudale ed è stato asportato il tessuto adiposo sottostante per mettere in evidenza la gabbia toracica dell'animale. Il cuore viene esposto ed incannulato a livello del ventricolo sinistro e l'animale viene perfuso con paraformaldeide al 4% dopo avere effettuato un taglio nell'atrio destro a livello dell'auricola per prevenire l'ipertensione arteriosa.

### **4.9.2 Estrazione del midollo**

Dopo la perfusione, viene prelevato il midollo spinale dell'animale e posto nella medesima soluzione di paraformaldeide 4% usata per la perfusione O/N.

Il giorno seguente il midollo viene immerso in una soluzione di PB 0,1 M per 3 ore e poi posto in soluzioni di saccarosio a concentrazione crescente; prima al 15% per 2 ore e poi al 30% per 4 ore. Il midollo viene infine congelato in OCT e conservato alla temperatura di -80°C.

### **4.9.3 Taglio dei tessuti**

Il midollo congelato deve poi essere incluso in un opportuno mezzo di inclusione che possa permettere di tagliarlo a fette sulle quali effettuare in seguito esperimenti di immunocitochimica. L'inclusione del midollo viene effettuata utilizzando *Optimal Cutting Temperature* (OCT) (Bio-Optica), un reagente che si trova allo stato liquido a temperatura ambiente e che solidifica velocemente se portato alla temperatura di -20°C. Il midollo viene infatti adagiato dentro ad un supporto di plastica e ricoperto con OCT, il supporto viene poi appoggiato sopra un blocco di ghiaccio secco fino a



completa solidificazione dell'OCT e montato su un supporto metallico per poter infine essere tagliato tramite criostato (Leica) in fettine di 10  $\mu\text{m}$  di spessore poste su vetrini precedentemente gelatinati per consentire alle fettine di aderire al vetrino.

#### **4.9.4 Colorazione con cresil-violetto**

La colorazione con cresil-violetto è un tipo di colorazione che consente di avere un riferimento anatomico e di evidenziare l'architettura cellulare delle sezioni tagliate così da avere una visione conformazionale della sostanza bianca e della sostanza grigia dopo la lesione.

Le sezioni precedentemente tagliate e poste sui vetrini vengono prima lavate in acqua distillata per 5', poi colorate con Cresil-violetto (Sigma) alla concentrazione finale di 0,1% per 60' e infine immerse in sequenza prima in acqua distillata e poi in acqua di fonte. A questo punto il vetrino viene immerso in una scala crescente di alcoli per 10' ogni volta partendo da una soluzione di alcool 75°, per poi passare ad una soluzione di alcool 95° e infine ad una soluzione di alcool 100°. Il vetrino viene poi chiarificato con Xilolo (BDH) per un tempo sufficiente a lavare via l'eccesso di colorante e infine montato utilizzando Permout (sigma) e coprendo le sezioni con un vetrino copri-oggetto prima di procedere all'analisi tramite microscopio.

#### **4.9.5 Immunofluorescenza**

L'immunofluorescenza è una metodica utilizzata per determinare la presenza di una determinata proteina nel tessuto o nelle cellule che si stanno studiando. Il principio su cui si basa l'immunofluorescenza è il riconoscimento da parte di uno specifico anticorpo detto anticorpo primario (Ab I) di un epitopo presente su un determinato tipo di proteina che è quella di cui si vuole rilevare la presenza. Il passaggio successivo prevede l'impiego di un altro anticorpo detto anticorpo secondario (Ab II) che si attacca all'Ab I precedentemente usato in quanto si usa un Ab II che riconosce un epitopo che è specie-specifico per l'animale in cui è stato prodotto l'Ab I e quindi si va a legare soltanto all' Ab I che a sua volta si è legato alla proteina specifica contro cui è diretto sempre che essa sia presente nel tessuto analizzato. L'Ab II è coniugato a un fluorocromo, una molecola che se stimolata con una luce di una certa lunghezza d'onda ( $\lambda$ ) emette una luce ad una lunghezza

d'onda maggiore, che può essere rivelata con un microscopio a fluorescenza per determinare la presenza o meno della proteina d'interesse.

#### **4.9.5.1 Immunofluorescenza in vivo**

Le colorazioni in immunofluorescenza in vivo sono state effettuate sui vetrini contenenti le sezioni di tessuto tagliate al criostato a partire del tessuto prelevato dall'animale perfuso e poi incluso in OCT. Il metodo di colorazione prevede i seguenti passaggi:

- I. 3 lavaggi in PBS 0,01 M da 5' ciascuno
- II. Lavaggio di 30' a RT con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Sigma) 0,05 M disciolto in PBS 0,01 M per bloccare i gruppi aldeidici
- III. 3 lavaggi in PBS 0,01 M da 5' ciascuno
- IV. Permeabilizzazione di 1h e 30' a RT con soluzione di PBS 0,01 M contenente BSA (Serva) 1,5% sciolta in PBS 0,01 M e triton (BDH) 0,2% disciolto in PBS 0,01 M in modo tale da permeabilizzare la membrana plasmatica per consentire il successivo ingresso dell' Ab I nel citosol (triton) e per saturare i siti aspecifici del tessuto a cui potrebbe legarsi l'Ab I (BSA)
- V. Incubazione con Ab I (a concentrazione specifica per ogni Ab) diluito in un buffer di PBS 0,01 M contenente BSA 1,5% e triton 0,2% per 1h e 30' a 37°C in camera umida per evitare che evaporino l'Ab I
- VI. 3 lavaggi in PBS 0,01 M da 5' ciascuno per eliminare i residui di Ab I che non si sono legati alla proteina bersaglio
- VII. Incubazione con Ab II (a concentrazione specifica per ogni Ab II) diluito in un buffer di PBS 0,01 M contenente BSA 1,5% e filtrato prima dell'uso per 2h al buio in camera umida e a temperatura ambiente
- VIII. 3 lavaggi con PBS 0,01 M da 5' ciascuno per eliminare i residui di Ab II che non si sono legati all'Ab I e che potrebbero interferire con il segnale rilevato tramite microscopio a fluorescenza
- IX. Incubazione di 10' al buio con il marcatore nucleare DAPI (Sigma), un molecola che si intercala nel DNA in zone ricche di A-T alla concentrazione finale di 1µg/ml

- X. 3 lavaggi con PBS 0,01 M da 5' ciascuno per eliminare l'eccesso di DAPI che non è riuscito a penetrare nelle cellule e a legarsi al DNA
- XI. Montaggio del vetrino copre sulle sezioni dopo avere prima cosparso le medesime con Fluorsave (Calbiochem), un agente utilizzato per proteggere l'Ab II coniugato al fluorocromo dal photobleaching, così da migliorare il segnale fluorescente, prolungare il suo tempo di conservazione e migliorare il segnale fluorescente
- XII. Fissaggio del vetrino copri-oggetto con smalto e successivo visionamento delle immagini tramite microscopio a fluorescenza (Leica) o microscopio confocale TCS SP2 (Leica). Una volta visionati, i vetrini possono essere conservati a 4°C per un breve periodo di tempo, oppure a -30°C per un periodo di conservazione lungo

Ab I	[ ]	Prodotto	Ab I	[ ]	Prodotto
Microtubule-Associated Protein2 (MAP-2)	1:300	Chemicon	ED1	1:25	Chemicon
Choline Acetyltransferase (Chat)	1:1000	Chemicon	Neurofilamenti	1:200	Chemicon
Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)	1:400	Covance	5-Hydroxy Tyrosine	1:150	Sigma
Tyrosine Hydroxylase	1:1000	Chemicon			

Ab II	[ ]	Prodotto	Ab II	[ ]	Prodotto
Anti Rabbit (A-Rb) Rosso	1:1000	Alexa	Anti Rabbit (A-Rb) Verde	1:1000	Alexa
Anti Mouse (A-Ms) Rosso	1:1000	Alexa	Anti Mouse (A-Ms) Verde	1:1000	Alexa
Anti Chicken (A-Chk) Rosso	1:1000	Alexa	Anti Chicken (A-Chk) Verde	1:1000	Alexa

**Tab. 4: Anticorpi primari e secondari utilizzati nelle immunofluorescenze *in vivo***

#### 4.9.5.2 Immunofluorescenza in vitro

Le colorazioni in immunofluorescenza in vitro sono state effettuate sulle cellule ottenute dopo 7 giorni di coltura in condizioni differenzianti con il protocollo descritto nel punto 4.3.2.

Il metodo di colorazione prevede i seguenti passaggi:

- I. Trasferimento del vetrino con le cellule differenziate in altro pozzetto contenente 500 µl di PBS 0,01 M di una nuova multiwell da 48 pozzetti poiché le reazioni con gli anticorpi prevedono periodi di incubazione a 37°C e se i vetrini non fossero spostati in una nuova multiwell tutte le cellule appartenenti anche ai vetrini che non devono essere reagiti sarebbero sottoposti ad inutili cambiamenti di temperatura
- II. Permeabilizzazione delle membrane cellulari per 10' a RT con 200 µl di soluzione di triton 0,2% in PBS 0,01 M per consentire l'ingresso nel citosol all'Ab I
- III. Incubazione a 37°C per 2h o a 4°C O/N con 80 µl di soluzione contenente l'Ab I (a concentrazione specifica per ogni Ab I) diluito in buffer di PBS 0,01 M addizionato con normal goat serum (NGS) (Pierce) alla concentrazione finale del 10%
- IV. 3 lavaggi con 500 µl di PBS 0,01 M da 5' ciascuno per eliminare i residui di Ab I che non si sono legati alla proteina bersaglio
- V. Incubazione con Ab II (a concentrazione specifica per ogni Ab II) diluito in un buffer di PBS 0,01 M contenente NGS 10% e filtrato prima dell'uso per 45' al buio a temperatura ambiente
- VI. 3 lavaggi con 500 µl di PBS 0,01 M da 5' ciascuno per eliminare i residui di Ab II che non si sono legati all'Ab I e che potrebbero interferire con il segnale rilevato tramite microscopio a fluorescenza
- VII. Incubazione di 10' al buio con 80 µl di marcatore nucleare DAPI, una molecola che si intercala nel DNA in zone ricche di A-T alla concentrazione finale di 1µg/ml
- VIII. 3 lavaggi con 500 µl di PBS 0,01 M da 5' ciascuno per eliminare l'eccesso di DAPI che non è riuscito a penetrare nelle cellule e a legarsi al DNA

- IX. Montaggio del vetrino portante le cellule marcate dopo averlo sciacquato in H<sub>2</sub>O distillata sopra un altro vetrino sul quale era stata precedentemente applicata una goccia di Fluorsave, un agente utilizzato per proteggere l'Ab II coniugato al fluorocromo dal photobleaching
- X. Fissaggio del vetrino copri-oggetto con smalto e successivo visionamento delle immagini tramite microscopio a fluorescenza o microscopio confocale. Una volta visionati, i vetrini possono essere conservati a 4°C

Ab I	[ ]	Prodotto	Ab I	[ ]	Prodotto
B-Tubulin III	1:150	Covance	GFAP	1:400	Covance
Galactocerebroside (GalC)	1:150	Chemicon	Nestin	1:100	R&D System

Ab II	[ ]	Prodotto	Ab II	[ ]	Prodotto
Anti Mouse (A-Ms) Verde	1:1000	Alexa	Anti Rabbit (A-Rb) Verde	1:1000	Alexa
Anti Rat (A-Rat) Verde	1:1000	Alexa			

**Tab. 5: Anticorpi primari e secondari utilizzati nelle immunofluorescenze *in vitro***

#### **4.9.6 Colorazione con fluoromielina**

Il Fluoromyelin è una mielina fluorescente in grado di marcare selettivamente e rapidamente la mielina presente nelle sezioni di tessuto nervoso: è adatto per capire la distribuzione e la struttura mielinica e per la localizzazione di altri marcatori. Contestualmente, infatti, può essere usato in combinazione con altri coloranti e con i comuni metodi di istochimica per i materiali criosezionati. Esso sfrutta l'alto contenuto lipidico della guaina assonale ed agisce per associazione lipofilica. Il protocollo prevede il lavaggio delle sezioni in OCT con PBS 1X per 20', seguito dall'incubazione con il Green Fluorescent Fluoromyelin TM(Invitrogen) 1:300 in PBS 1X per 20' a RT. Successivamente si lava per tre volte per 10' con PBS 1X e, se necessario, si mette il DAPI 1:200 per 10'. Nuovamente si lava per

tre volte con PBS 1X per 5' ciascuna e si monta il vetrino copri oggetto con Fluorsave

## **4.9.7 Valutazione dell'inflammazione**

### **4.9.7.1 Quantificazione dei neutrofili**

Dopo 24 h dalla lesione, gli animali vengono sacrificati, i midolli prelevati, inclusi in OCT e tagliati trasversalmente in sezioni di 10 mm di spessore. Si procede alla quantificazione dei neutrofili non solo a livello del trauma, ma anche rostralmente e caudalmente ad esso. Ciò per appurare la diversa entità dell'infiltrato infiammatorio nel topo trattato con cellule staminali e nel topo placebo. Quindi si preparano due soluzioni: la prima contenente Naftolo (Sigma) (14mg in 1 ml) disciolto in DMSO (Sigma) e Triton X-100 in rapporto 9:1, la seconda, nota come esaziotideparaseabilina, data da pararosalina 4% in HCl 2M e NaNO<sub>2</sub> 2% in H<sub>2</sub>O miscelate 1:1. La seconda soluzione viene diluita 1:200 in PBS 1X per il controllo negativo e in PBS 1X e Naftolo 1:100 per la marcatura. I vetrini con le sezioni midollari vengono lavati 2 volte con PBS 1X per 5' e successivamente incubate con le soluzioni appropriate per 1h a RT. Poi si lava con acqua di fonte per 10' e con acqua distillata per altri 10'. I nuclei si colorano con Ematossilina (Fluka) incubando le sezioni per 5'. Di nuovo si lava con acqua di fonte per 15' e si monta il vetrino copri oggetto con glicerolo 50% in PBS 1X.

I neutrofili sono contati in entrambi i gruppi di campioni nella regione dorsale caudale, rostrale e a livello della lesione, mediante microscopio a luce chiara con un ingrandimento di 40X.

### **4.9.7.2 Quantificazione dei macrofagi**

Per valutare l'inflammazione conseguente alla lesione nei due gruppi, trattato e non, si è stimato il numero di macrofagi a livello rostrale, caudale e della lesione. I topi sono stati sacrificati 7 giorni dopo il trauma e i midolli estratti inclusi in OCT e tagliati al criostato in sezioni trasversali di 10 mm. Sulle sezioni ottenute si

effettuano 3 lavaggi con PBS 1X da 5' ciascuno e poi si incubano con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,05 M sciolto in PBS 1X per 30'. Nuovamente si lava 3 volte con PBS 1X per 5' e poi con acqua ossigenata 1% al fine di bloccare le perossidasi endogene. Dopo 5' si lava 3 volte con PBS 1X per 5' ogni volta e si pone la soluzione con NGS 5% e Triton 0,2% in PBS 1X in incubazione per 1h e 30' a RT; a seguire si mette la soluzione dell'anticorpo primario sciolto in NGS 5% e Triton 0,2% in PBS 1X e la si lascia in incubazione ON a 4 °C. Al termine del tempo stabilito si lavano le sezioni per 3 volte con PBS 1X, considerando ciascun lavaggio di 5'; si può quindi incubare i campioni con l'anticorpo secondario biotinilato diluito in NGS 5% in PBS 1X per 2-3h a RT. Nel frattempo si prepara la soluzione avidina-biotina partendo da NGS 5% sciolto in PBS 1X a cui si aggiungono l'avidina e la biotina 1:1, in modo che la loro miscela sia 1:100 rispetto alla soluzione finale. La soluzione avidina-biotina, così ottenuta, viene posta sulle sezioni per 45': dopo i tre lavaggi con PBS 1X da 5' ciascuno, la soluzione DAB 3% in Tris 0,1 M a pH 7.4 viene messa sui campioni e lasciata agire finché la marcatura non è evidente. Si lava con PBS 1X e si lasciano asciugare le sezioni all'aria. A questo punto i vetrini vengono immersi in recipienti recanti una scala alcolica crescente, per disidratare (5' in etanolo 75%, 5' in etanolo 100%). Poi si immergono in Xilolo per 8' e si monta il vetrino copri oggetto mediante Permount. I vetrini vengono osservati al microscopio a luce chiara e i macrofagi contati a livello rostrale, della lesione e caudale della regione dorsale.

## **4.10 Analisi di citochine**

### **4.10.1 Estrazione RNA dai tessuti**

Alcuni animali sono stati sacrificati per estrarre l'RNA dal tessuto midollare spinale e valutare i livelli di trascrizione di alcune molecole come citochine, fattori neuroprotettivi e altre molecole implicate nel pathway infiammatorio e rigenerativo nella zona di lesione. In questo caso si è proceduto al sacrificio dell'animale tramite decapitazione per garantire la conservazione del tessuto fresco.

Dopo avere estratto il tessuto midollare di interesse, esso è stato omogeneizzato utilizzando del TRIzol<sup>®</sup> (Sigma), una soluzione monobasica di fenolo e guanidina isotiocianato usata nel rapporto di 1 ml per ogni 50-100 mg di tessuto a cui viene aggiunto 1 µl di glicogeno per ogni ml di TRIzol<sup>®</sup> utilizzato e disgregando il tessuto con una siringa. Il tessuto così omogeneizzato è stato incubato 5' a RT per consentire la completa dissociazione dei complessi nucleo proteici, dopodiché sono stati aggiunti 200 µl di cloroformio (Merck) per ogni ml di TRIzol<sup>®</sup> utilizzato e la soluzione è stata agitata vigorosamente per 15'' ed incubata per 3' a RT. Il campione è stato poi centrifugato a 12.000 g per 15' alla temperatura di 2-8°C e si è ottenuto in questo modo la separazione in tre fasi: la fase organica inferiore, un interfase contenenti entrambe DNA e proteine e una fase acquosa superiore contenente esclusivamente l'RNA. La fase acquosa è stata trasferita in una nuova provetta e l'RNA è stato precipitato utilizzando 500 µl di isopropanolo per ogni ml di TRIzol<sup>®</sup> utilizzato, lasciando la soluzione in incubazione per 10' a RT e infine centrifugando a 12.000 g per 10' alla temperatura di 2-8°C. Dopo la centrifugazione, il surnatante è stato rimosso e il pellet di RNA è stato lavato utilizzando 1 ml di etanolo al 75% per ogni ml di TRIzol<sup>®</sup> usato durante l'omogeneizzazione; la soluzione è stata vortexata e poi centrifugata a 7.500 g per 5' alla temperatura di 2-8°C.

Alla fine della procedura, il surnatante è stato aspirato e il pellet di RNA è stato asciugato sotto vuoto facendo attenzione a non farlo seccare troppo in quanto la sua solubilità diminuirebbe notevolmente. L'RNA è stato infine disciolto in 30 µl di H<sub>2</sub>O trattata con DEPC e conservato a -80°C. Prima del suo utilizzo l'RNA è stato



trattato per eliminare l'eventuale DNA genomico contaminante incubandolo per 1h a 37°C in una soluzione contenente buffer 10X (Bio-Labs), DNAsi 1(2U/1µg di RNA) (Bio-Labs),RNasi out (Bio-Labs ) 20 U e H<sub>2</sub>O fino ad un volume finale di 50 µl. L'RNA trattato è stato poi nuovamente estratto aggiungendo prima 300 µl di una soluzione di fenolo-cloroformio (PCI) e 33 µl di acetato di sodio 3M trattato con DEPC seguite da agitazione mediante vortex e successiva centrifugazione a 12.000 rpm per 5'. Dopo la centrifugazione il surnatante è stato aspirato e il pellet lavato con cloroformio e poi sono state effettuate le medesime operazioni descritte sopra fino alla dissoluzione dell'RNA in H<sub>2</sub>O DEPC.

#### **4.10.2 Retrotrascrizione dell' RNA in cDNA**

I campioni di RNA estratti dai tessuti midollari sono stati retrotrascritti a cDNA per poter essere utilizzati in real-time PCR. Il protocollo per la Retrotrascrizione prevedeva come prima fase l'aggiunta di 30 ng di random esameri (Bio-Labs) a 10 µl di RNA disciolto in H<sub>2</sub>O DEPC cui seguiva un'incubazione di 10' a 65°C per consentire il disappaiamento di eventuali random esameri appaiati, il campione viene poi posto in ghiaccio per evitare di nuovo l'appaiamento di questi ultimi. E' stata poi aggiunta al campione una miscela di reazione contenente buffer 10X (Bio-Labs) contenente ditioneitol (DTT), 10mM di deossinucleotidi (dNTPs) e H<sub>2</sub>O RNasi free per portare ad un volume finale di 30 µl. La soluzione è stata incubata a 25°C per 5' e poi da ogni campione sono stati prelevati 6 µl che serviranno da controllo negativo (MOCK) per la reazione di retrotrascrizione. Ai rimanenti 24 µl di campione sono stati aggiunti 200 U di trascrittasi inversa M-MLV (Bio-Labs) e poi sia i campioni che i MOCK così da mantenere per entrambi le stesse condizioni di reazione sono stati incubati per 1h a 50°C e poi ulteriori 15' a 70°C per consentire alla retrotrascrittasi di convertire l'RNA in cDNA. Eseguita la retrotrascrizione, i campioni di cDNA sono pronti per essere usati o alternativamente essere conservati a -30°C.

### 4.10.3 Real time PCR

La real-time PCR, denominata anche PCR quantitativa o PCR quantitativa in tempo reale (rtq-PCR) è una metodica in cui l'amplificazione ed il rilevamento dell'amplificato avvengono contemporaneamente. Questo è possibile grazie all'introduzione nella reazione di una molecola fluorescente, che ci dà la possibilità di seguire la reazione da un punto di vista visivo, grazie all'ausilio di appositi software.

Il rilevamento del DNA può avvenire in 2 modi: tramite coloranti intercalanti il DNA o tramite sonde specifiche ad ibridazione; nel nostro caso è stata sfruttata la tecnologia del SYBER Green (Biorad), un colorante fluorescente che ha la caratteristica di legarsi in modo aspecifico a livello del solco minore della doppia elica di DNA. All'aumentare del numero di cicli, si ha un accumulo sempre maggiore di prodotto di reazione in cui il SYBER Green può intercalarsi e quindi il segnale fluorescente rilevabile aumenta all'aumentare dei cicli e può essere direttamente correlato al numero di copie dell'amplicone presenti in soluzione.

L'apparecchiatura di rivelazione è costituita da una CCD camera che rileva il segnale di fluorescenza emesso e trasferisce le informazioni raccolte al software per l'analisi dei dati ottenuti. Poiché durante una real-time PCR sono previsti numerosi cicli in cui la temperatura varia per permettere la dissociazione della doppia elica di DNA, l'appaiamento dei primers e la sintesi del cDNA l'intensità della fluorescenza varieranno notevolmente durante un singolo ciclo, in quanto l'intensità di emissione del SYBER Green è alta quando esso è intercalato ad un doppio filamento di DNA mentre è bassa quando si trova libero in soluzione. Quindi, quando viene raggiunta la temperatura di melting ( $T_m$ ) e le doppie eliche di DNA si separano il segnale di fluorescenza decade, mentre al ciclo successivo quando il SYBER Green si intercala nuovamente alle doppie eliche di DNA la fluorescenza aumenta, ed è maggiore ad ogni ciclo in virtù dei nuovi ampliconi prodotti.

La rilevazione avviene nel picco di massima intensità della fluorescenza e il valore che ci permette di calcolare qual è la quantità di DNA in soluzione è il ciclo soglia (Ct), ovvero il ciclo durante il quale l'aumento di fluorescenza è abbastanza

significativo da poter essere preso come riferimento per determinare la quantità di DNA presente.

La real-time PCR è stata effettuata in una macchina Opticon 2 (MJ Research) utilizzando SYBER Green. L'amplificazione è stata effettuata in un volume totale di 25 µl contenente: SYBER Green Mix, 5 µM di ciascun primer del gene di interesse o alternativamente 3 µM di primer del gene di riferimento housekeeping utilizzato (GAPDH), 10 µl di cDNA e H<sub>2</sub>O Millique per portare a volume. Dopo un ciclo a 95°C per 10', le reazioni sono state sottoposte a 40 cicli con i seguenti parametri: 95°C per 30'', 56°C per 1', 72°C per 1' e lettura della fluorescenza al termine della fase di estensione.

#### **4.10.3.1 Primers utilizzati per le Real Time PCR**

BDNF (lunghezza prodotto: 158 bp) Primm Italia

BDNF FWD: 5'-cattaccttctgcatctgttg-3'

BDNF REV: 5'-cgtggacgtttacttcttcatgg-3'

IL6 (lunghezza prodotto: 169 bp) Primm Italia

IL6 FWD: 5'-gacaaccacggccttcctac-3'

IL6 REV: 5'-cgttggtcatacaatcagaattgcc-3'

LIF (lunghezza prodotto: 101 bp) Primm Italia

LIF FWD: 5'-aacgtggaaaagctatgtgcg-3'

LIF REV: 5'-gcgaccatccgatacagctc-3'

NGF (lunghezza prodotto: 165 bp) Primm Italia

NGF FWD: 5'-tgggcccaataaaggtttggcc-3'

NGF REV: 5'-tgggcttcagggacagagtctcc-3'

TNF $\alpha$  (lunghezza prodotto 100 bp) Primm Italia

TNF $\alpha$  FWD: 5'-tctatggcccagaccctcacac-3'

TNF $\alpha$  REV: 5'-cagccactccagctgctcctc-3'

MIP2 (lunghezza prodotto 168 bp) Primm Italia

MIP2 FWD: 5'-acgccccaggacccccactg-3'

MIP2 REV: 5'-ggacagcagcccaggctcctcc-3'

# RISULTATI

## **5.1 Attività locomotoria post-traumatica nei topi con lesione midollare.**

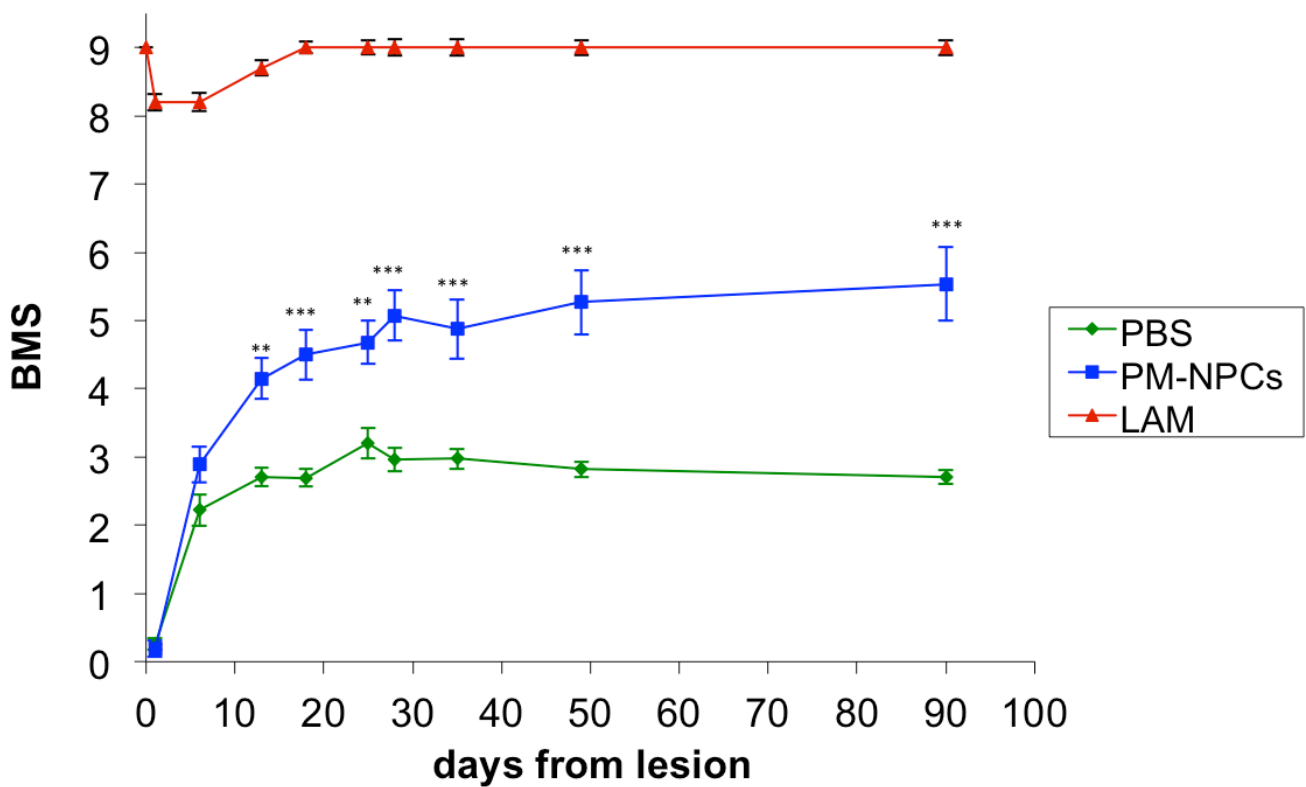
La lesione spinale traumatica a livello della nona vertebra toracica (T9), produce una lesione grave e persistente con degenerazione della sostanza grigia e di buona parte della sostanza bianca nel sito danneggiato: questo provoca, di conseguenza, una ridotta abilità nell'uso delle zampe posteriori degli animali nei giorni successivi (Gorio et al, 2004; Bottai et al, 2008; Vitellaro-Zuccarello et al, 2008) . Per valutare l'attività motoria e il suo successivo recupero è stata utilizzata una scala di valutazione dell'attività motoria, nota come Basso Mouse Scale (BMS) (Basso et al, 2006), che quantifica in 9 punti l'abilità locomotoria dell'animale lesionato: il valore massimo 9 corrisponde ad una deambulazione normale, lo zero ad una paralisi completa ed, infine, i parametri intermedi a caratteristiche motorie interposte tra i due limiti appena menzionati. Gli score nel test definiscono la capacità locomotoria del topo nel momento in cui viene effettuato il test.

Tutti gli animali subiscono un'operazione chirurgica di laminectomia, che ha lo scopo di asportare il rivestimento osseo del midollo spinale nell'area T8-T9: alcuni animali dopo la laminectomia non vengono sottoposti a lesione; questi animali costituiscono il gruppo controllo di riferimento. In figura 5 si vede che l'asportazione ossea provoca una transiente riduzione della capacità motoria, passando da un punteggio di 9 (passo plantare frequente o consistente, coordinazione prevalente, zampe parallele al contatto e al distacco, instabilità del tronco normale e coda sempre sollevata) a 8 (passo plantare frequente o consistente, coordinazione prevalente, zampe parallele al contatto e al distacco e instabilità del tronco moderata. Oppure passo plantare frequente o consistente, coordinazione prevalente, zampe parallele al contatto e al distacco, instabilità del tronco normale e coda su e giù); questa piccola riduzione persiste per circa 10 giorni, dopodichè, l'animale ritorna ad avere una deambulazione normale (BMS = 9).

Al contrario, negli animali sottoposti a lesione contusiva, si osserva una paraplegia quasi completa nei primi giorni successivi al danno. In pratica l'animale si sposta trascinandosi con gli arti anteriori: in questa situazione l'animale è aiutato per espletare le proprie funzioni fisiologiche, che recuperano in una decina di giorni.

Negli animali che dopo la lesione sono stati trattati con PBS per via endovenosa, si osserva un recupero motorio che raggiunge un punteggio di 2.22 (esteso movimento della caviglia con rotazione  $>90^\circ$ ) entro il 7° giorno dalla lesione, quindi in tempi abbastanza rapidi; successivamente, questi animali mostrano un ulteriore recupero della funzionalità motoria (sebbene minima) col passare del tempo, fino a raggiungere un valore di plateau di 2,7 punti sulla BMS entro la 4° settimana dal danno; questo valore si mantiene quindi costante per tutto il successivo periodo di osservazione (90 giorni).

Diversamente, gli animali trattati con le PM-NPCs (2 iniezioni endovena da  $5 \cdot 10^5$  cellule entro 30 minuti dalla lesione) mostrano un recupero motorio significativamente aumentato rispetto ai topi trattati con PBS, in particolare a partire dalla seconda settimana post-lesione. Infatti, a 7 giorni dal danno, il valore dell'attività locomotoria degli animali trattati è paragonabile ai topi non trattati, ma nei giorni a seguire la differenza è consistente. Infatti, al quattordicesimo giorno il punteggio di BMS nei topi trattati con le cellule è di 4.1 (passo plantare occasionale), rispetto ai topi trattati con PBS che raggiungono solo un punteggio di 2,5 (movimento esteso di entrambe le zampe posteriori o posizionamento plantare delle zampe posteriori con o senza supporto del peso). Col progredire delle settimane il recupero motorio degli animali trattati con PM-NPCs aumenta progressivamente fino a raggiungere un valore di 5.2 (passo plantare frequente o consistente, senza coordinazione. Oppure passo plantare frequente o consistente, coordinazione parziale, zampe ruotate al contatto e al distacco) a 30 giorni dalla lesione; che aumenta ancora fino ad un valore di 5.5 al 90° giorno post-trauma(fig. 1). In questo periodo di tempo invece, gli animali trattati con PBS non superano un valore di BMS di circa 3 (fig. 5). Questi dati indicano che le PM-NPCs svolgono un'azione di recupero graduale, che si manifesta primariamente tra l'inizio della seconda settimana e la fine della quarta. Questo miglioramento suggerisce una miglior preservazione dell'area lesa da parte delle PM-NPCs e/o una significativa promozione della rigenerazione nervosa attraverso la lesione.



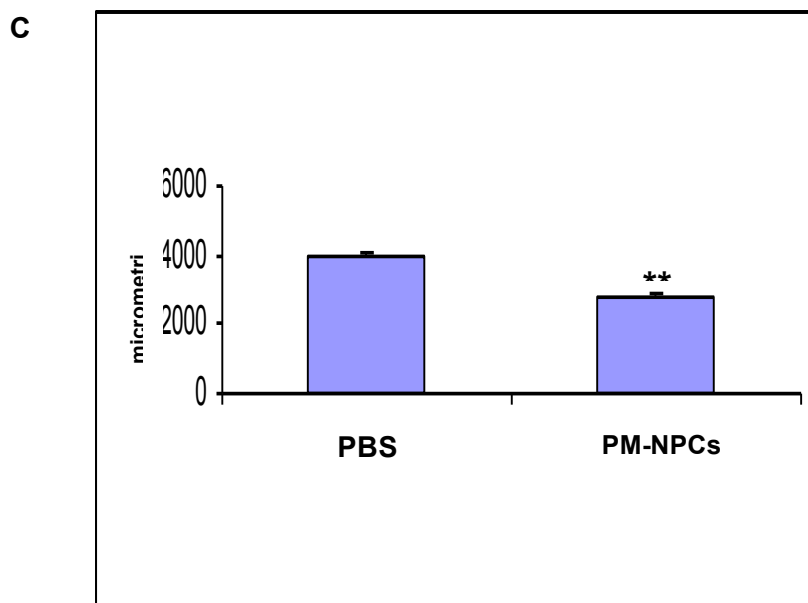
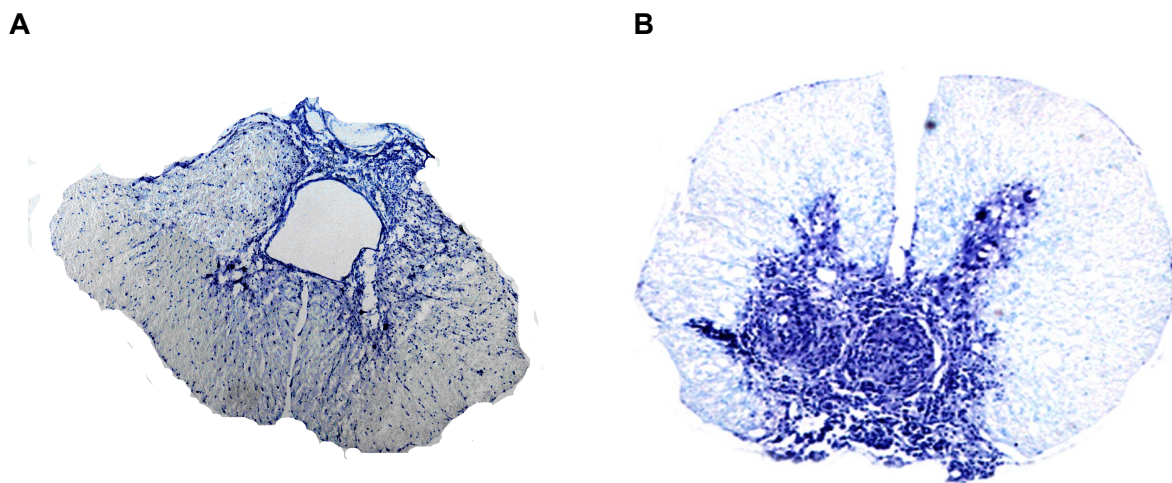
**Fig. 5: Recupero dell'attività locomotoria in campo aperto mediante valutazione con la Basso Mouse Scale dell'uso degli arti posteriori. (Mean ± S.E.M: \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001) vs PBS)**



## **5.2 Analisi morfometrica della lesione.**

L'analisi morfometrica della lesione midollare è stata effettuata a 30 giorni dalla contusione, grazie al taglio seriale di almeno quattro midolli per gruppo sperimentale. Le sezioni sono state colorate con la tionina (fig. 6A e B), un colorante della sostanza di Nissl indicante i corpi cellulari. L'analisi seriale mostra che l'area necrotica e cicatriziale della lesione è di circa 4 mm negli animali trattati con salina (fig. 6C). Ciò conferma come la lesione traumatica meccanica produca una lesione degenerativa con dimensioni molto maggiori a quelle del pistone di impatto; questo ultimo, infatti, ha una superficie di 1 mm<sup>2</sup>. Dunque, la degenerazione post-traumatica è il risultato di una degenerazione acuta di origine meccanica, che potrebbe avere le dimensioni del pistone, e di un processo di espansione di natura ipossico-ischemica. In altre parole, la degenerazione secondaria quadruplica l'estensione del danno meccanico originario, anche se in maniera asimmetrica: poiché la gravità della contusione è maggiore a livello caudale.

Negli animali trattati con le PM-NPCs si osserva una riduzione significativa dell'estensione della lesione (fig. 6C), suggerendo una potente azione neuroprotettiva e di attenuazione della lesione secondaria da parte delle cellule somministrate. In aggiunta a ciò, si consideri anche che in svariati animali le cellule trapiantate hanno favorito la formazione di un "cordoncino" costituito dalle cellule trapiantate che attraversa longitudinalmente la lesione.



**Fig. 6: Sezioni trasversali di midollo spinale a 28 giorni dal trauma a livello T9 colorate con tionina di un animale lesionato e trattato con PBS (A), o con PM-NPCs (B). Quantificazione dell'estensione della lesione (C). (Mean  $\pm$  S.E.M: \*\*P<0.01 vs PBS).**

### 5.3 Destino delle PM-NPCs nel midollo lesio.

Le cellule PM-NPCs sono state marcate con coloranti specifici: uno per il DNA (Hoechst) e l'altro per le membrane cellulari (PKH26). Per gli studi sulla loro abilità migratoria condotti *in vivo*, sono state inoltre marcate anche con particelle ferrose superparamagnetiche (SPIOs), nanoparticelle ferrose che si localizzano nel citosol e che permettono di seguire le cellule grazie all'uso della risonanza magnetica (RM).

Al microscopio a fluorescenza la marcatura con hoechst presenta i nuclei colorati in blu, mentre il PKH26 è rosso; questi marcatori consentono di localizzare le cellule nel tessuto *ex vivo*. L'uso di questo ultimo permette anche di verificare il destino delle cellule trapiantate nell'animale e nei suoi organi mediante l'impiego di una CCD camera.

In figura 7 si vede che le cellule PM-NPCs PKH26-positive, somministrate per via endovenosa entro 24 ore dalla lesione, si accumulano con alto tropismo nel sito di lesione del midollo spinale e, come evidenziato dal gradiente a colori, lungo l'intera area interessata dalla degenerazione secondaria, che determina l'estensione totale della lesione. Gli altri organi, eccezion fatta per la milza, sono quasi del tutto privi di esse.

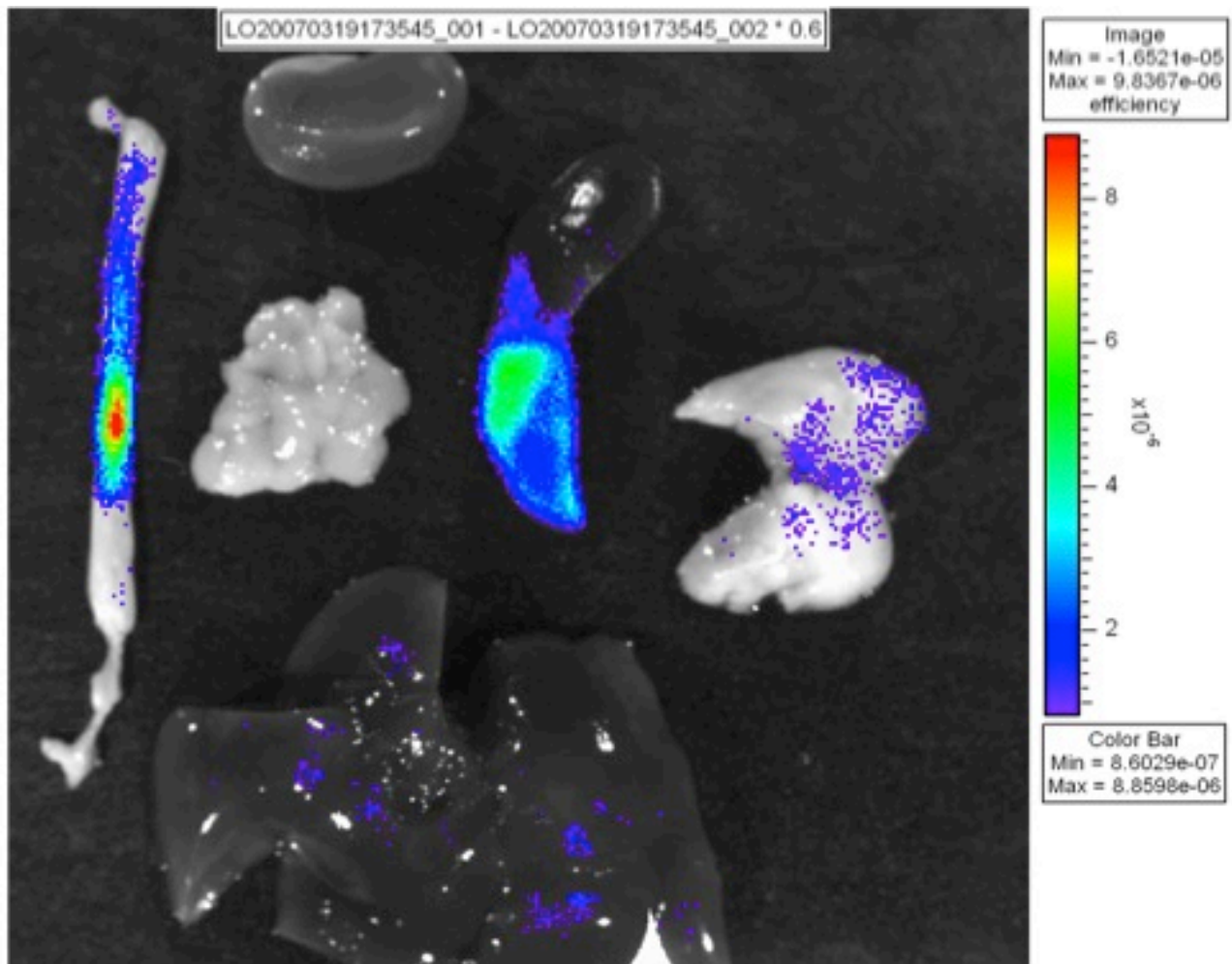
Come in precedenza evidenziato in figura 6 dalle sezioni di tionine, occasionalmente le PM-NPCs, una volta raggiunto il midollo danneggiato, si aggregano per formare un "cordoncino" neurale.

Grazie alla tecnica dell'interferenza applicata al microscopio confocale si apprezza la ricchezza del cordone di prolungamenti e di corpi cellulari marcati in blu da Hoechst (fig. 8); ciò indica che queste cellule colorate sono le PM-NPCs somministrate per via endovenosa, in grado di raggiungere la lesione attraverso il sistema vascolare.

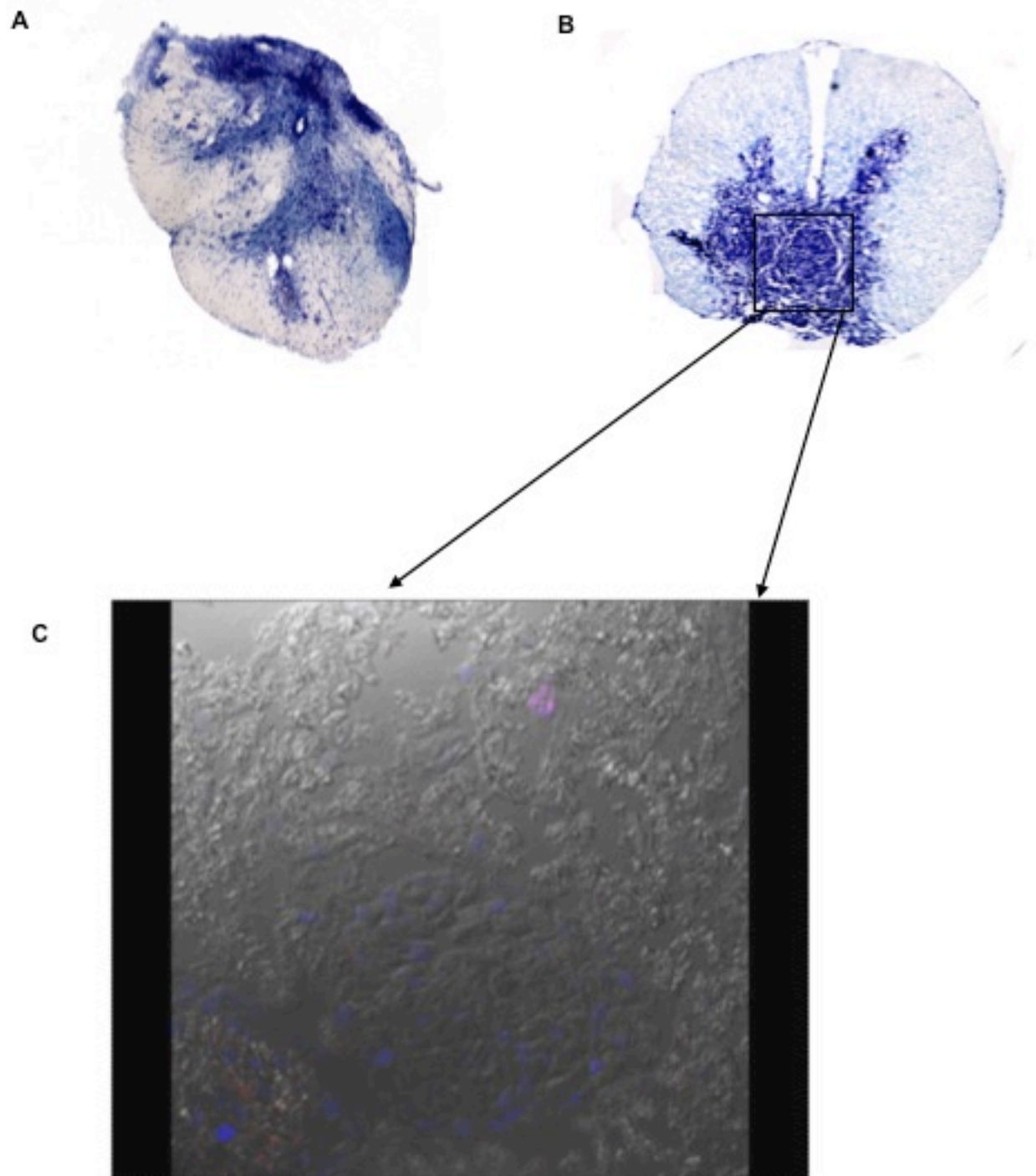
Nella figura 9 è percepibile come il funicolo non sia nient'altro che un insieme di PM-NPCs involuppate in una rete di processi positivi a NF (Neurofilamenti), palesando, quindi, che le cellule trapiantate possono costituire un microambiente favorevole alla neurogenerazione.

Osservando più caudalmente, a circa 1.5 mm dalla lesione, cioè ai margini della stessa, si può notare un discreto numero di PM-NPCs marcate con PKH26 presente all'interfaccia tra la parte sopravvissuta alla lesione e l'area distrutta (fig. 10). Un maggior ingrandimento di un riquadro dell'immagine, al confine tra l'area preservata e quella distrutta, mostra che molte cellule neuronali positive a MAP2, sono anche marcate da PKH26 (rosso): dunque, queste cellule si sono trasformate in neuroni, ricostruendo, seppur parzialmente, un vero e proprio neuropilo attraverso il midollo leso (fig. 11).

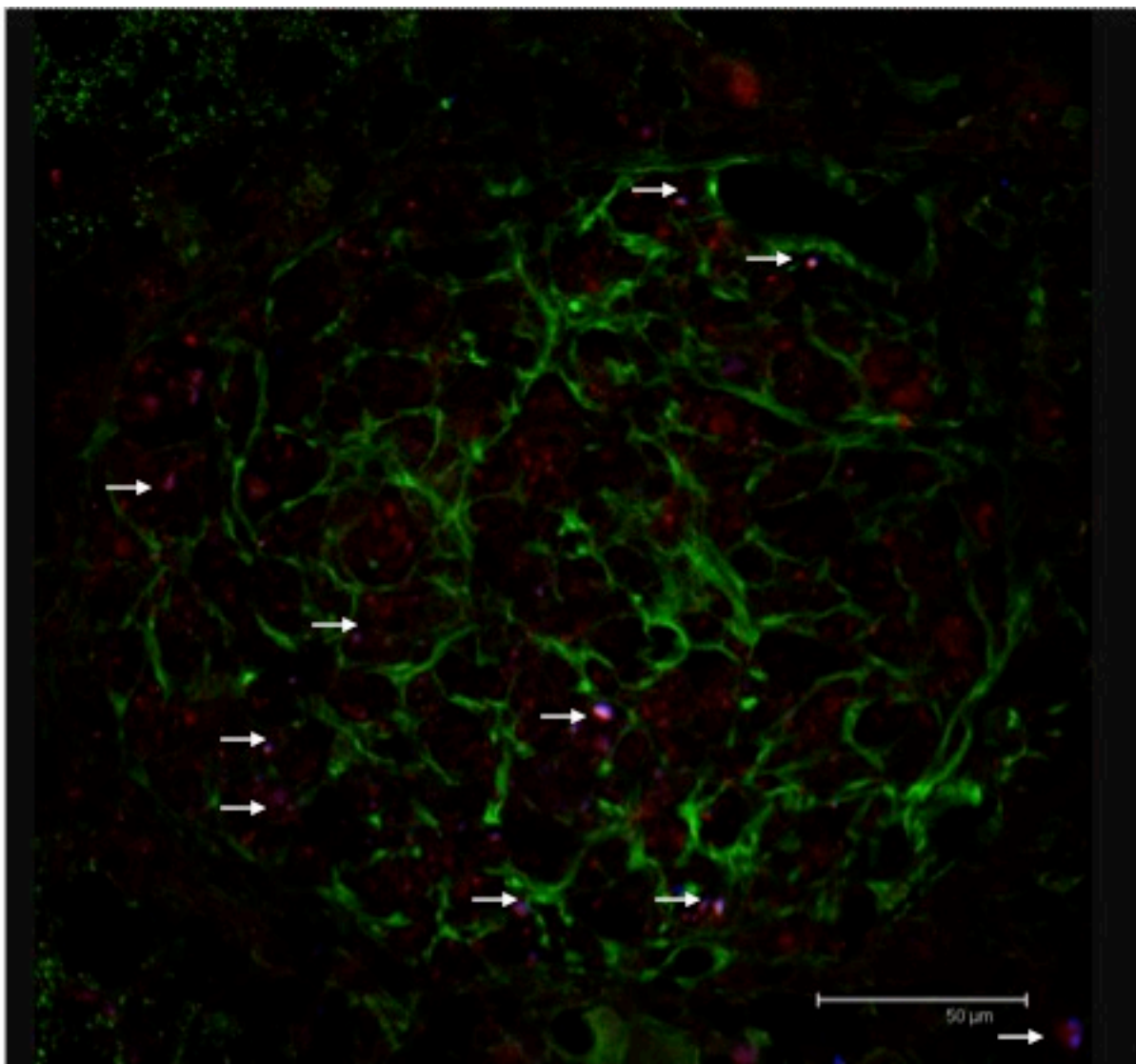
In conclusione, sembra che le PM-NPCs, somministrate per via endovenosa, raggiungano specificamente il sito di lesione, dove si differenziano in cellule neuronali.



**Fig. 7: Visualizzazione ex vivo delle PM-NPCs marcate con PKH26 mediante utilizzo di CCD camera. Le PM-NPCs sono accumulate (rosso) preferenzialmente nel sito di lesione.**

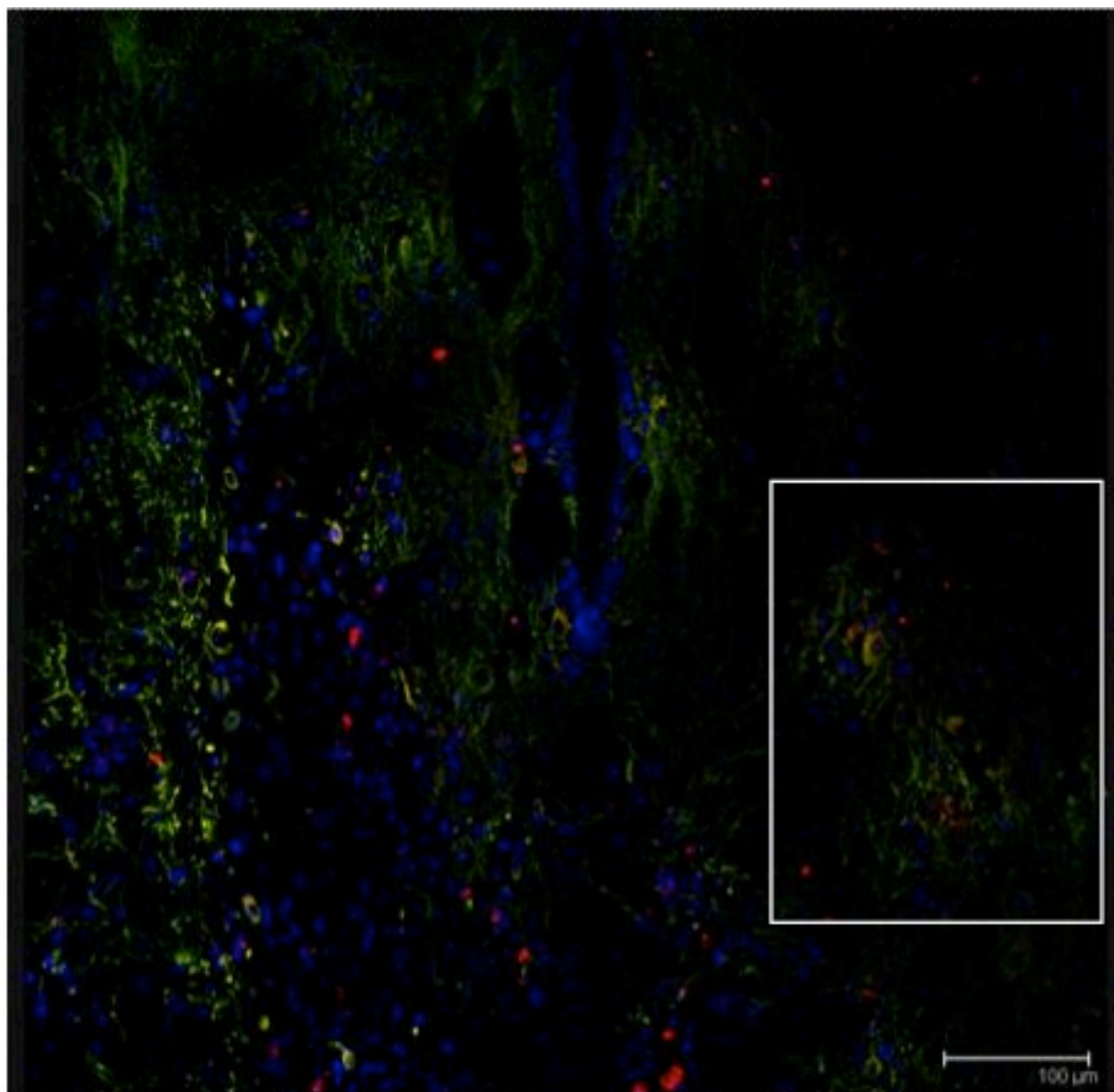


**Fig. 8:** Sezioni trasversali di midollo spinale dopo lesione traumatica e trattamento con PBS (A) o PM-NPCs (B) colorate con tionina.. L'immagine al microscopio confocale con ottica di interferenza (C) mostra la presenza in zona di lesione di numerose PM-NPCs marcate con Hoechst (blu), che formano un cordoncino cellulare.

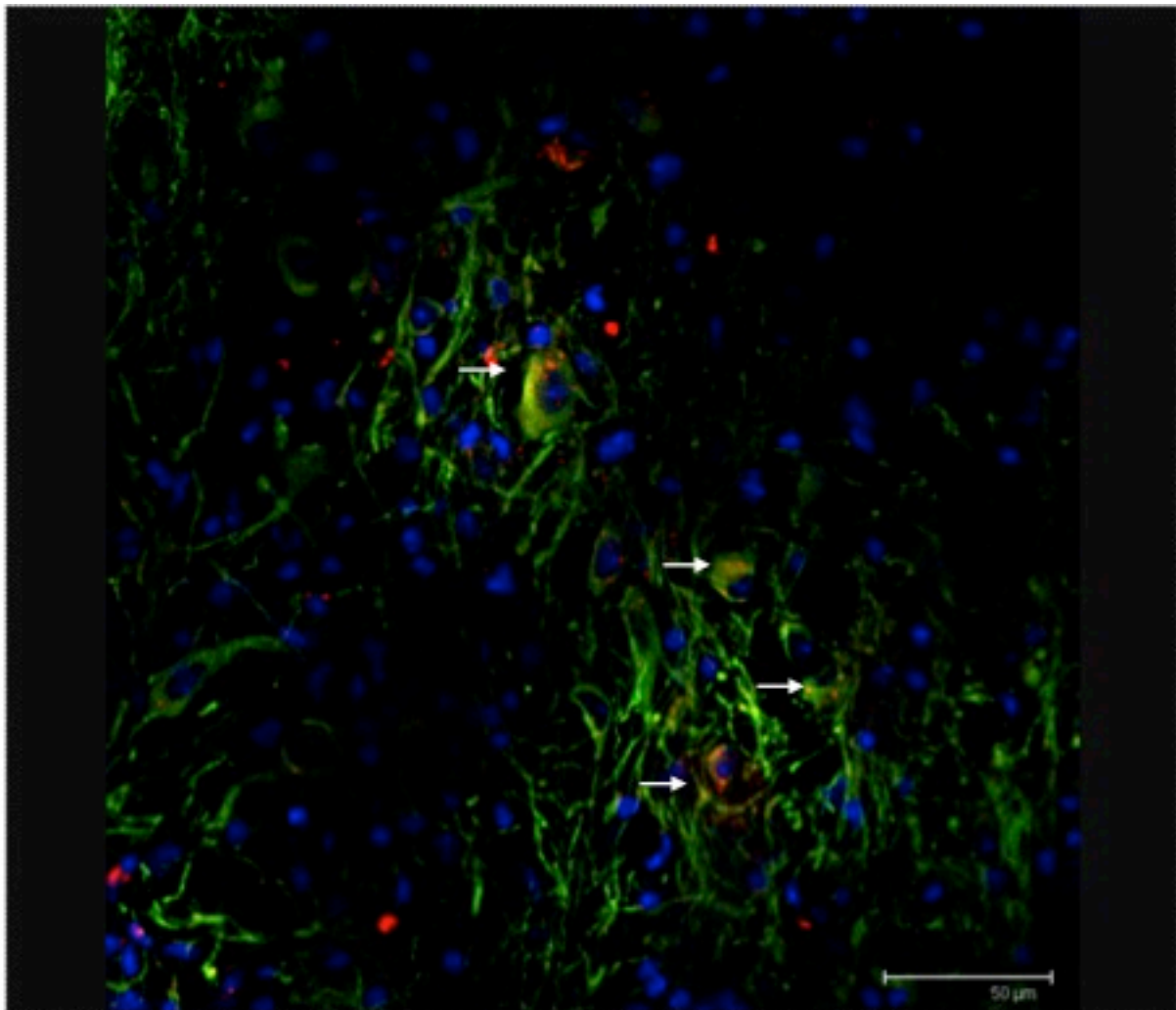


**Fig. 9: Dettaglio del funicolo creato dalle PM-NPCs nel midollo lesio. La marcatura per neurofilamenti (NF) (verde) mostra un'intensa rete neuritica con numerosi processi colinergici indicati dalla marcatura per ChAT (rosso). Le PM-NPCs sono marcate con Hoechst (blu); le frecce indicano co-localizzazione di segnale tra Hoechst e ChAT. Barra 50 µm**





**Fig. 10:** Sezione di midollo spinale lesionato e trattato con cellule PM-NPCs marcate con PKH26 (rosso). Le cellule trapiantate sono localizzate ai margini della lesione dove è presente una notevole marcatura per MAP2 (verde). I nuclei sono colorati con DAPI (bu). Il riquadro è ingrandito nella figura 6B. Barra 100  $\mu\text{m}$



**Fig. 11:** Ingrandimento della figura 19; le frecce indicano la co-localizzazione del segnale delle PM-NPCs marcate con PKH26 (rosso) con MAP2 (verde). Nuclei colorati con DAPI (blu). Barra 50  $\mu\text{m}$



## 5.4 Effetto neuroprotettivo delle PM-NPCs

Il miglior recupero motorio degli animali trattati con PM-NPCs in seguito a lesione midollare è dunque indice di una maggior preservazione tissutale che verosimilmente si esplica sia a livello delle vie motorie (sostanza bianca) che a livello dei corpi cellulari dei motoneuroni delle corna ventrali (sostanza grigia).

Siamo quindi andati a valutare in entrambi i casi l'effetto neuroprotettivo delle PM-NPCs: a livello della sostanza bianca, abbiamo dunque, quantificato la preservazione della mielina che è un indicatore di quanto gli assoni siano rimasti mielinizzati e quindi funzionali; sia nel sito di lesione che a 0,5 mm caudali (Fig. 12), nelle regioni intermedia laterale e ventrale. Entrambe queste aree sono molto importanti dal punto di vista funzionale, poiché qui discendono rispettivamente le vie rubro-spinali e le vie reticolo-spinali, che sono due importanti pathway motori in grado di vicariare le funzioni delle vie cortico-spinali che decorrono invece a livello della sostanza bianca dorsale che in questo tipo di lesione viene quasi completamente distrutta; soprattutto il tratto reticolo-spinale risulta essere molto importante nel recupero funzionale degli animali, in quanto è responsabile del coordinamento motorio e del posizionamento della zampa del topo.

Recentemente, in una serie di pubblicazioni (Gorio et al, 2007; Bottai et al, 2010), abbiamo certificato come la colorazione con Fluoromyelin dia un'immagine quantificabile delle vie mieliniche corrispondente a quanto può essere calcolato con sezioni semifini colorate con sostanze specifiche per la mielina. Uno dei vantaggi del Fluoromyelin è la possibilità di quantificare l'intensità e la densità della mielina nei siti d'interesse utilizzando il microscopio confocale.

Come previsto, la lesione provoca una perdita mielinica ingente in entrambe le aree analizzate di circa il 50% rispetto ai controlli, sia a livello del sito di lesione che 0.5mm caudalmente ad esso (fig. 13). Tale privazione è attenuata in maniera significativa dal trattamento con le PM-NPCs.

E' stato valutato l'effetto neuroprotettivo delle PM-NPCs anche a livello della sostanza grigia; andando a quantificare la ricostituzione di due importanti vie monoaminergiche coinvolte nei processi di locomozione degli animali: le prime marcate da tirosina idrossilasi (TH), quindi catecolaminergiche (Barbeau et al,

1991; Gabbay et al, 2004; Jordan MI et al, 2008) , le seconde da serotonina (5-HT), cioè serotoninergiche (Feraboli-Lohnerr et al, 1999; Liu et al, 2005; Peralstain et al, 2005). La figura 14 rivela che le aree invase dalle PM-NPCs sono occupate da un ricco trabecolato di assoni positivi per TH. La quantificazione di tale fenomeno è riportata in figura 15. La TH è stata quantificata 1 mm caudale alla lesione, nelle regioni delle corna ventrali (VH) e intermedia laterale (IML): dal grafico emerge che la lesione determina una massiccia perdita di fibre TH positive, che viene significativamente recuperata dal trapianto con PM-NPCs, suggerendo che queste cellule favoriscono l'evento rigenerativo.

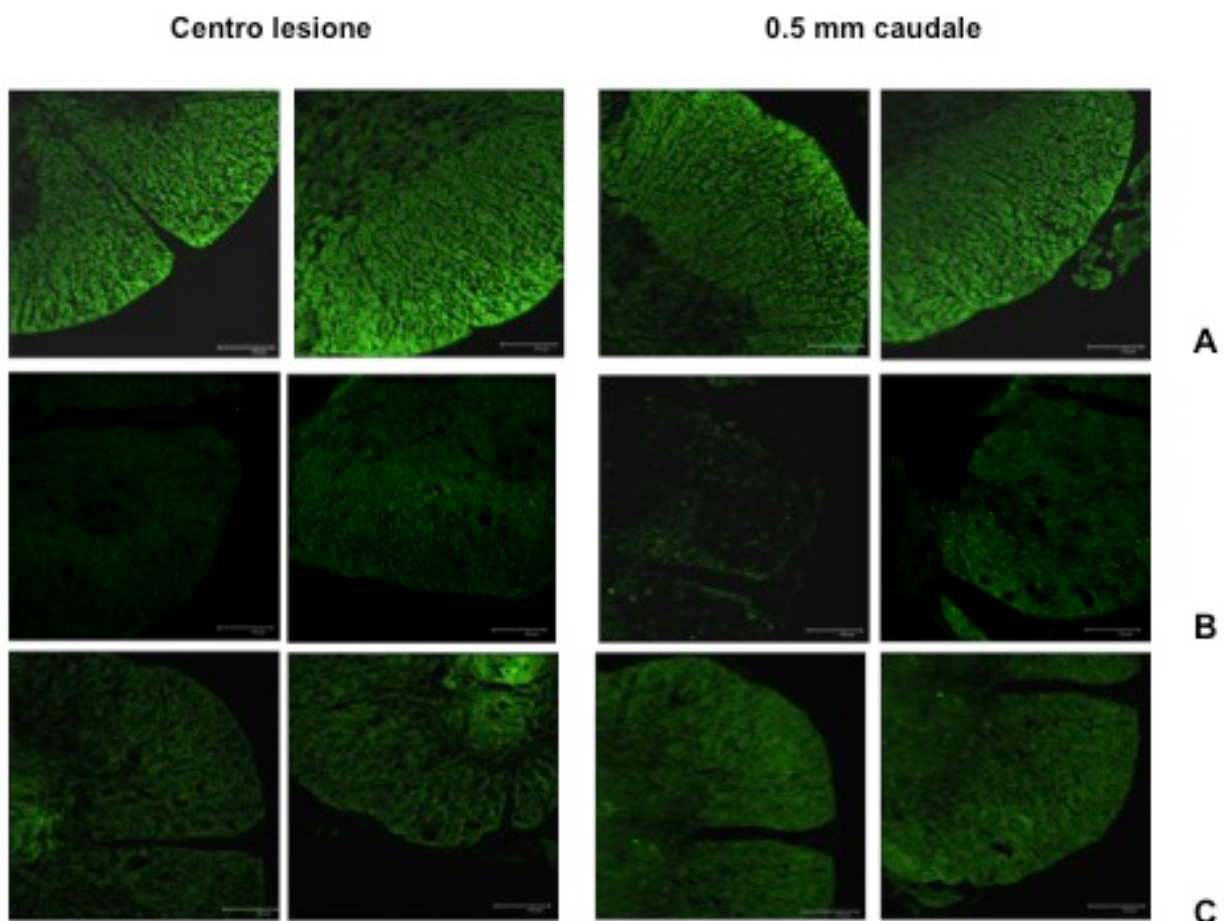
Risultati paragonabili, se non addirittura più significativi, sono stati ottenuti studiando 5-HT: la figura 16 indica che la lesione provoca una ridotta presenza di fibre serotoninergiche sia a livello dorsale che intermedio laterale e ventrale. Il trattamento con PM-NPCs stimola un recupero significativo dell'innervazione serotoninergica a tutti i livelli.

La quantificazione delle fibre 5-HT positive dimostra che la contusione provoca una perdita di circa l'80% delle suddette strutture nervose in tutti e tre i distretti analizzati. La somministrazione delle PM-NPCs determina un recupero superiore al 50% nella zona DH e IML e, addirittura, dell'80% nella VH (fig. 17).

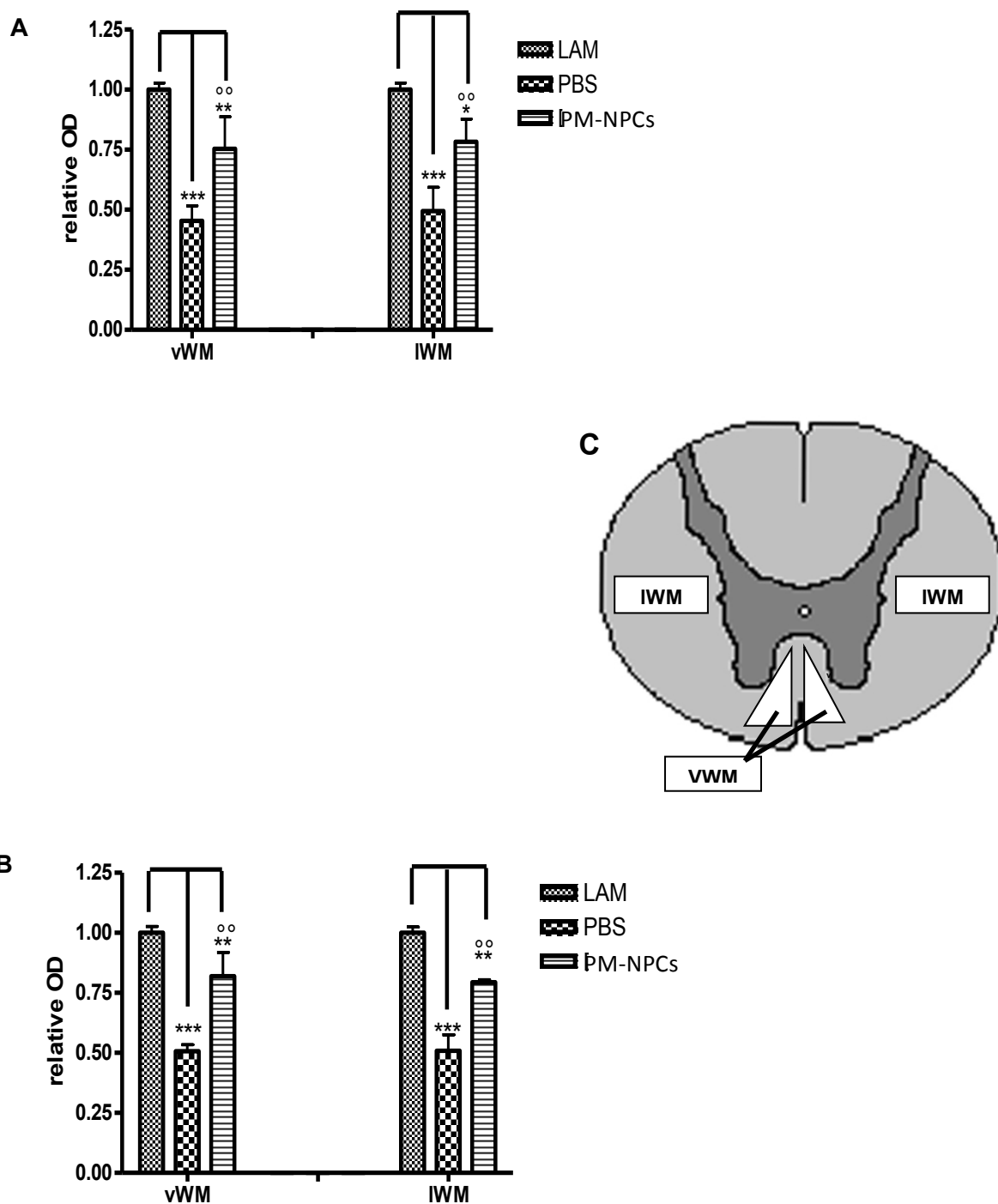
E' stata valutata a 30 giorni dalla lesione anche la neuroprotezione della sostanza grigia a livello delle corna ventrali nel sito di lesione ed ad 1 mm di distanza sia in posizione caudale sia rostrale. Le micrografie in figura 18 evidenziano che gli animali trattati con PM-NPCs presentano una maggior quantità di tessuto nervoso come evidenziato dalla positività per MAP2 e dalla sua relativa quantificazione (fig. 19). Il danno nell'epicentro di lesione è ovviamente più importante, con la perdita massiccia della sostanza grigia, che però è molto elevata anche ad 1 mm rostralmente e caudalmente. L'effetto riparatorio delle PM-NPCs risulta quindi essere molto evidente.

Un'ulteriore valutazione della preservazione del tessuto neurale nel sito di lesione e della promozione delle rigenerazione nervosa in seguito alla somministrazione di PM-NPCs è stata effettuata utilizzando il Fluororuby, un tracciante neuronale anterogrado fluorescente, che è stato iniettato nel tratto cortico-spinale a livello cervicale (C3-C5) a 30 giorni dalla lesione in 5 animali trattati con PBS o con PM-

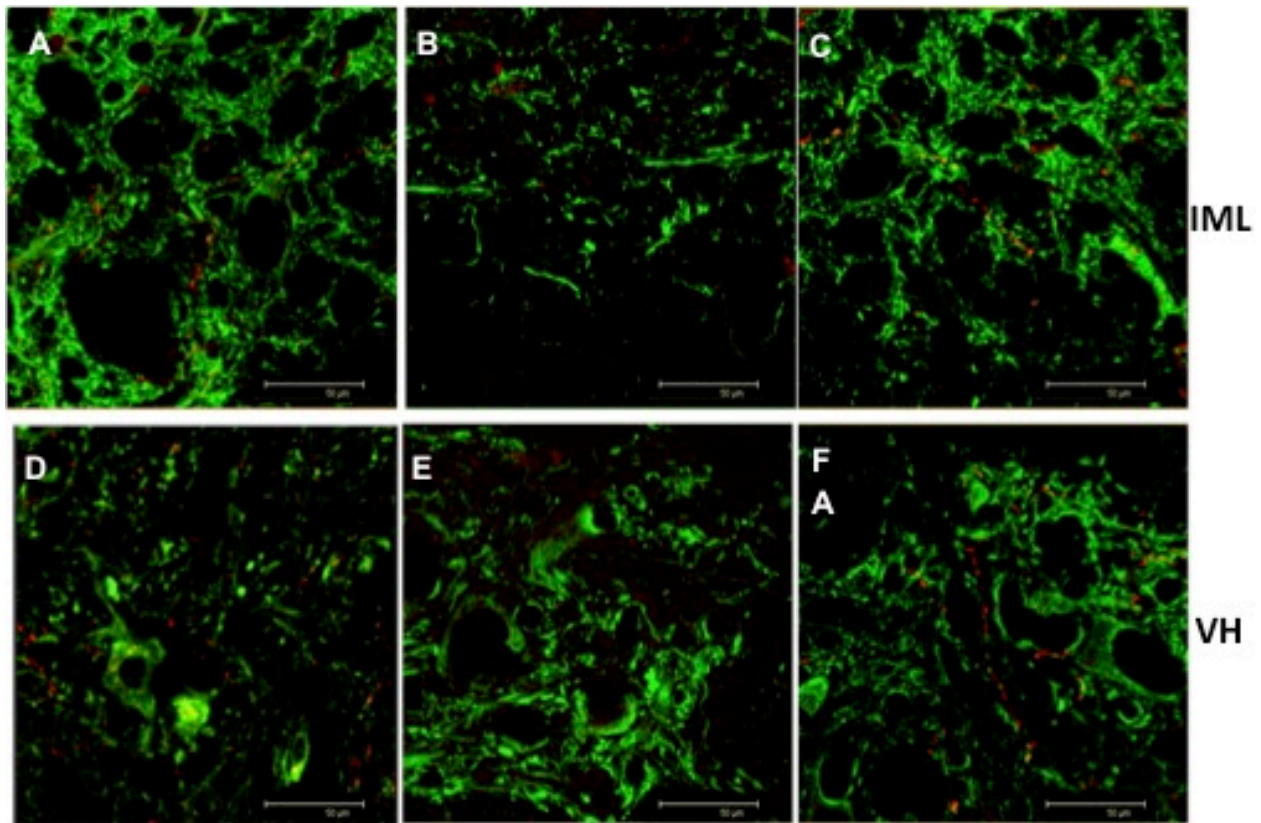
NPCs. Gli animali sono stati sacrificati 5 giorni dopo l'iniezione di fluorouruby e il taglio longitudinale dei midolli ci evidenzia la scarsa presenza del marcatore fluorescente al di sotto del sito di lesione nell'animale che è stato trattato con PBS, mentre negli animali trattati con PM-NPCs si rileva una quantità di fluorouruby decisamente superiore nel tessuto midollare in posizione caudale alla lesione (Fig.20). Poiché la via cortico-spinale è stata totalmente distrutta a livello della lesione, il passaggio del tracciante attraverso essa per raggiungere le porzioni midollari più caudali, può voler significare che tali vie sono rigenerate ed hanno passato il sito di lesione attraverso le aree preservate dalle PM-NPCs. Le PM-NPCs hanno dunque la capacità di creare un substrato idoneo alla rigenerazione nervosa attraverso il midollo lesio.



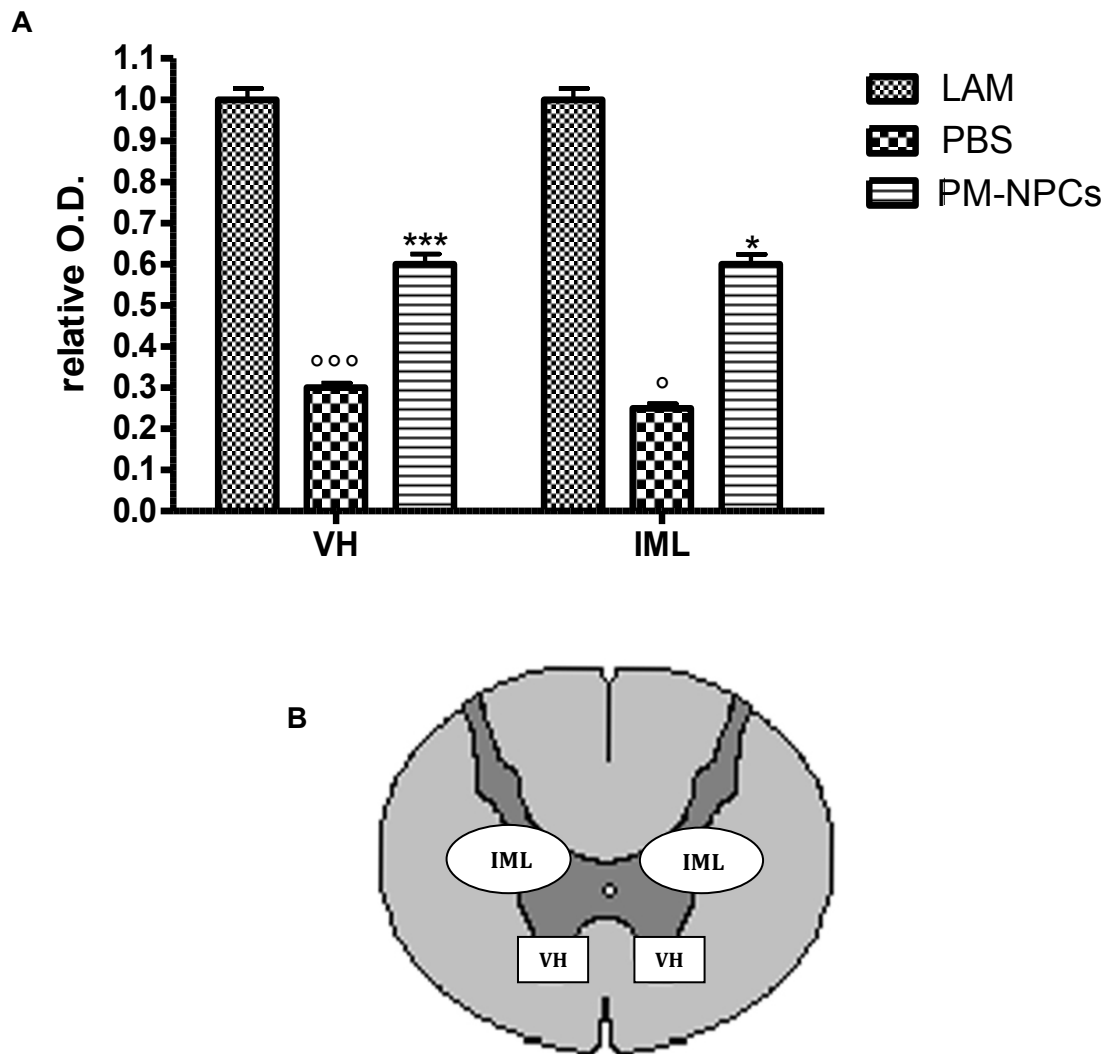
**Fig 12: Preservazione della sostanza bianca mediante colorazione con Fluoromyelin: laminectomizzati (riga A), lesionati e trattati con PBS (riga B) o lesionati e trapiantati con PM-NPCs (riga C). Barra 150  $\mu$ m**



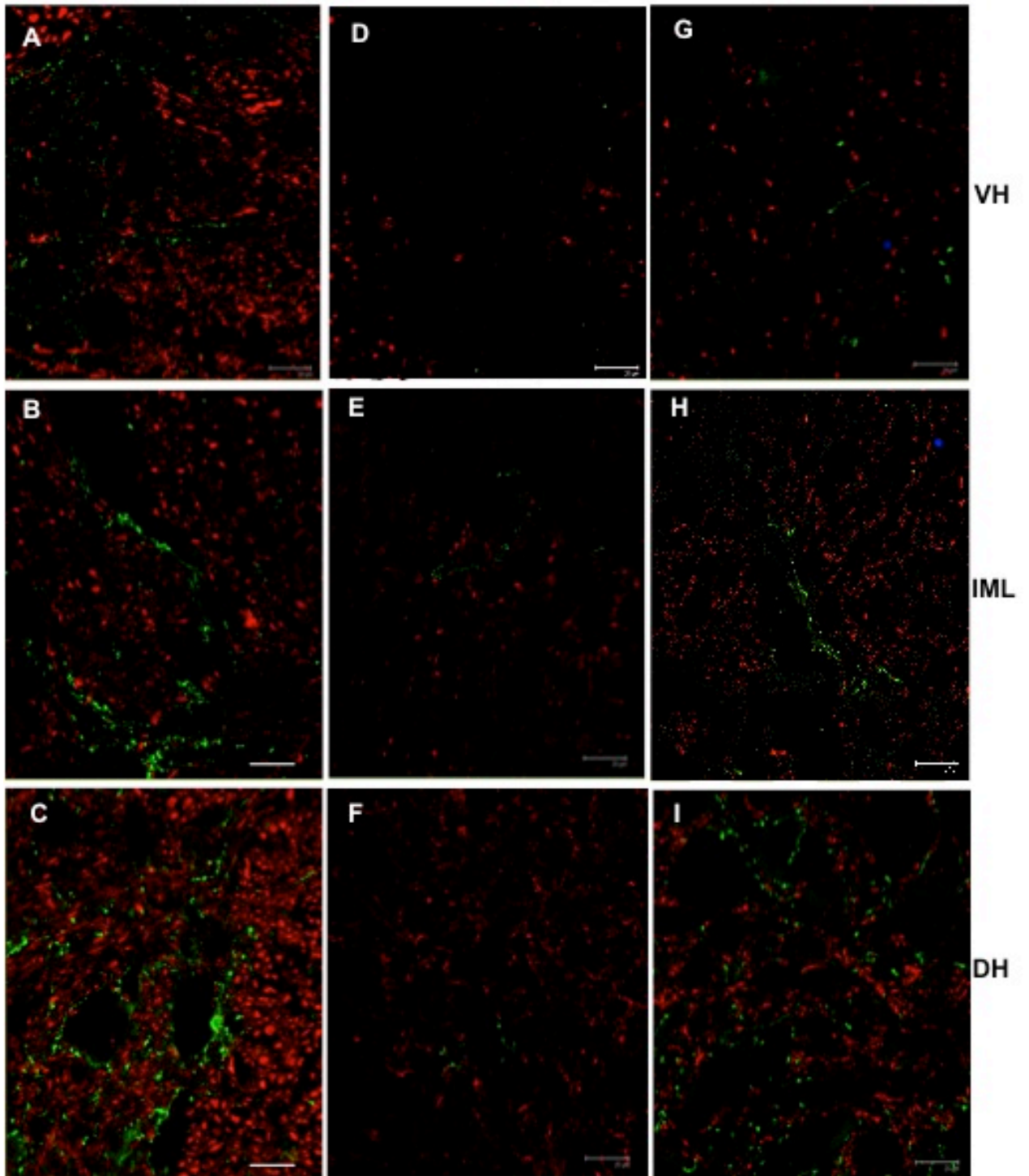
**Fig. 13: Quantificazione della preservazione della sostanza bianca nei tre gruppi sperimentali a differenti livelli: nel sito di lesione (A) e caudalmente a 0,5 mm (B). Schema delle zone midollari considerate nella quantificazione della sostanza bianca (C). (Mean  $\pm$  S.E.M:  $^{\circ}$ P<0.01 vs PBS; \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs LAM)**



**Fig. 14:** Marcatura per Tirosina idrossilasi TH (rosso) e TUJ 1 (verde) nei tre gruppi: controllo laminectomizzato (A, D), PBS (B, E) e trattato con PM-NPCs (E, F). Le reazioni sono state fatte su tessuto 1 mm caudale alla lesione e l'analisi riguarda la zona ventrale (VH) e laterale intermedia (IML). Barra 20 μm

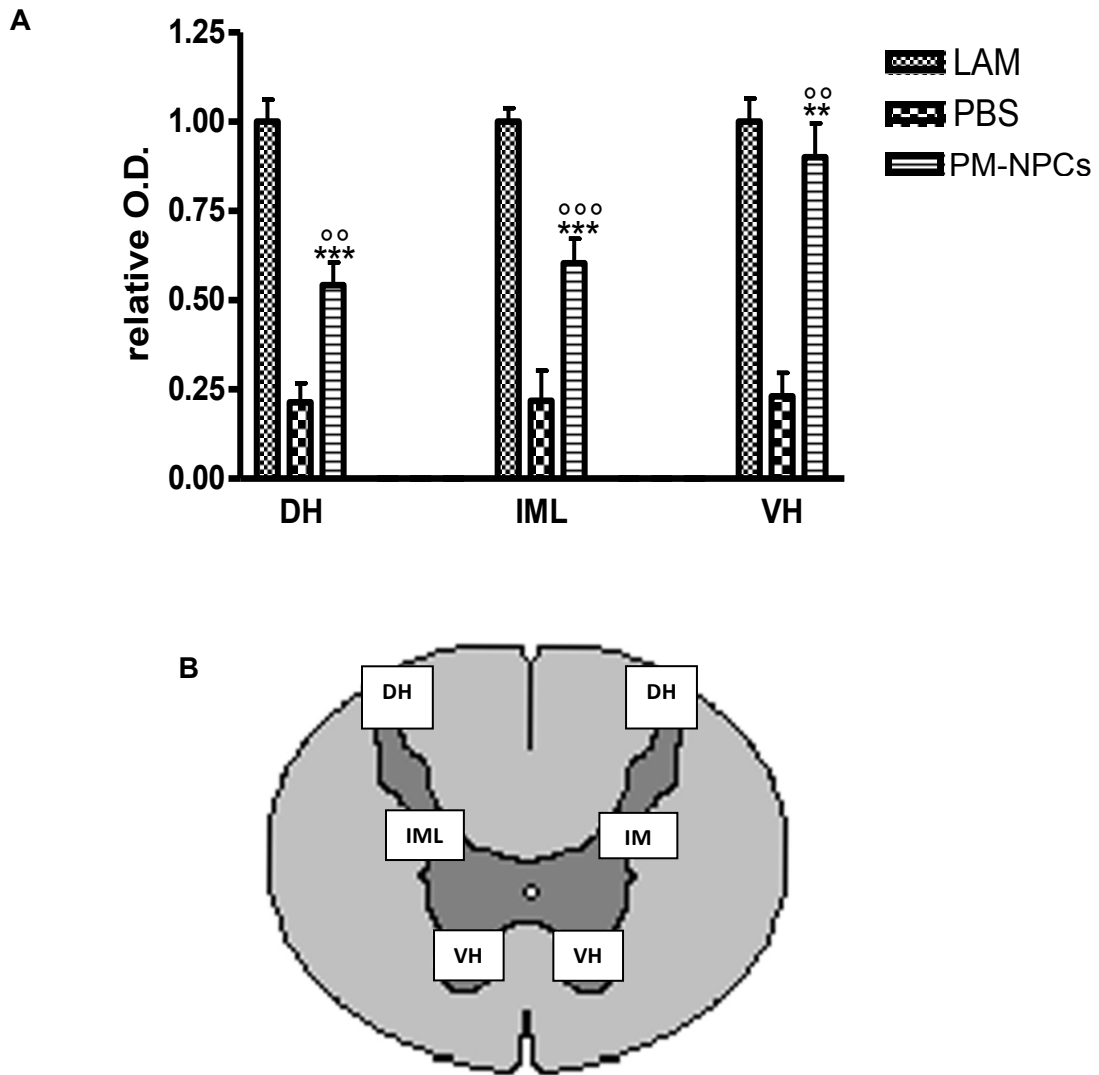


**Fig. 15:** Quantificazione delle fibre positive per TH nelle zone ventrale e intermedia laterale nei tre gruppi sperimentali ad 1 mm caudale all'epicentro di lesione (A). Schema delle zone midollari considerate nella quantificazione (B). (Mean  $\pm$  S.E.M: \*P<0.05, \*\*\*P<0.01 vs PBS; °P<0.05, °°°P<0.001 vs LAM)



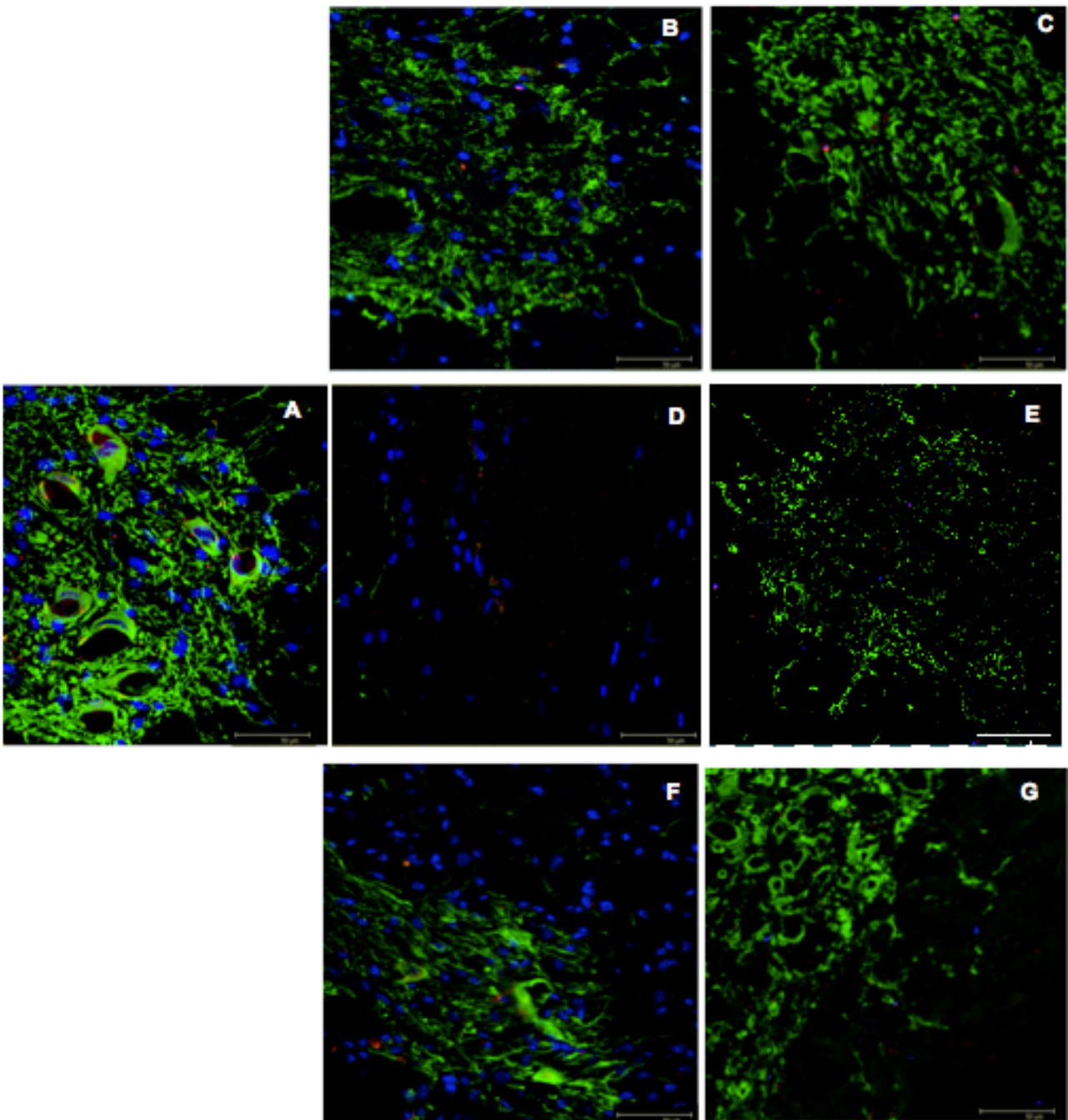
**Fig. 16: Marcatura per serotonina 5-HT (verde) e TUJ 1 (rossa) nei tre gruppi: controllo laminectomizzato (A, B, C), PBS (D, E, F) e trattato con PM-NPCs (G, H, I). Le reazioni sono state fatte su tessuto 1 mm caudale alla lesione e l'analisi riguarda la zona ventrale (VH), laterale intermedia (IML) e dorsale (DH). 20  $\mu$ m**





**Fig. 17:** Quantificazione delle fibre 5-HT positive nelle zone ventrale, intermedia laterale e dorsale ad 1 mm caudale all'epicentro di lesione nei tre gruppi sperimentali. Qui sotto, uno schema delle zone midollari considerate nella quantificazione. (Mean  $\pm$  S.E.M: °°P<0.01, °°°P<0.001 vs PBS; \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs LAM)





**Fig. 18: Marcatura per MAP2 (verde) e ChAT (rossa) a livello delle corna ventrali (VH) in seguito a laminectomia (A) o lesione e trattamento con PBS (B, D, F) o con cellule staminali (C, E, G). La marcatura è stata effettuata 1mm rostralmente alla lesione (B, C); in sede di lesione (D, E) e 1mm caudalmente alla lesione (F, G) I nuclei sono colorati con DAPI (A, B, D, E) e le PM-NPCs con Hoechst (C, E, G) (blu). Barra 50 μm**

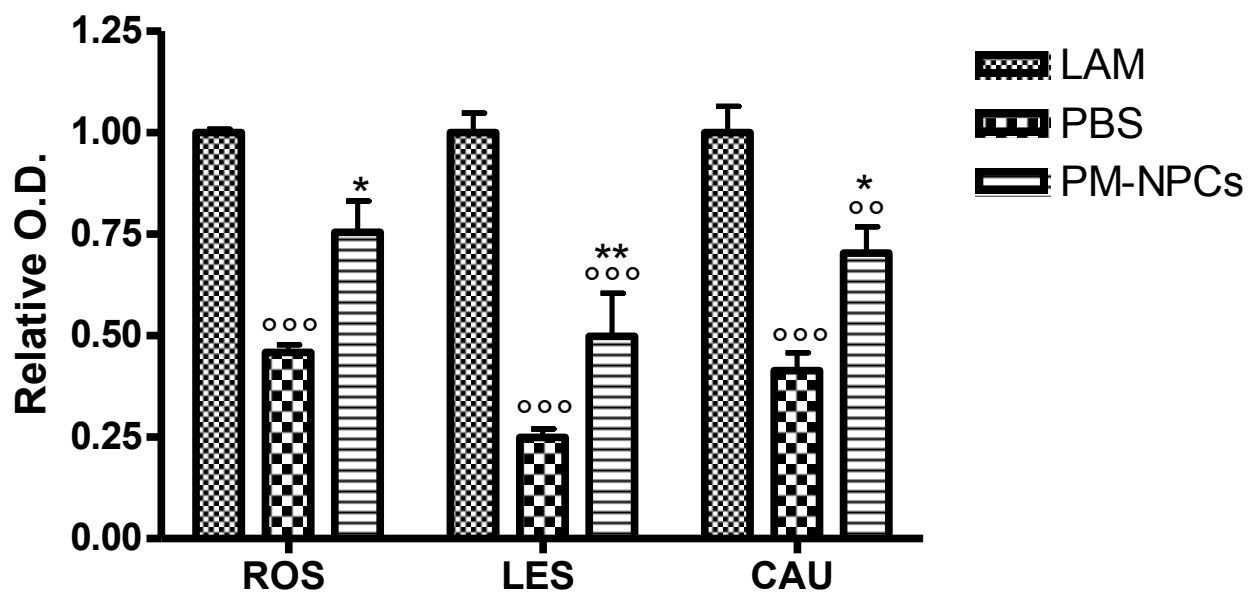


Fig. 19: Quantificazione dello sparing della sostanza neurale nelle corna ventrali a livello rostrale (ROS), caudale (CAU) e nell'epicentro della lesione spinale (LES) nei tre gruppi sperimentali. (Mean  $\pm$  S.E.M: <sup>ooo</sup>P<0.01 vs LAM; <sup>\*</sup>P<0.05, <sup>\*\*</sup>P<0.01 vs PBS)

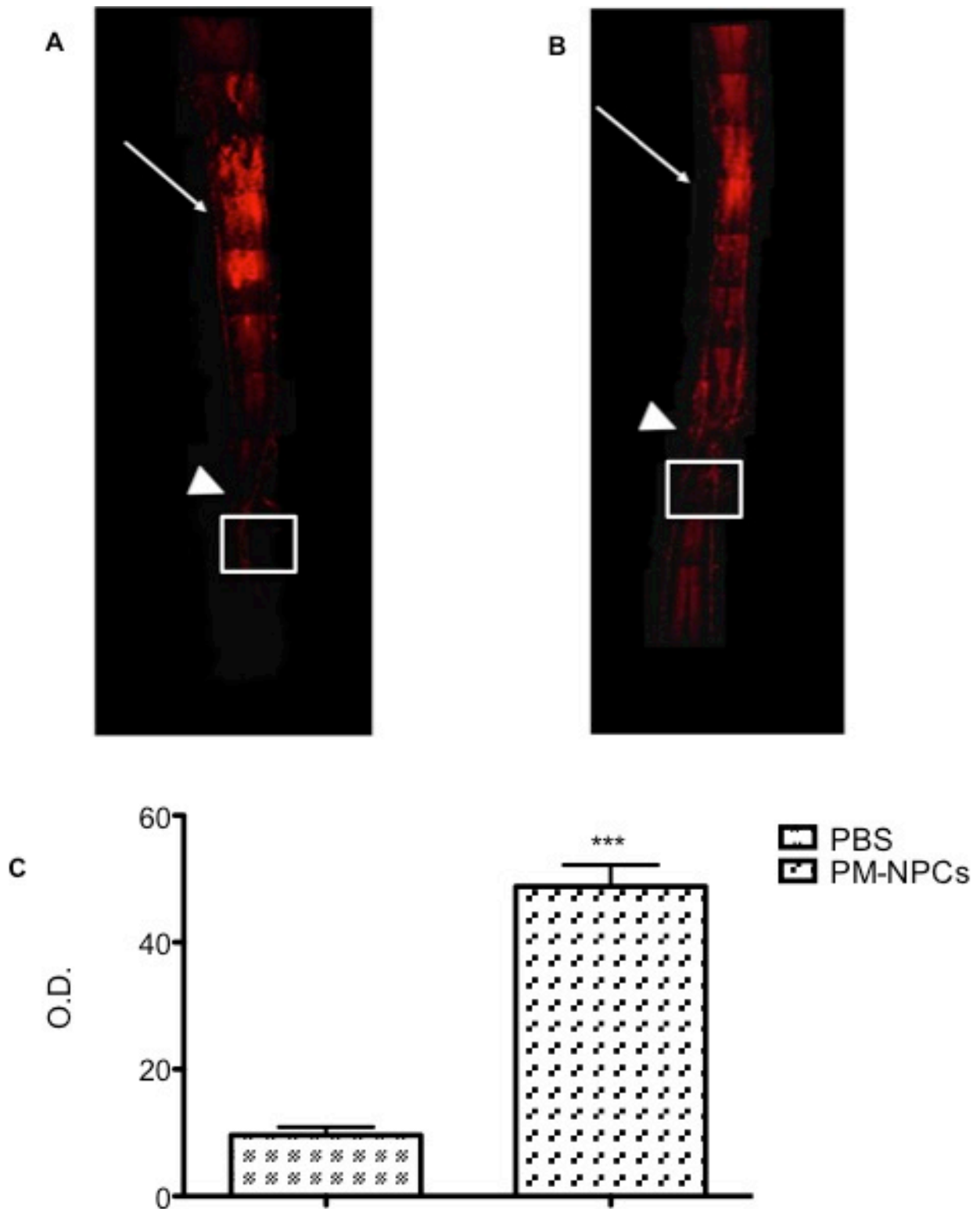


Fig. 20: Sezioni longitudinali dopo iniezione con fluororuby di animali trattati con PBS (A) e PM-NPCs (B). Sono indicati il sito di iniezione del fluororuby (freccia) e il sito di lesione (punta di freccia). Il riquadro bianco indica la zona in cui è stata effettuata la quantificazione (C). (Mean  $\pm$  S.E.M. \*\*\* P<0.001 vs PBS)

## 5.5 Proprietà anti-infiammatorie delle PM-NPCs

Le cellule PM-NPCs hanno una potente azione anti-infiammatoria ed essa è stata valutata con diversi approcci: quantificando la reattività gliale, monitorando l'invasione dell'area lesa midollare da parte di neutrofili e macrofagi e studiando la produzione localizzata di citochine infiammatorie e di fattori ad azione neurotrofica coinvolti in questo processo.

E' interessante notare come le nostre cellule nel sito leso antagonizzino la reazione gliale: in figura 21 è mostrata l'immunofluorescenza su sezioni longitudinali di midollo leso a livello dell'epicentro. Come è evidente, l'astroglia reattiva, indicata da positività per GFAP, si concentra abbondantemente nelle aree in cui le PM-NPCs sono assenti. Viceversa, dove le cellule trapiantate si accumulano, trasformandosi probabilmente in neuroni, la reazione gliotica è marcatamente contrastata (fig. 21) come ci mostra anche la quantificazione effettuata (fig.22)

La figura 23 mostra l'abbondante presenza di neutrofili nelle zone perilesione 24 h dopo la lesione. Questo è ben riportato in letteratura: i neutrofili invadono il midollo lesionato nelle prime ore dopo il trauma, raggiungono il picco a 24 h e diminuiscono a 7 giorni. In questo studio si è scelto di valutare l'infiltrato neutrofilo a 24 h perché questo è l'apice della loro attività.

La quantificazione effettuata (fig. 24) mostra che il trattamento con PM-NPCs riduce significativamente l'infiltrazione da parte dei neutrofili dell'area perilesione.

I macrofagi penetrano nel midollo leso arrivando a valori più significativi verso il settimo- decimo giorno. Nella figura 25 si notano cellule ED-1 positive (macrofagi) raccogliersi nella regione dorsale e ventrale dei topi trattati con PBS; al contrario tale accumulo è sensibilmente ridotto negli animali trattati con PM-NPCs.

La quantificazione delle cellule ED-1 positive mediante microscopio confocale è riportata in figura 26 e dimostra che a livello della lesione e in zona perilesione vi è una forte riduzione nell'infiltrazione di macrofagi determinato dalle PM-NPCs.

In conclusione, le cellule PM-NPCs migrate nel midollo hanno una potente azione antinfiammatoria verso componenti cellulari.

Inoltre, le PM-NPCs influiscono sulla produzione di citochine pro e anti-infiammatorie nel sito di lesione sia in fase acuta (48 ore) che in fase subacuta (1

settimana) del danno. Ad esempio l'IL-6 è tipicamente aumentata nelle prime ore dopo il trauma e tale incremento è antagonizzato dalle PM-NPCs (fig. 27).

A 7 giorni dalla lesione invece, il trattamento con PM-NPCs ha l'effetto contrario; il livello di IL-6 nei topi trattati con le cellule risulta infatti essere maggiore rispetto ai controlli (fig. 28).

Un dato simile è stato ottenuto anche per quanto riguarda l'espressione del  $TNF\alpha$ , in cui il trattamento con PM-NPCs ne riduce l'espressione in fase acuta (fig. 29), mentre a 7 giorni i topi trattati con le cellule staminali mostrano valori nell'espressione di questa citochina superiori a quelli rilevati negli animali controllo (fig. 30).

Diversamente, MIP2 che è la citochina responsabile della chemioattrazione dei neutrofili, la cui espressione risulta aumentata in seguito al trauma nei topi trattati con PBS, sia a 48 ore che a 7 giorni; viene significativamente ridotta in seguito al trapianto delle PM-NPCs in entrambi i tempi post-lesione analizzati (fig. 31-32). Questo dato correla significativamente con la ridotta invasione neutrofilica del midollo lesa che si osserva dopo il trattamento con PM-NPCs e che è stata riscontrata mediante l'analisi morfologica (fig. 23-24).

L'espressione di LIF, un potente agente neurotrofico, risulta essere più elevata negli animali trattati con PBS rispetto a quelli trattati con PM-NPCs nelle prime 48 ore dopo la lesione (fig. 33); al contrario invece, a 7 giorni dal danno i livelli di espressione di LIF sono diminuiti sia nei topi trattati con PBS che in quelli trattati con PM-NPCs, ma il trattamento con le cellule ne mantiene i livelli significativamente più elevati (fig. 34).

L'espressione di BDNF, un fattore neurotrofico coinvolto con l'NGF nella reazione infiammatoria, aumenta in maniera significativa in seguito alla lesione negli animali trattati con PM-NPCs rispetto a quelli trattati con PBS; che invece hanno valori molto simili a quelli riscontrati nei controlli non lesionati (fig. 35). Ad una settimana dalla lesione invece, le espressioni di BDNF nei 4 gruppi sperimentali hanno valori paragonabili tra loro (fig. 36).

L'espressione dell'NGF, aumenta rapidamente dopo la lesione in entrambi i tipi di trattamenti senza differenze significative e a 48 ore i suoi livelli sono di 10 volte superiori ai controlli non lesionati (fig. 37). L'espressione misurata a una settimana

dal danno, mostra che negli animali lesi e trattati con PBS l'espressione della citochina si riduce fino al valore dei controlli non lesionati; mentre negli animali trattati con PM-NPCs il valore dell'espressione per quanto si riduca anch'essa si mantiene significativamente maggiore rispetto al trattamento con PBS (fig. 38).

In conclusione, l'azione delle PM-NPCs sulle citochine infiammatorie è complessa e differenziata, abbattendo nelle ore precoci l'azione di citochine importanti, come IL-6 e  $TNF\alpha$ , e per tutto il periodo di osservazione l'espressione di MIP2. Mentre a livello dei fattori neurotrofici esse promuovono un mantenimento a livelli più elevati molecole come LIF e di NGF anche a 7 giorni dalla lesione.

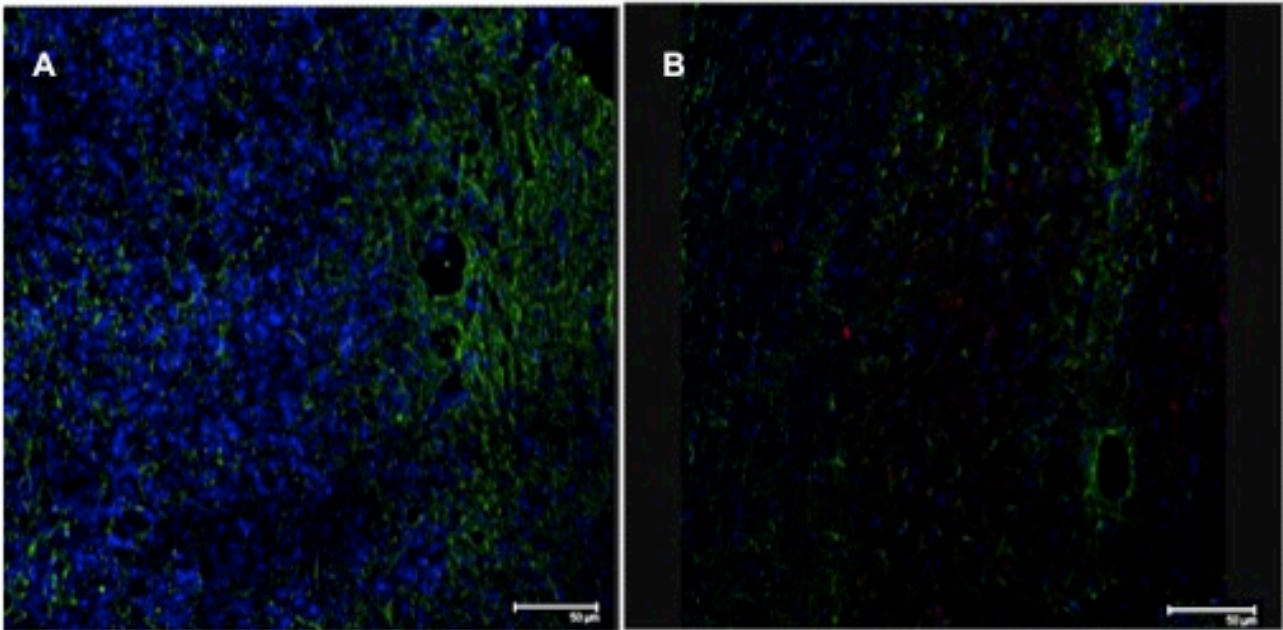


Fig. 21: Gliosi reattiva post lesione: La reattività gliale in seguito a lesione è mostrata dalla colorazione per GFAP (verde) sia nel topo trattato con PBS (A) che in quello trattato con le cellule (PKH26) (rosso). Nuclei colorati con DAPI (blu). Barra 50 µm

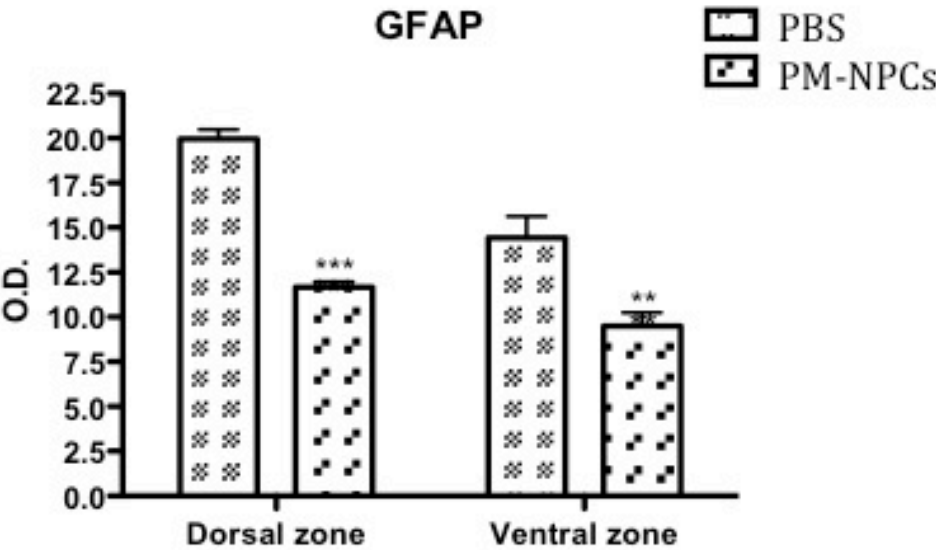


Fig. 22 Quantificazione della gliosi reattiva nella sede della lesione nel topo trattato con PBS e trattato con PM-NPCs. (Mean ± S.E.M: \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001 vs PBS)



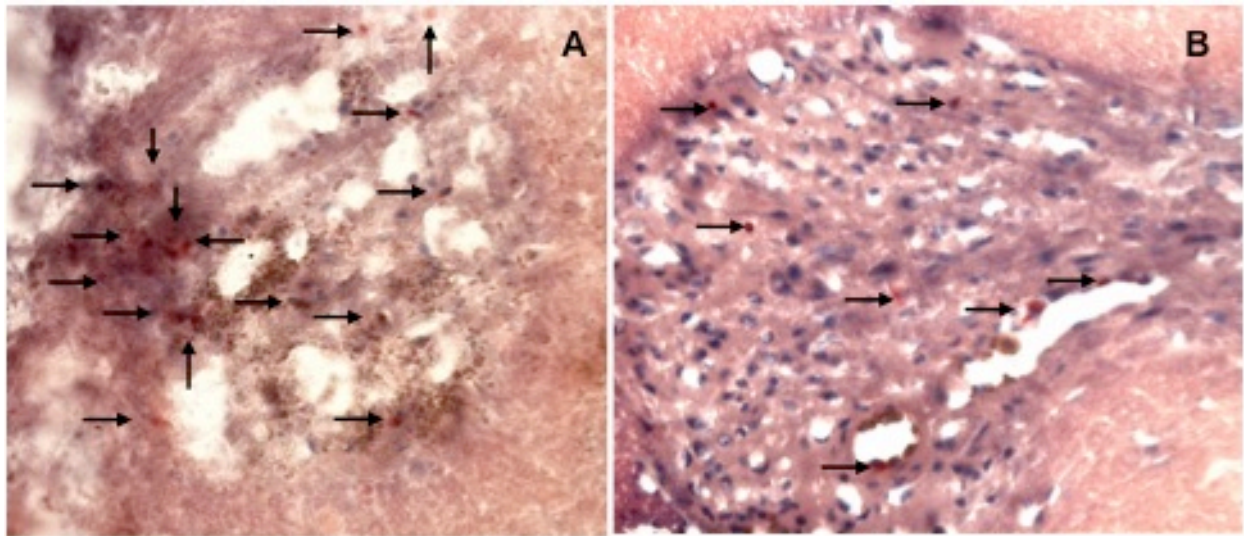


Fig. 23: Particolare delle sezioni istologiche del midollo spinale lesionato e trattato con PBS (A) e lesionato e trattato con PM-NPCs (B). I neutrofilii infiltranti sono segnalati dalle frecce.

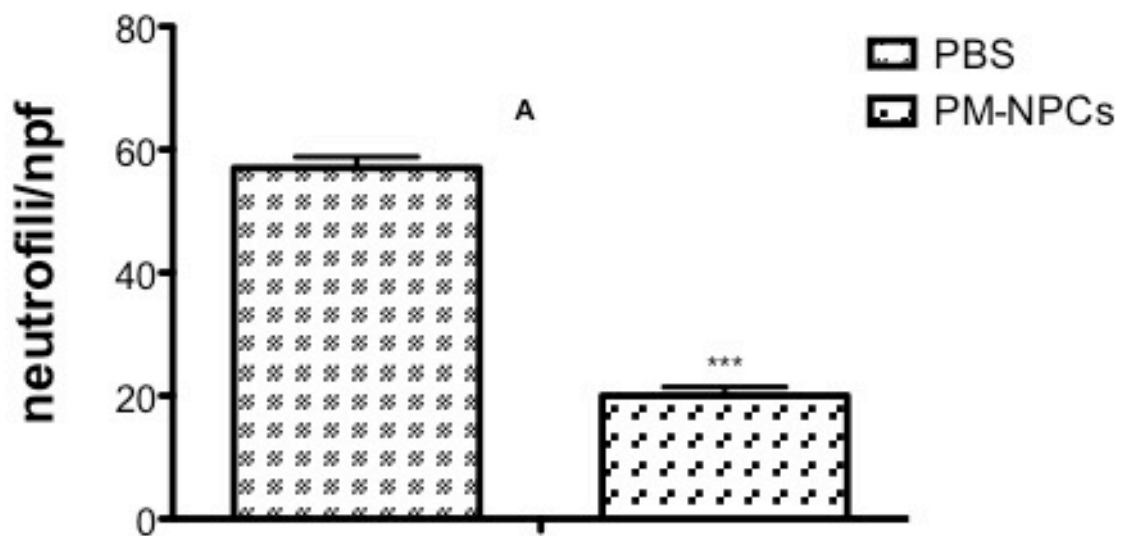
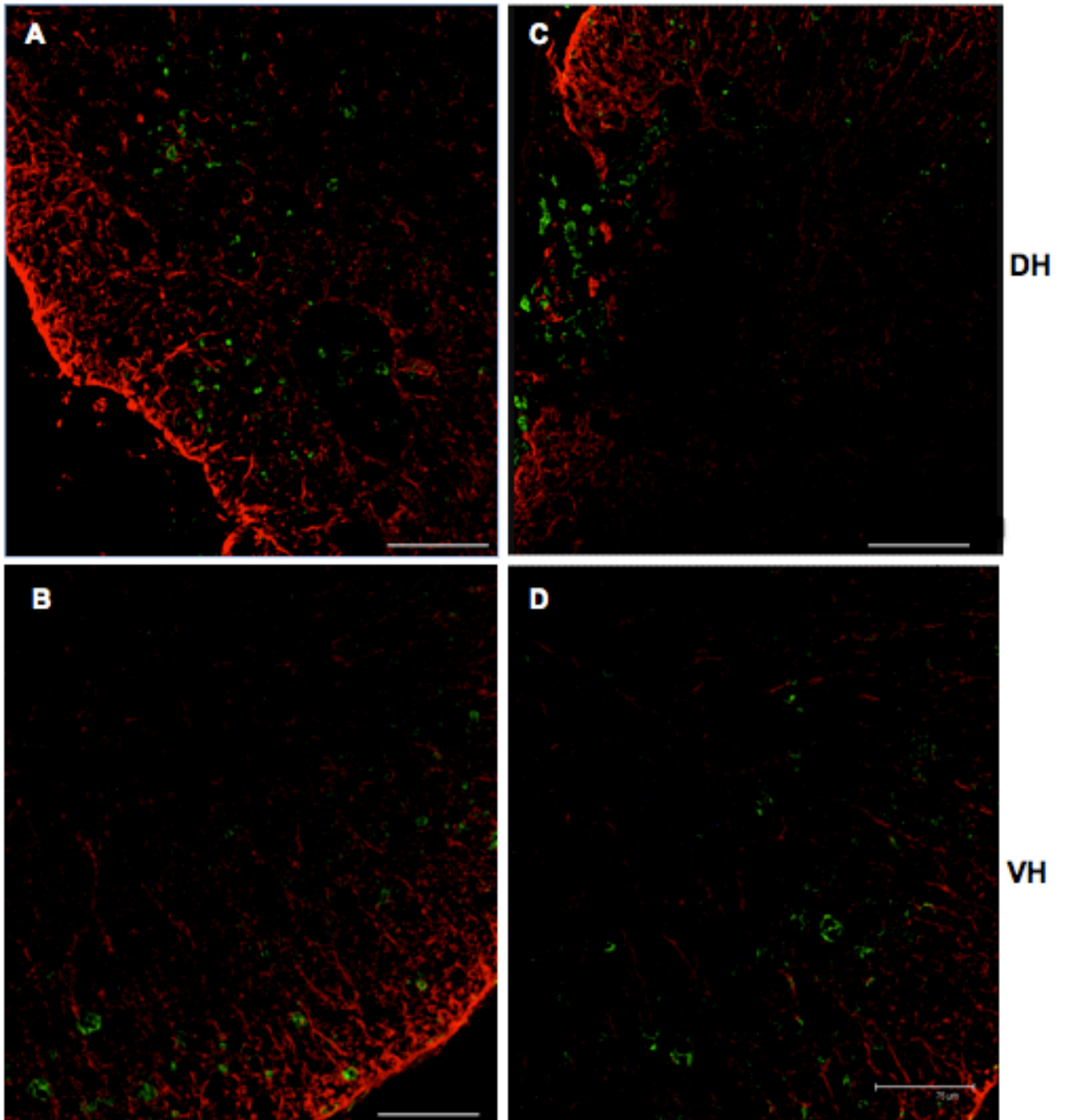


Fig. 24: Quantificazione dell'infiltrazione di neutrofilii nella sede della lesione nel topo trattato con PBS e trattato con PM-NPCs. (Mean  $\pm$  S.E.M: \*\*\*P<0.001 vs PBS)





**Fig. 25:** Immunofluorescenza su sezioni trasversali di tessuto midollare per GFAP (rosso) ed ED1 (verde) nelle corna dorsali (DH) (riga sopra) e ventrali (VH) (riga sotto) nel topo trattato con PBS (A e B) e nel topo trattato con PM-NPCs (C e D). Barra 75  $\mu\text{m}$

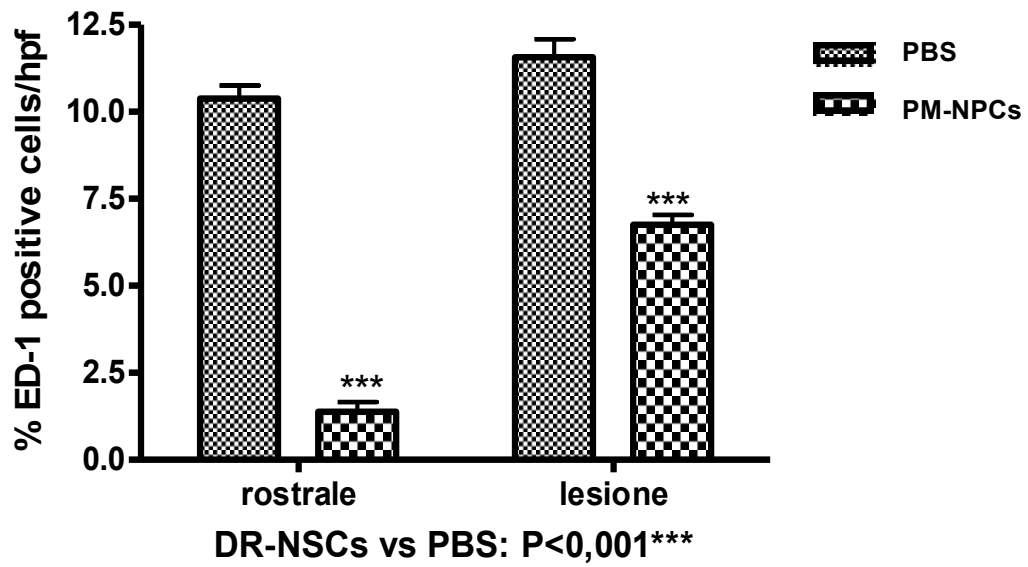


Fig. 26 Quantificazione dei macrofagi nella regione rostrale e nell'epicentro della lesione nel topo trattato con PBS e trattato con PM-NPCs. (Mean ± S.E.M: \*\*\* $P < 0.001$  vs PBS)

### IL6 48h

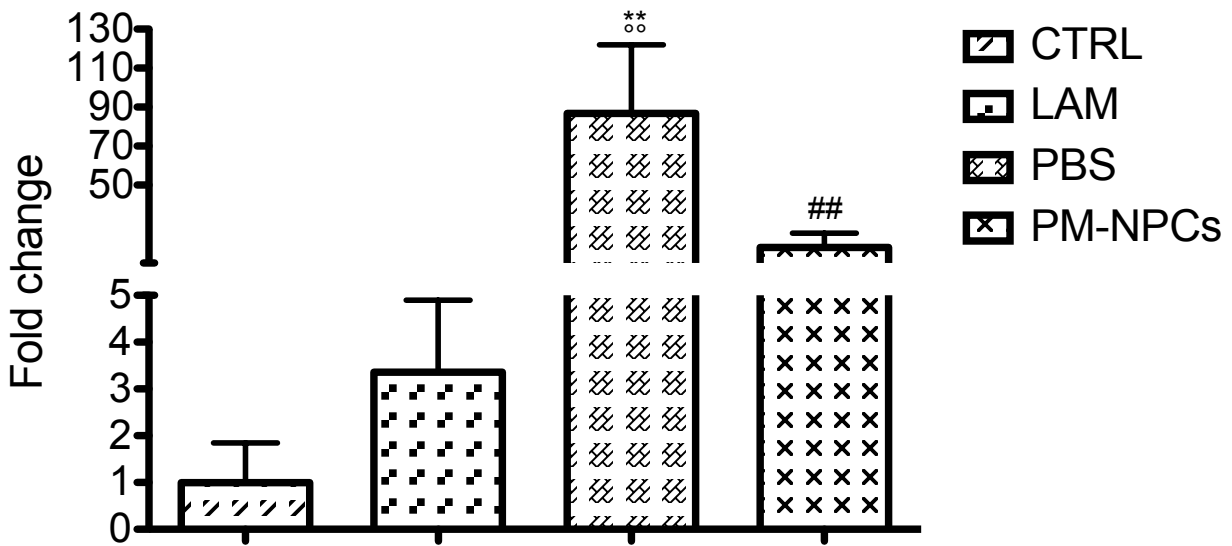


Fig. 27: Espressione del messaggero di IL-6 a 48 ore nella regione corrispondente a T9. (Mean ±S.E.M. °P<0,01 vs CTRL; \*\*P<0,01 vs LAM; ##P<0,01 vs PBS)

### IL6 1w

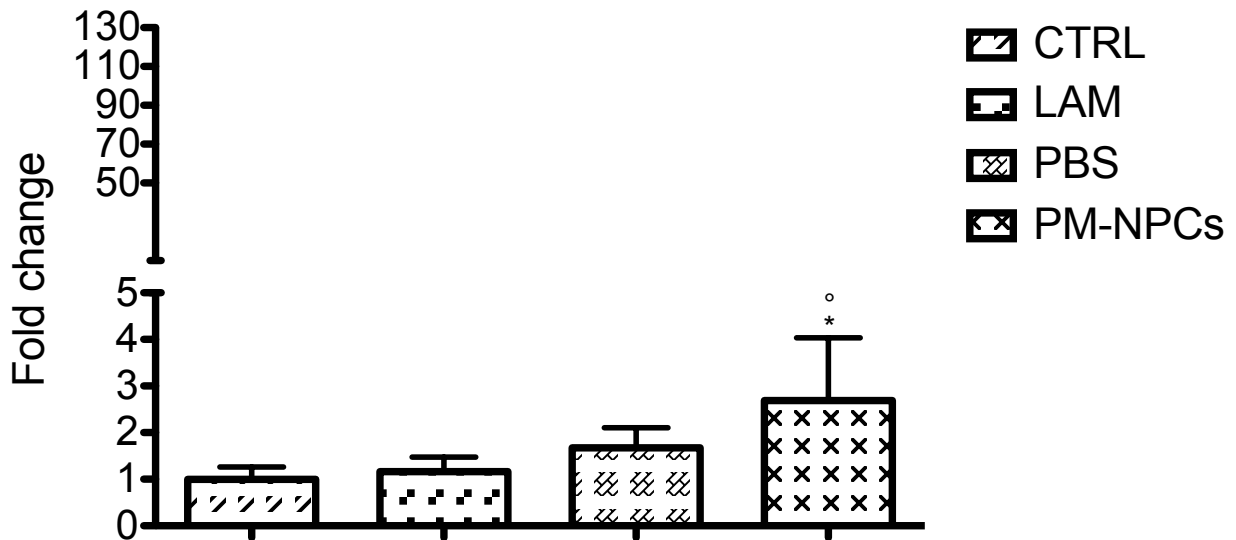


Fig. 28: Espressione del messaggero di IL-6 a 1 settimana nella regione corrispondente a T9. (Mean ±S.E.M. °P<0,05 vs CTRL; \*P<0,05 vs LAM)

### TNF $\alpha$ 48h

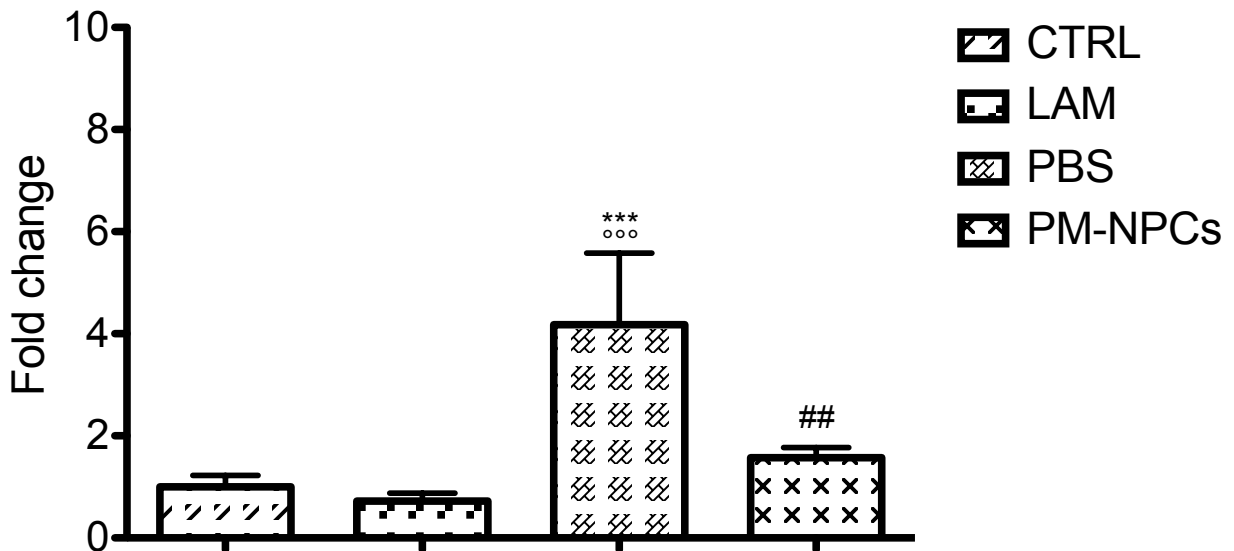


Fig. 29: Espressione del messaggero di TNF  $\alpha$  a 48 ore nella regione corrispondente a T9. (Mean  $\pm$ S.E.M.  $^{\circ\circ\circ}$ P<0,001 vs CTRL;  $^{***}$ P<0,001 vs LAM;  $^{##}$ P<0,01 vs PBS)

### TNF $\alpha$ 1w

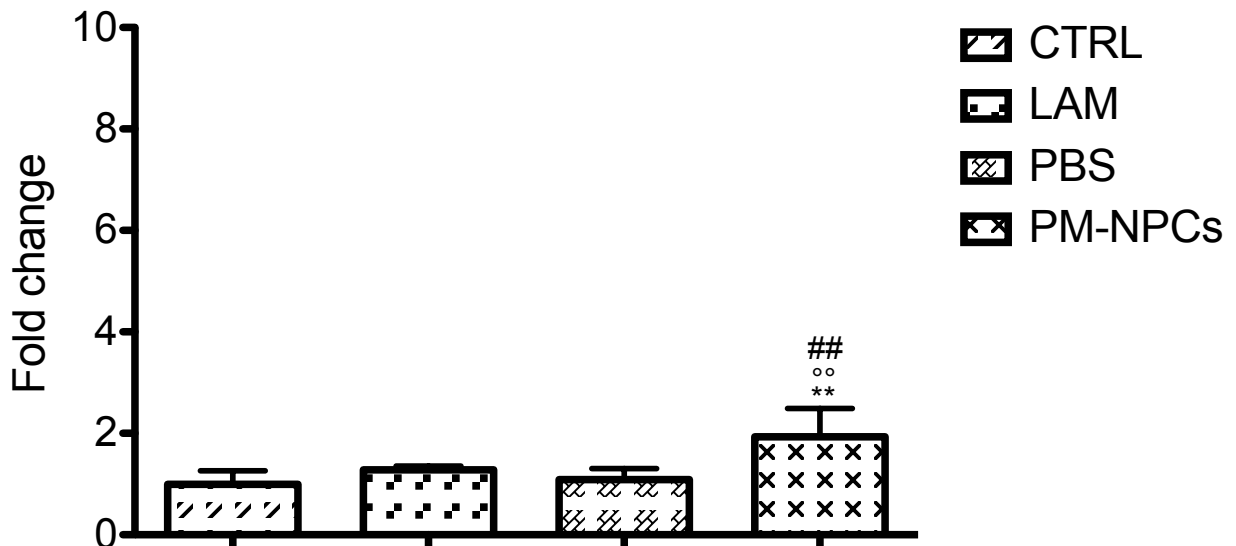


Fig. 30: Espressione del messaggero di TNF  $\alpha$  a 1 settimana nella regione corrispondente a T9. (Mean  $\pm$ S.E.M.  $^{\circ\circ}$ P<0,01 vs CTRL;  $^{**}$ P<0,01 vs LAM;  $^{##}$ P<0,001 vs PBS)

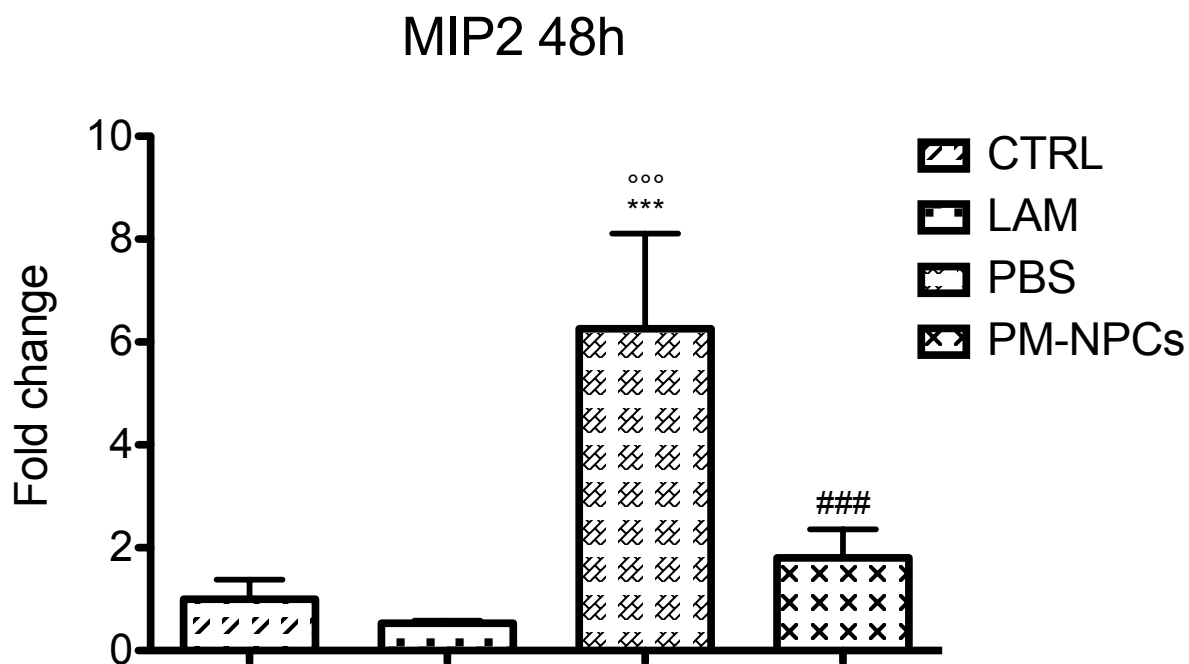


Fig. 31: Espressione del messaggero di MIP2 a 48 ore nella regione corrispondente a T9. (Mean ±S.E.M. °°°P<0,001 vs CTRL; \*\*\*P<0,001 vs LAM; ###P<0,001 vs PBS)

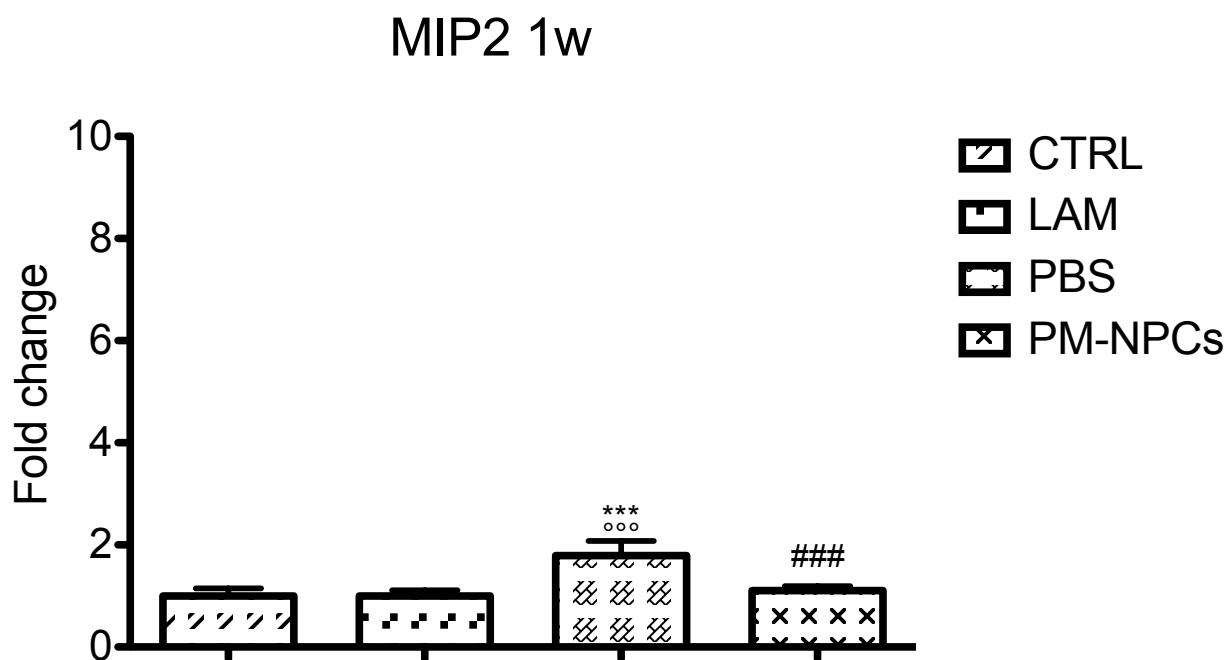


Fig. 32: Espressione del messaggero di MIP2 a 1 settimana nella regione corrispondente a T9. (Mean ±S.E.M. °°°P<0,001 vs CTRL; \*\*\*P<0,001 vs LAM; ###P<0,001 vs PBS)

### LIF 48h

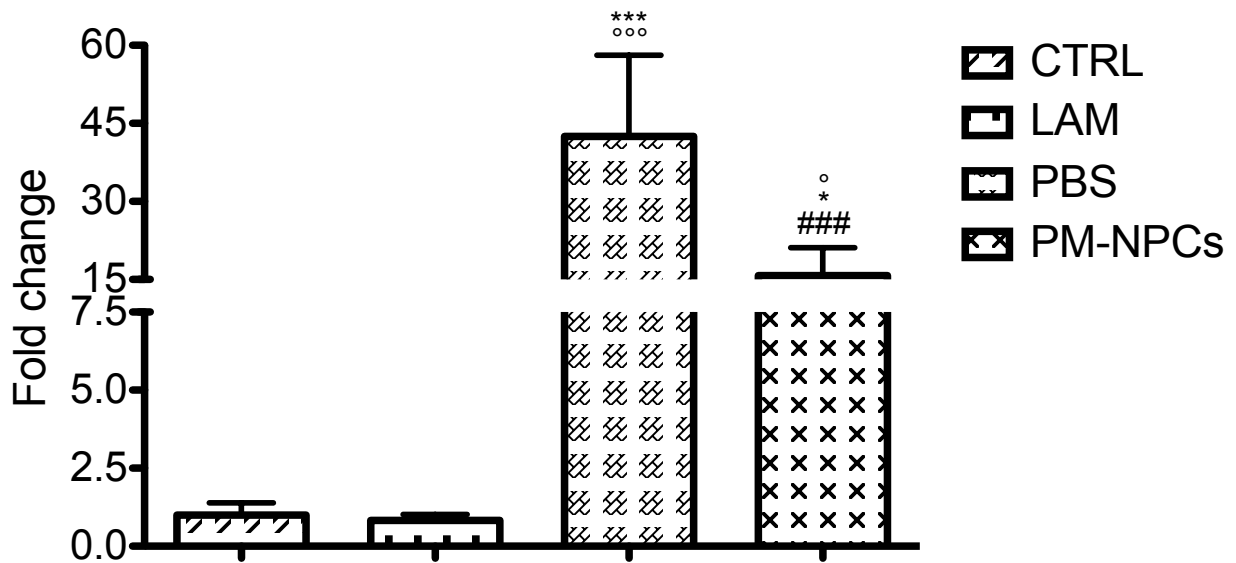


Fig. 33: Espressione del messaggero di LIF a 48 ore nella regione corrispondente a T9. (Mean  $\pm$ S.E.M. °°°P<0,001, °P<0,05 vs CTRL; \*\*\*P<0,001, \*P<0,05 vs LAM; ###P<0,001 vs PBS)

### LIF 1w

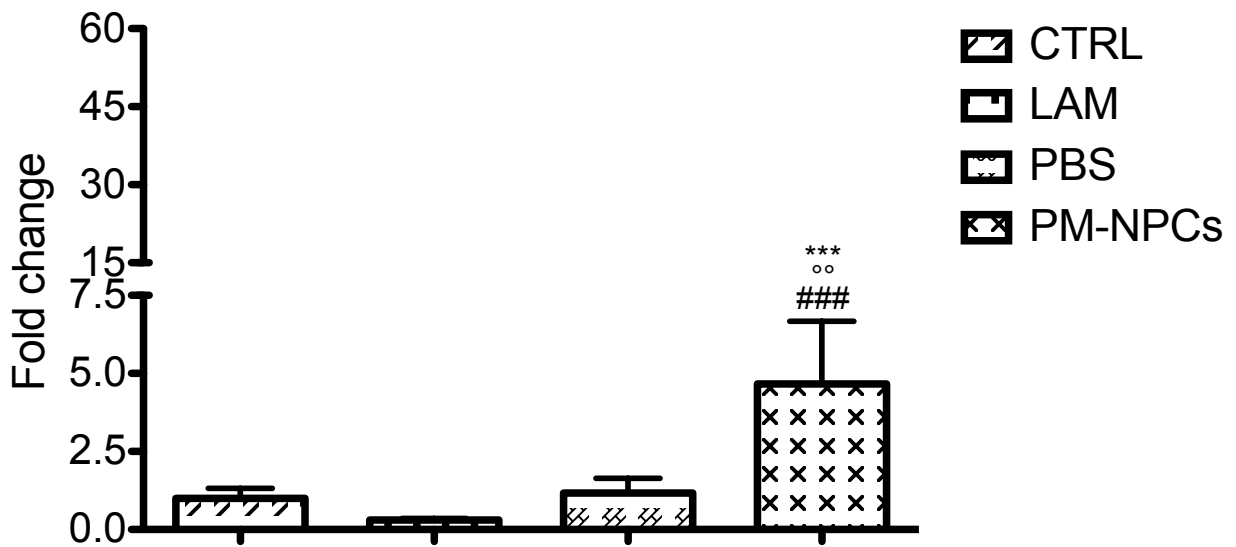


Fig. 34: Espressione del messaggero di LIF a 1 settimana nella regione corrispondente a T9. (Mean  $\pm$ S.E.M. °°P<0,01 vs CTRL; \*\*\*P<0,001 vs LAM; ###P<0,001 vs PBS)

### BDNF 48h

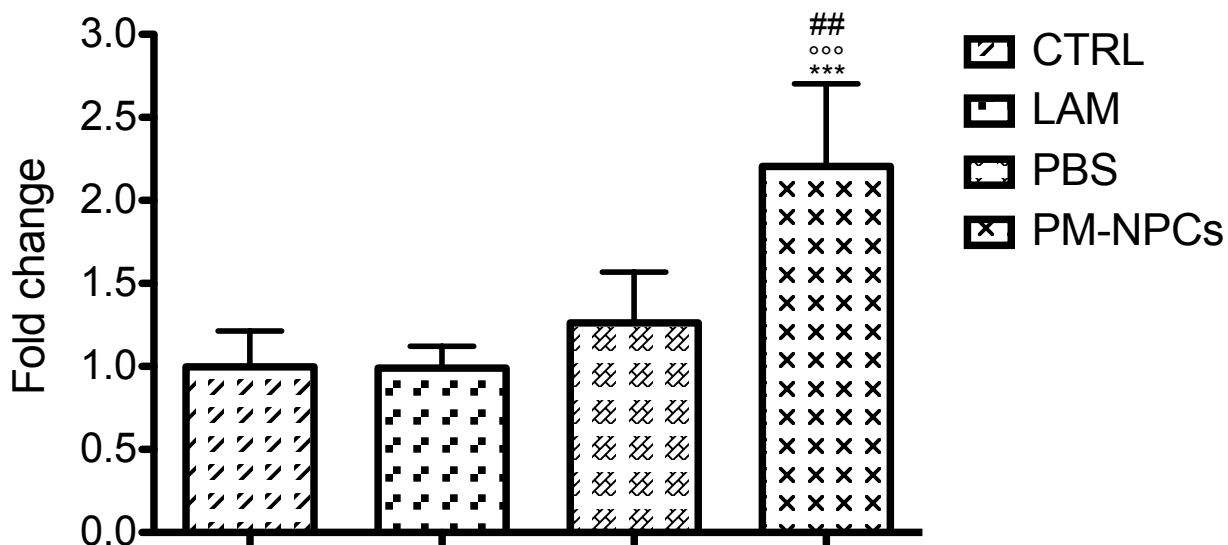


Fig. 35: Espressione del messaggero di BDNF a 48 ore nella regione corrispondente a T9. (Mean  $\pm$ S.E.M. °°°P<0,001 vs CTRL; \*\*\*P<0,001 vs LAM; ##P<0,01 vs SAL)

### BDNF 1w

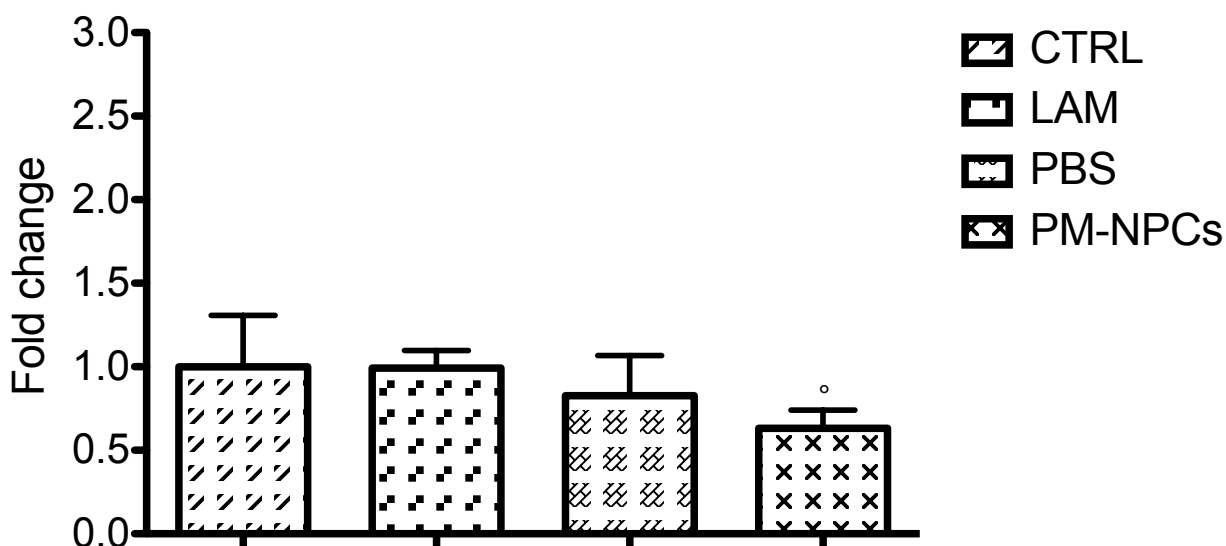


Fig.36: Espressione del messaggero di BDNF a 1 settimana nella regione corrispondente a T9. (Mean  $\pm$ S.E.M. °P<0,05 vs CTRL)

### NGF 48h

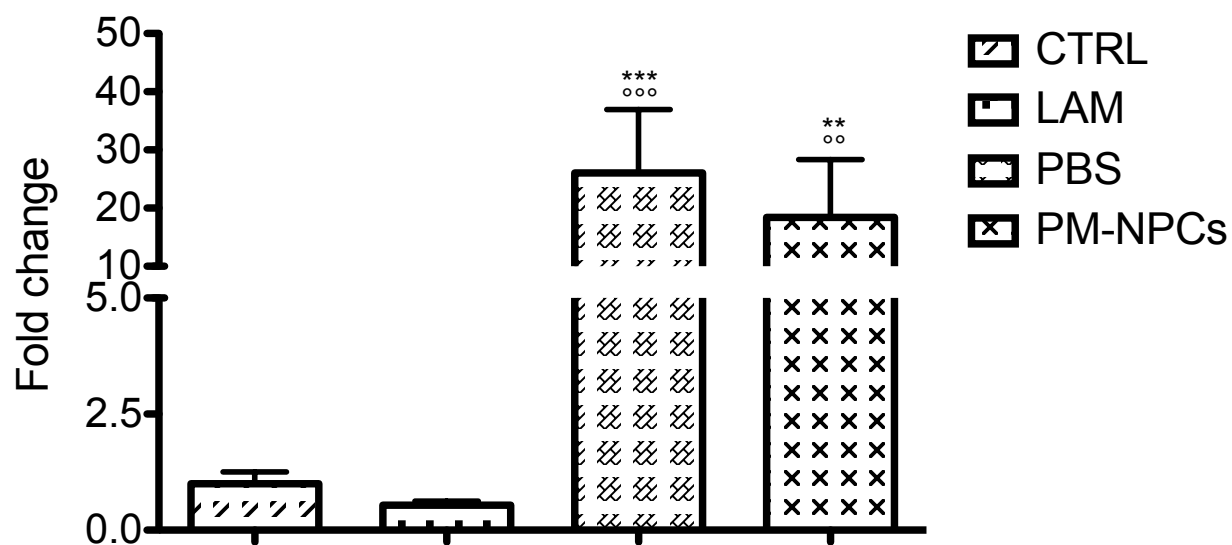


Fig. 37: Espressione del messaggero di NGF a 48 ore nella regione corrispondente a T9. (Mean ±S.E.M. °°°P<0,001, °°P<0,01 vs CTRL; \*\*\*P<0,001, \*\*P<0,01 vs LAM)

### NGF 1w

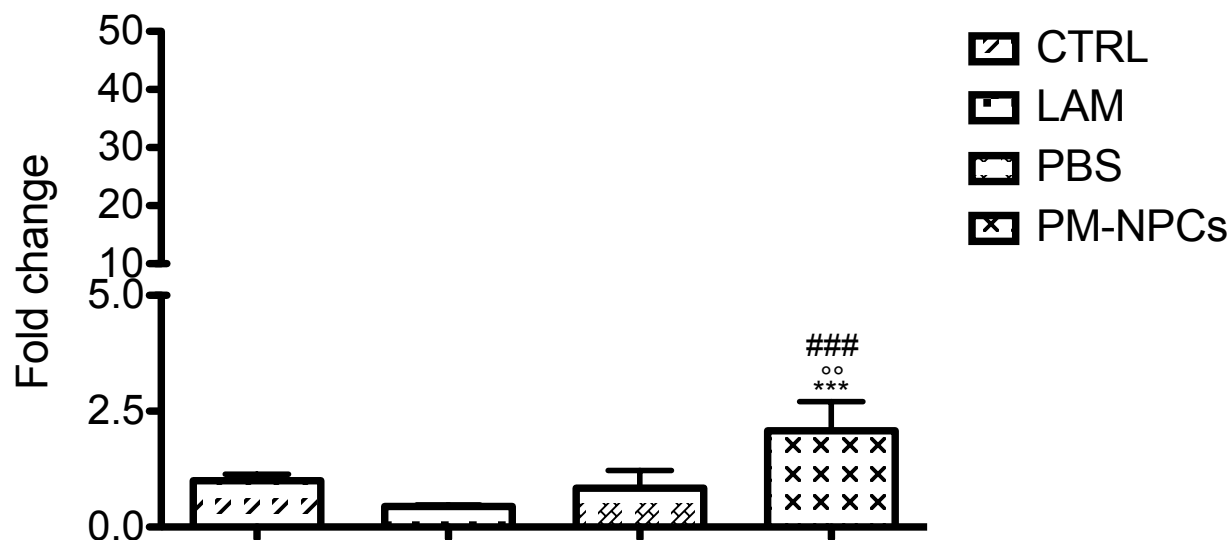


Fig. 38: Espressione del messaggero di NGF a 1 settimana nella regione corrispondente a T9. (Mean ±S.E.M. °°P<0,01 vs CTRL; \*\*\*P<0,001 vs LAM; ###P<0,001 vs PBS)



## 5.6 Marcatura delle PM-NPCs con SPIOs

La marcatura delle PM-NPCs è stata effettuata sia esponendo direttamente le cellule alle SPIOs (Endorem®, Guerbet), sia mediante l'utilizzo di molecole *carrier* quali: poli-L-lisina (PLL), polibrin (PB) e protamina solfato (PrS), in grado di formare dei complessi con le SPIOs facilitandone l'*uptake* da parte delle PM-NPCs.

L'efficienza di marcatura è stata calcolata analizzando la percentuale di cellule positive alla colorazione di PERL, che mette in evidenza il ferro intracellulare; mentre la vitalità delle cellule dopo la marcatura è stata valutata mediante il test di esclusione del trypan blue.

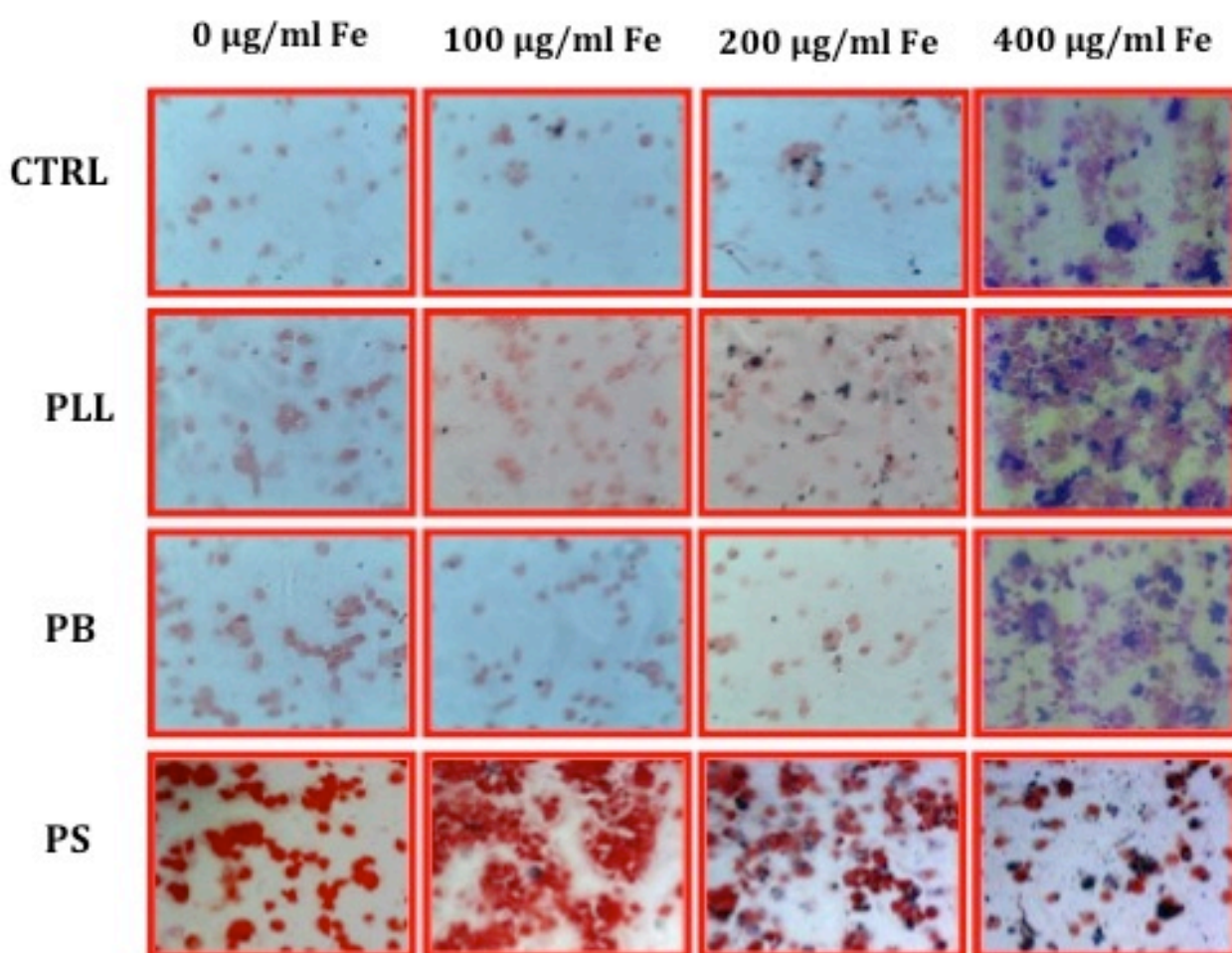


Fig. 39: Efficienza di marcatura delle PM-NPCs marcate con diverse quantità di SPIOs: 0, 100, 200, 400  $\mu\text{g/ml}$  Fe e differenti agenti di trasfezione: poly-L-lysine (PLL), polybrene (PB) e protamina solfato (PrS) con un tempo di incubazione di 24h.

Le PM-NPCs sono state incubate per 24h con differenti quantità di SPIOs (0 -100 - 200 - 400  $\mu\text{g Fe/ml}$ , Endorem®) in presenza o in assenza di diversi carrier (fig. 39). Dopo la colorazione di Perl, è stata valutata la marcatura cellulare con il ferro, che si è rivelata essere dipendente dalla concentrazione di ferro nel medium di coltura e dalla presenza dei vari carrier (fig. 40b)

La marcatura delle PM-NPCs con le SPIOs senza agenti carrier, oppure solo con le SPIOs e l'aggiunta di PLL o PB come agente carrier, risulta in una marcatura delle cellule poco efficiente con tutte le varie concentrazioni di Fe utilizzate (fig. 40b). Inoltre, anche aumentando la concentrazione di PLL (Fe/PLL 1:0.03; 1:0.06; 1:0.09) non si ottiene un corrispettivo aumento della marcatura, ma anzi, si ha una riduzione della vitalità cellulare (fig. 41).

Diversamente invece, l'utilizzo di PrS (rapporto Fe/PrS 1:0.025) come carrier incrementa notevolmente la marcatura delle cellule con le SPIOs; arrivando fino al  $96.01\pm 0.3\%$  di cellule positive nelle condizioni in cui la concentrazione di Fe è di  $200 \mu\text{g Fe/ml}$  (fig. 40b). L'utilizzo di una concentrazione di Fe più bassa ( $100 \mu\text{g Fe/ml}$ ) è stata scartata poiché abbiamo ottenuto delle efficienze di marcatura troppo basse. L'utilizzo invece di una concentrazione di Fe maggiore ( $400 \mu\text{g Fe/ml}$ ), sebbene mostri raggiungere un'efficienza di marcatura elevata, comparabile con quella ottenuta con i  $200 \mu\text{g Fe/ml}$ ; risulta però in un'evidente tossicità che porta ad un notevole aumento della mortalità cellulare (fig. 40a).

Sono stati testati anche altri rapporti PrS/Fe ma anche in questo caso la mortalità cellulare dopo la marcatura è risultata essere troppo elevata ( $66.4\pm 3.7\%$  per la concentrazione PrS/ferro 1:0.1 rispetto a  $95.8\pm 5.9\%$  per la concentrazione PrS/ferro 1:0.05 e  $91.7\pm 5.7\%$  per le cellule controllo (fig. 40).

Il contenuto di ferro intracellulare è stato misurato come precedentemente descritto (Boutry et al, 2008). Nelle cellule incubate con la quantità di  $200 \mu\text{g Fe/ml}$  per 24h (con rapporto Prs/Fe 1:0.025) è stata misurata una quantità di ferro di  $130\pm 28.28 \text{ pg fe/cell}$  quando è stata utilizzata PrS come agente carrier, mentre, è stata misurata una quantità di ferro di  $11.26\pm 3.1 \text{ pg fe/cell}$  quando è stata utilizzata PLL come agente carrier. La quantità di ferro intracellulare non è stata valutata nelle cellule in cui è stata utilizzato il PB come agente carrier a causa del suo elevato effetto tossico sulle PM-NPCs paragonato agli altri agenti carrier utilizzati. Le cellule

controllo al cui terreno di coltura non sono state aggiunte le SPIOs mostrano una quantità di ferro intracellulare molto bassa, pari a  $3.56 \pm 2.6$  pg Fe/cell.

Rispetto alle cellule controllo, l'utilizzo di PrS come molecola carrier non influisce in maniera significativa sulla vitalità cellulare delle PM-NPCs nelle condizioni di marcatura di 200 µg Fe/ml per 24h (fig. 40a).

I risultati ottenuti ci fanno concludere che le condizioni di marcatura che prevedono 200 µg Fe/ml di ferro con PRS come agente carrier e un tempo di marcatura di 24h costituiscono le condizioni ottimali per le PM-NPCs.

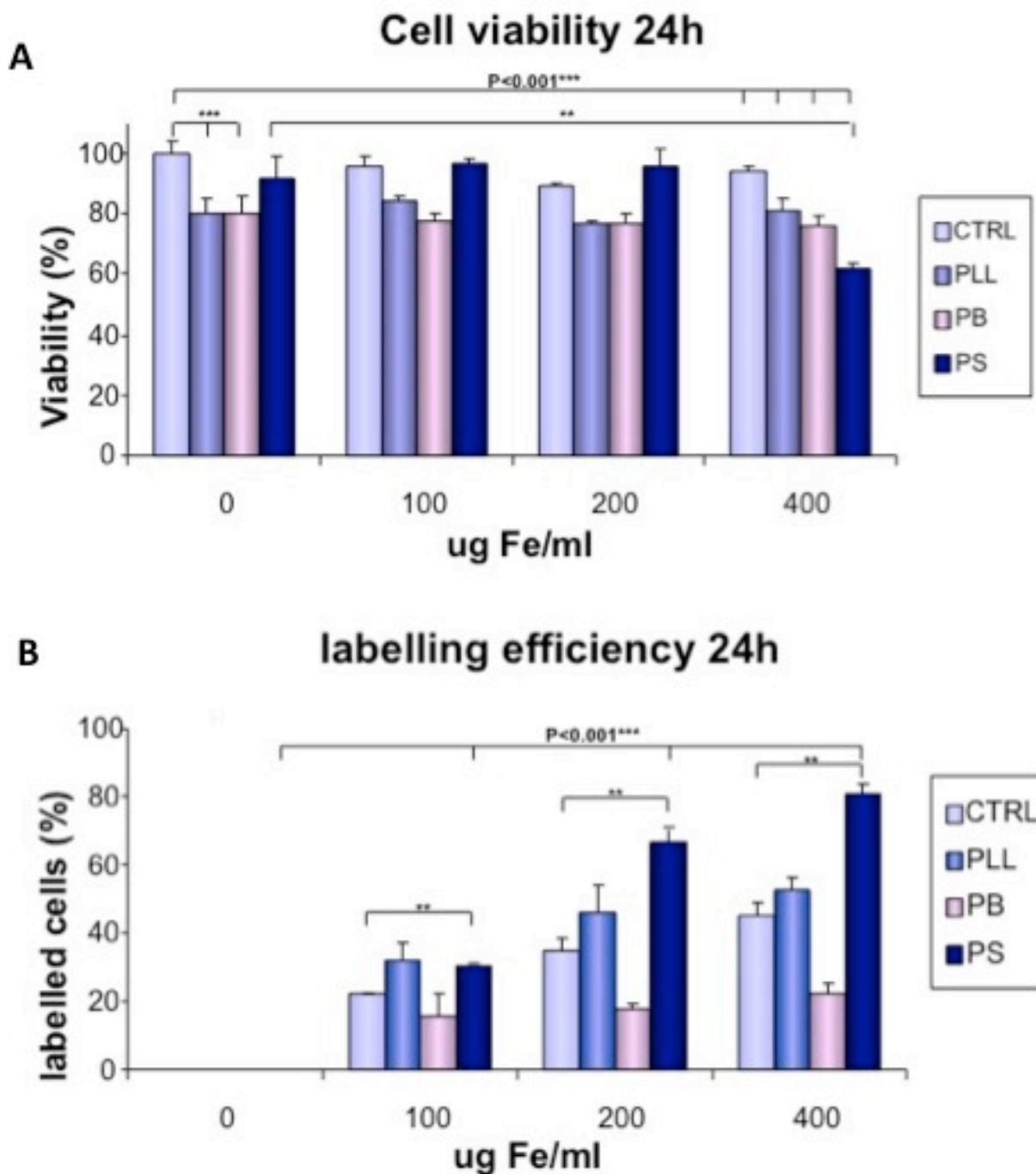


Fig. 40: Il contenuto cellulare di ferro aumentata in proporzione alla quantità di SPIOs presenti nel medium di coltura e in base alla presenza o assenza di agenti trasfettanti. In presenza di PrS come agente carrier si ottiene la più alta percentuale di cellule positive alla marcatura per Fe usando le concentrazioni di SPIOs maggiori (200 e 400  $\mu\text{g/ml}$  Fe). (a) L'utilizzo di concentrazioni di 100 e 200  $\mu\text{g/ml}$  Fe non riduce la vitalità cellulare dopo la marcatura rispetto alle cellule controllo; mentre la concentrazione di 400  $\mu\text{g/ml}$  Fe la riduce in maniera significativa (b). (Mean  $\pm$  S.E.M \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001)

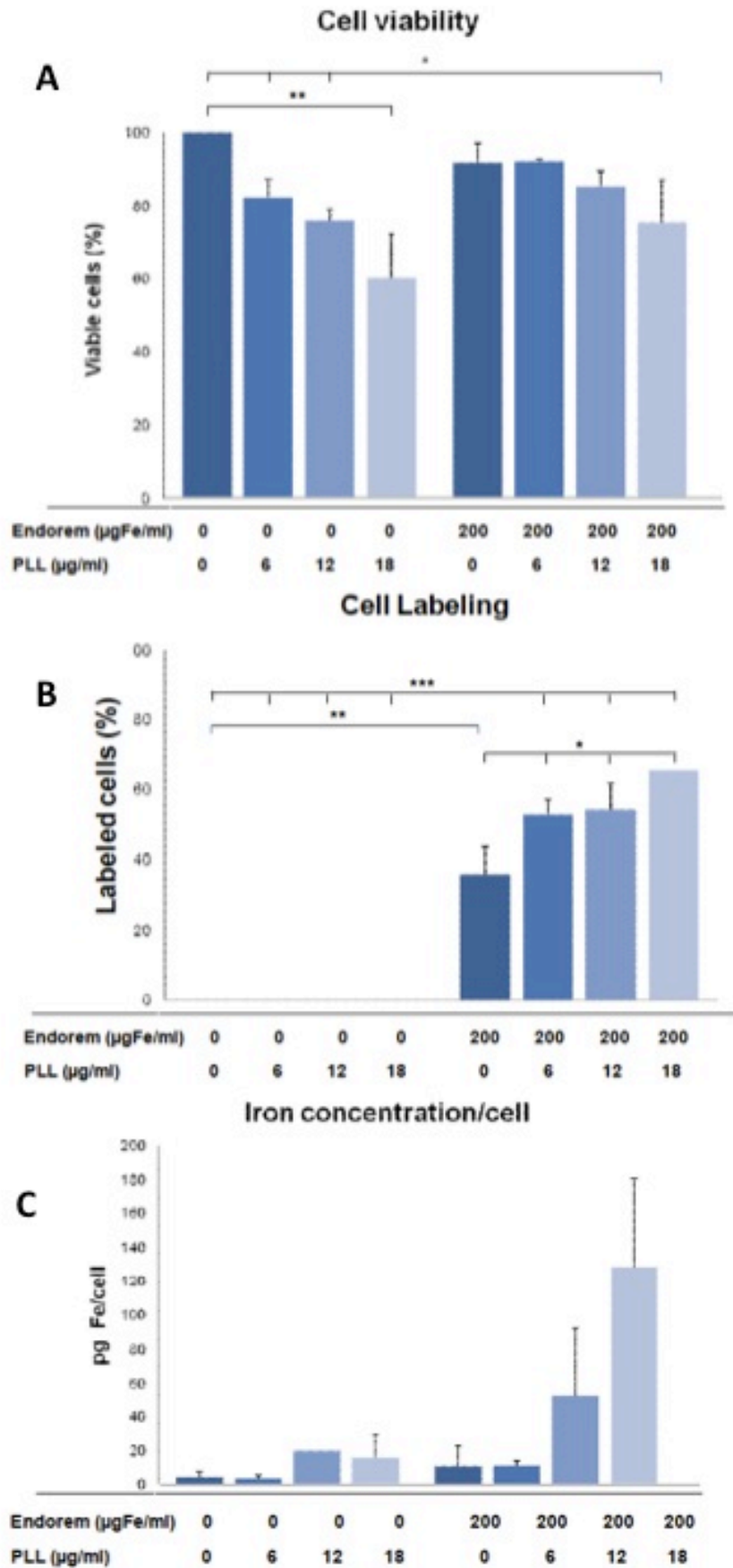


Fig. 41: Prove con diverse concentrazioni di PLL per la marcatura delle PM-NPCs senza ENDOREM e con 200 µgFe/ml: vitalità cellulare (a), efficienza di marcatura (b) e concentrazione di ferro medio per cellule (c) (Mean ±S.E.M \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001)

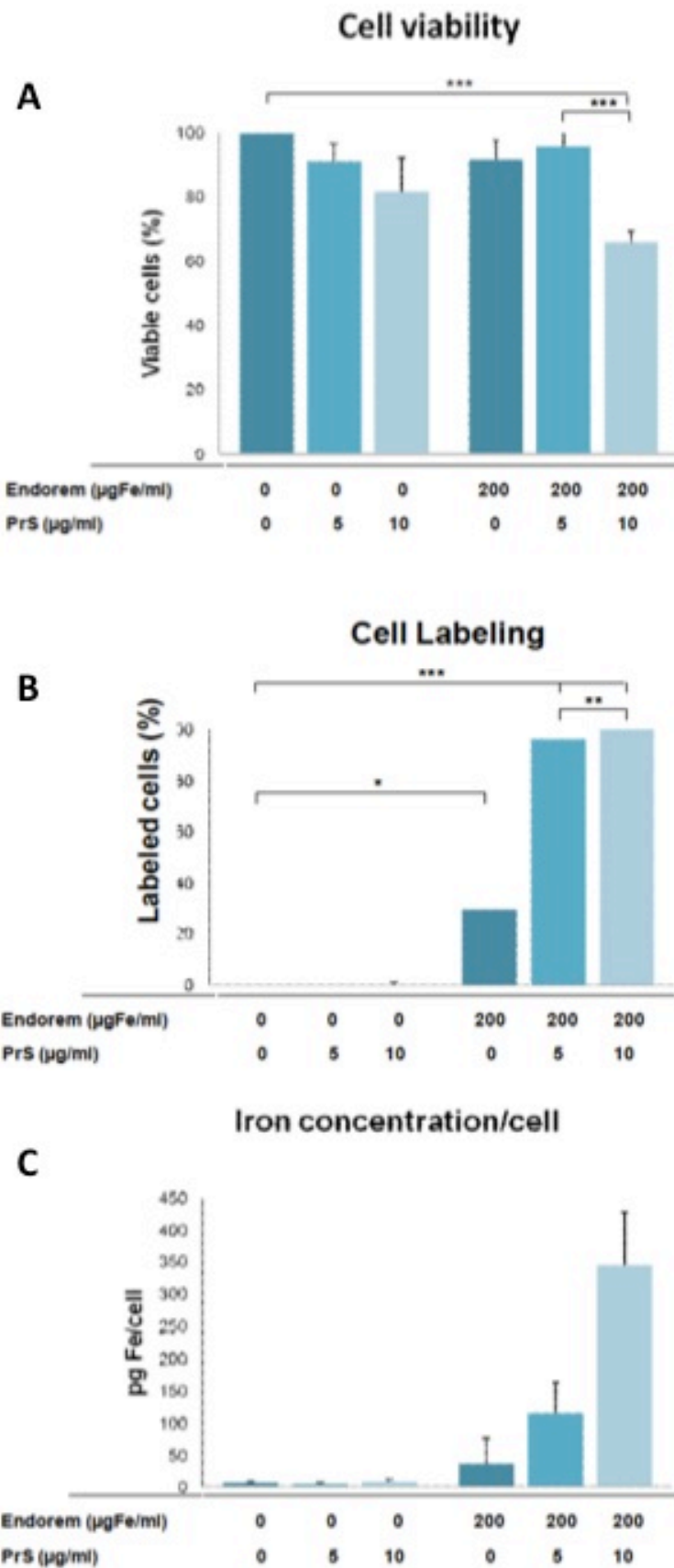


Fig. 42: Prove con diverse concentrazioni di PrS per la marcatura delle PM-NPCs senza ENDOREM e con 200 µgFe/ml: vitalità cellulare (a), efficienza di marcatura (b) e concentrazione di ferro medio per cellule (c) (Mean ±S.E.M \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001)

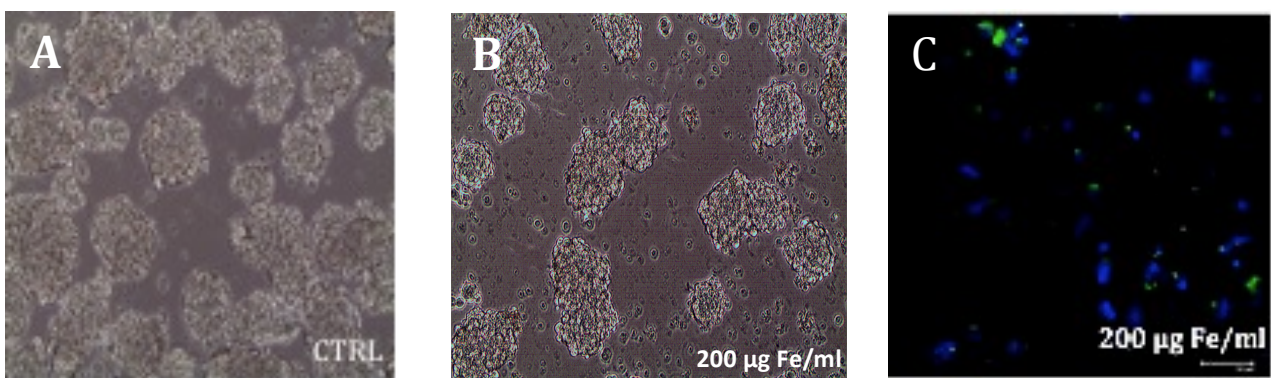


## 5.7 Mantenimento delle caratteristiche fisiologiche delle PM-NPCs

Dopo la marcatura delle PM-NPCs con le SPIOs, è stato verificato se il processo di marcatura fosse andato in qualche modo ad influenzare o modificare le caratteristiche delle cellule; come la loro capacità di proliferare e di generare neurosfere, l'espressione di marcatori tipici delle cellule staminali neurali o la capacità di differenziare nei tre principali tipi di linee neurali.

Le PM-NPCs sono state rimesse in coltura dopo le 24h di marcatura con le SPIOs (200 µg Fe/ml e 1:0.025 di rapporto Fe/PrS) e mantenute in coltura per 5 giorni che è il tempo necessario alla formazione delle neurosfere; alla fine dei 5 giorni è stata osservata la crescita di neurosfere (fig. 43b) in maniera analoga a quelle ottenute ri-piastrando cellule utilizzate come controllo (rimesse in coltura ma senza essere state incubate con le SPIOs) (fig. 43a).

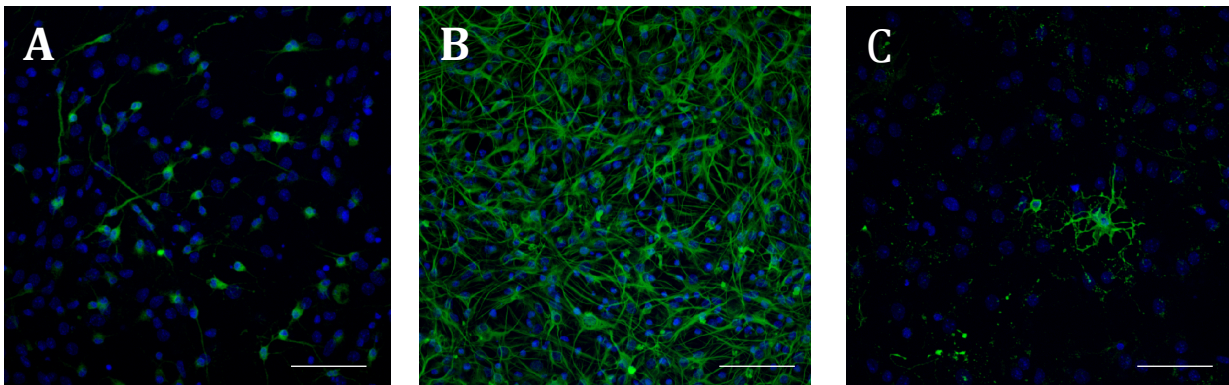
E' stata valutata inoltre il mantenimento dell'espressione della Nestina, un marker tipico delle cellule staminali neurali, anche dopo la marcatura con le SPIOs; riscontrando che essa continua ad essere espressa dalle cellule una volta rimesse in coltura dopo essere state marcate (fig. 43c).



**Fig. 43: Generazione di neurosfere da parte delle PM-NPCs controllo (a) e dopo marcatura con SPIOs (b). Le cellule anche dopo la marcatura continuano ad esprimere il marker staminale Nestina (verde), nuclei colorati con DAPI (blu) (c). O.M 20X (a e b), barra 75 µm (c)**

Infine, è stata verificata anche la capacità delle PM-NPCs dopo marcatura con SPIOs di differenziare nelle 3 tipiche linee cellulare neurali dopo un classico

esperimento di differenziamento; analisi immunostochimiche effettuate mediante immunofluorescenza hanno evidenziato che dopo i 7 giorni di differenziamento le cellule oltre a mostrare una morfologia tipicamente neurale con prolungamenti e ramificazioni, esprimevano positività per marcatori neuronali (TUJ-1) (44a, astrocitari (GFAP) (44b) ed oligodendrocitari (GalC) (44c) , dimostrando così che il ferro utilizzato per la marcatura non interferisce con i processi fisiologici del differenziamento.



**Fig. 44: Differenziamento delle PM-NPCs dopo marcatura con SPIOs nei classici tipi cellulari neurali: neuronale (TUJ-1) (a), astrocitario (GFAP) (b) e oligodendrocitario (Gal C) (c). nuclei colorati con DAPI (blu). Barra 75  $\mu$ m**



## **5.8 Analisi in vivo: MRI dopo iniezione intraspinale di PM-NPCs marcate con SPIOs**

Subito dopo la lesione,  $1.5 \times 10^5$  cellule marcate con SPIOs risospese in PBS sono state iniettate direttamente nel midollo all'interno del sito di lesione mediante utilizzo di un microscopio stereotassico; dopodichè, gli animali sono stati sottoposti ad MRI un volta alla settimana a partire dalla prima settimana dopo la lesione e il trapianto.

Le immagini ottenute tramite sequenza di acquisizione FLASH, mostrano una consistente e ben definita zona di segnale ipointenso nel midollo spinale a livello della zona di lesione, che si riscontra in tutti gli animali lesionati e poi iniettati con PM-NPCs marcate per via intramidollare (fig. 45).

E' stato scelto di utilizzare le sequenze *gradient echo* per acquisire gli animali poiché esse possiedono una maggiore sensibilità agli effetti di suscettibilità, come ad esempio quelli attribuibili alla presenza di ferro nel tessuto; e inoltre forniscono anche un dettaglio anatomico sufficientemente elevato da poter individuare le zone di interesse dell'animale come la sede di lesione.

L'area di segnale ipointenso sembra diminuire gradualmente col passare delle settimane, mentre una forte segnale iperintenso persiste per almeno 5 settimane (fig. 46).

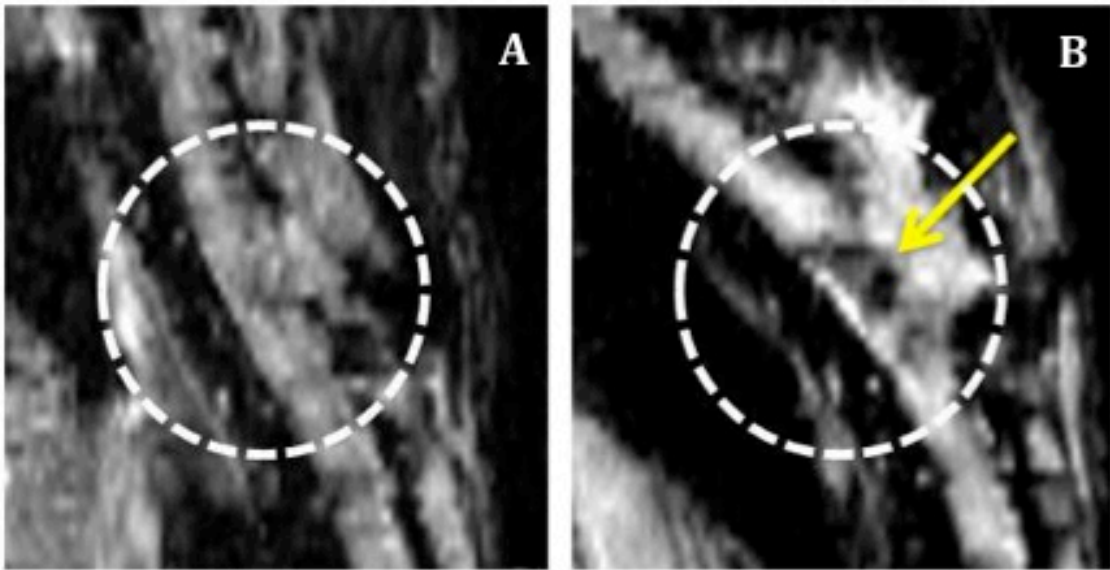


Fig. 45: MRI *in vivo* di topo trapiantato per via intramidollare con PBS (A) e PM-NPCs marcate con SPIOs (B). Le sequenze flash mostrano chiaramente la zona di lesione (cerchio bianco) e al suo interno una segnale ipointenso (freccia) compatibile con la presenza delle cellule marcate dalle SPIOs.

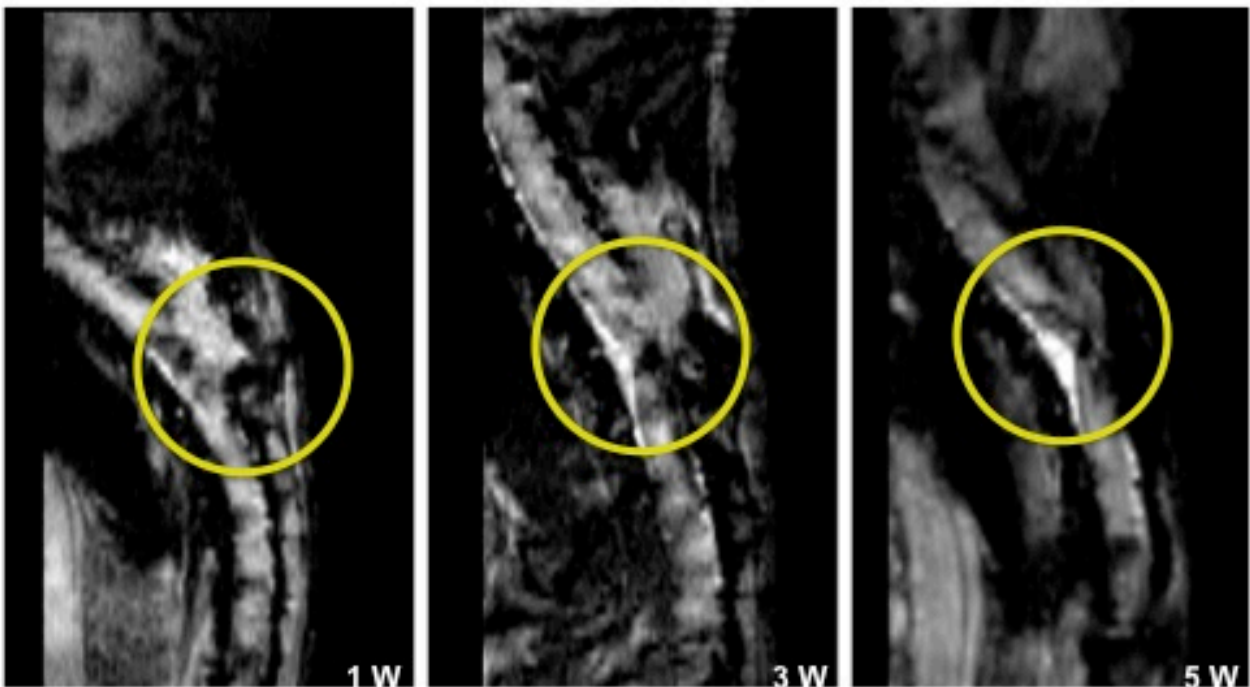


Fig. 46: MRI dinamica *in vivo* di topo trapiantato per via intramidollare con PM-NPCs marcate con SPIOs . Il segnale ipointenso (cerchio giallo) visibile dalla prima settimana dopo la lesione e il trapianto (1W) è mantenuto anche al trascorrere delle settimane (2W e 3W) anche se diminuisce gradualmente col passare del tempo.

## **5.9 Analisi in vivo: MRI dopo iniezione intravenosa di PM-NPCs marcate con SPIOs**

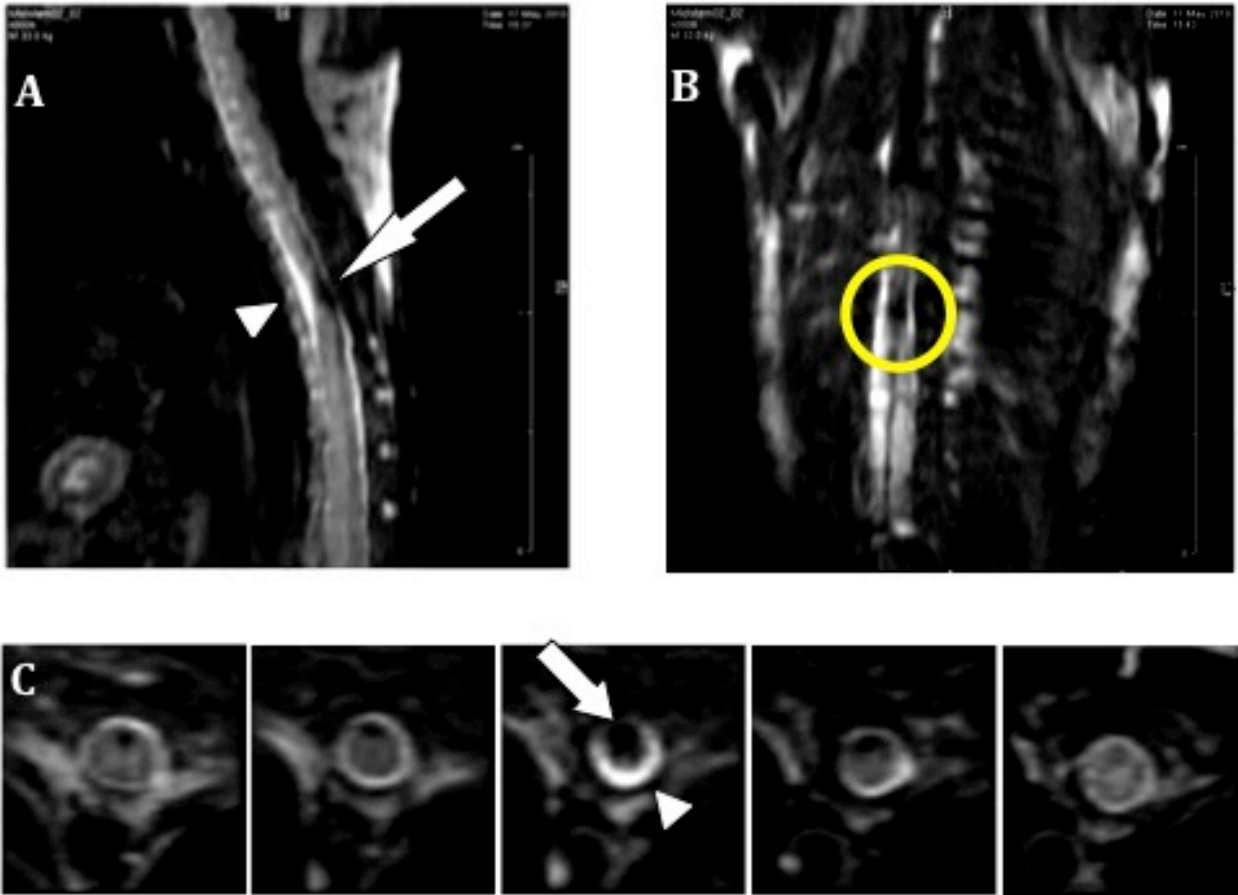
Lo studio *in vivo* delle PM-NPCs iniettate per via endovenosa dopo la marcatura è stata effettuata mediante MRI; in particolare sono state effettuate delle scansioni seriali a partire dalla settimana successiva alla lesione e al conseguente trapianto delle cellule fino alla sesta settimana dal trapianto. L'MRI rileva in alcuni animali un segnale ipointenso a livello del sito di lesione dopo 2 settimane dal trapianto, mentre lo stesso segnale è rilevabile in tutti gli animali alla terza settimana post-trapianto. Il segnale è caratterizzato da una chiara regione di ipointensità che nella zona di restringimento dovuto alla lesione copre l'intero diametro del midollo e che si estende anche dorsalmente ad esso in maniera longitudinale (fig. 47).

Nella figura 48 vengono comparati i segnali di MRI ottenuti sullo stesso animale ma utilizzando sequenze di acquisizioni differenti; infatti, sebbene in tutti i tipi di sequenze si riscontri un'ipointensità a livello del sito di lesione, quelle FLASH e RARE mostrano un segnale molto più definito.

Le sequenza RARE così come quelle MSME sono sequenze Spin Echo che consentono di preservare anche i dettagli anatomici nell'immagine, ma la prime, essendo fortemente pesate in T2 rispetto alle seconde, mostrano in maniera più chiara il segnale ipointenso dovuto alla presenza di ferro.

Un altro dettaglio che si può apprezzare nelle immagini in MRI è il restringimento del midollo spinale nella zona di lesione, esso è identificabile con le sequenze FLASH e RARE come un segnale iperintenso (fig. 48) che è probabilmente dovuto all'accumulo di liquor che riempie la zona ventrale del canale spinale. L'accumulo di liquor al sito di lesione è in accordo con il forte segnale iperintenso ottenuto attraverso le sequenze RARE, riscontrabile anche nell'analisi MRI effettuata negli animali trapiantati per via intramidollare (fig. 46). Il restringimento del midollo nella zona di lesione e l'accumulo di liquor sono eventi riscontrati in tutti gli animali sottoposti a MRI.

La figura 49 mostra che il segnale ipointenso presente in sede di lesione si mantiene per tutto il periodo di osservazione in cui gli animali sono sottoposti ad MRI con solo una debole perdita nell'intensità del segnale al trascorrere delle settimane.



**Fig. 47:** MRI *in vivo* di topo trapiantato con PM-NPCs marcate con SPIOs. (A) piano sagittale, (B) piano longitudinale, (C) serie di piani assiali. La zona di segnale ipointensa nera rappresenta il ferro contenuto nelle PM-NPCs iniettate che si accumulano a livello della lesione nella parte dorsale del midollo, (A e C freccia) e (B cerchio giallo); la zona di segnale ipointensa bianca, (A e C punta di freccia) indica invece la presenza di una sostanza liquida, presumibilmente un accumulo di liquor.

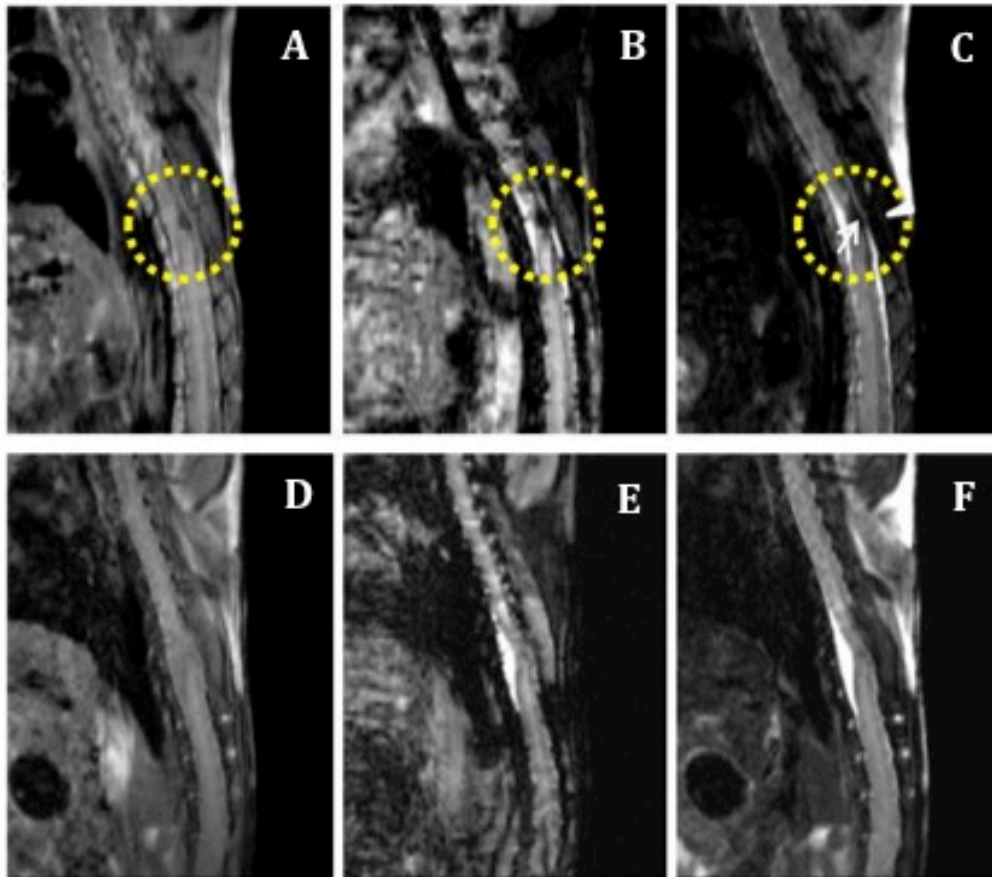


Fig. 48: Paragone di MRI *in vivo* in topo trapiantato per via endovenosa con PM-NPCs marcate con SPIOs (A, B, C) o PBS (D, E, F) utilizzando diversi tipi di sequenze: MSME (A e D), FLASH (B e E) e RARE (C e F). Viene indicata la zona di lesione (cerchio giallo), il segnale ipointenso dovuto al ferro delle SPIOs (freccia) e il punto in cui si nota l'assenza delle vertebre in seguito alla laminectomia (punta di freccia)

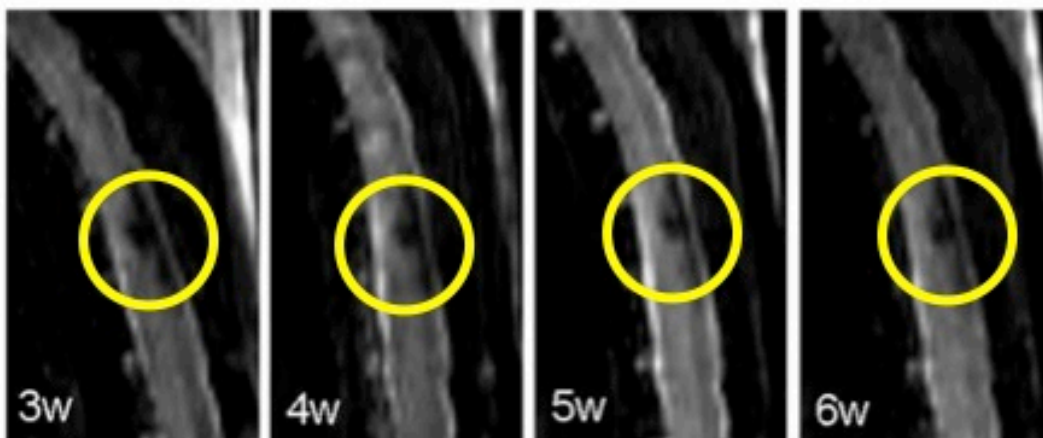


Fig. 49: MRI dinamica *in vivo* di topo trapiantato per via endovenosa con PM-NPCs marcate con SPIOs . Il segnale ipointenso (cerchio giallo) dovuto al ferro è visibile dalla terza settimana post lesione e persiste per almeno 6 settimane; sebbene con una graduale diminuzione con il passare del tempo.

## 5.10 Analisi ex vivo: MRI e immunohistochimica dopo iniezione intravenosa di PM-NPCs marcate con SPIOs

L'analisi in MRI è stata effettuata anche *ex vivo* (fig. 50), sui midolli isolati dagli animali dopo la perfusione, le immagini acquisite mediante sequenza RARE mostrano il medesimo segnale ipointenso già rilevato durante l'MRI effettuata *in vivo* (fig. 47, 48), confermando quindi il dato precedentemente ottenuto.

Il segnale iperintenso dovuto all'accumulo di liquor in questo caso non si vede poiché esso era contenuto nello spazio tra le vertebre e il midollo e quindi una volta estratto quest'ultimo il liquido viene perso; tuttavia, si può comunque notare il restringimento del midollo nella zona di lesione che già si poteva apprezzare nell'MRI *in vivo*.

L'analisi istologica tramite colorazione di PERL effettuata sulle sezioni sagittali ottenute dai midolli degli animali dopo la perfusione e l'MRI *ex vivo* ha confermato che la presenza del segnale ipointenso riscontrata in risonanza magnetica è effettivamente dovuta ad un accumulo di ferro nel tessuto. La quasi totalità del ferro messo in evidenza dalla colorazione di PERL sembra inoltre essere intracellulare (fig. 51) e localizzato principalmente intorno alla zona di lesione; il che ci fa pensare che si tratti proprio del ferro delle SPIOs con cui sono state marcate le PM-NPCs che avendo tropismo per la sede di lesione vanno a concentrarsi proprio in quella zona. Inoltre, la colorazione di PERL mostra che il ferro si trova sia in cellule con forma tondeggianti che in cellule con una morfologia più ramificata con emissione di processi dal corpo cellulare (fig. 52).

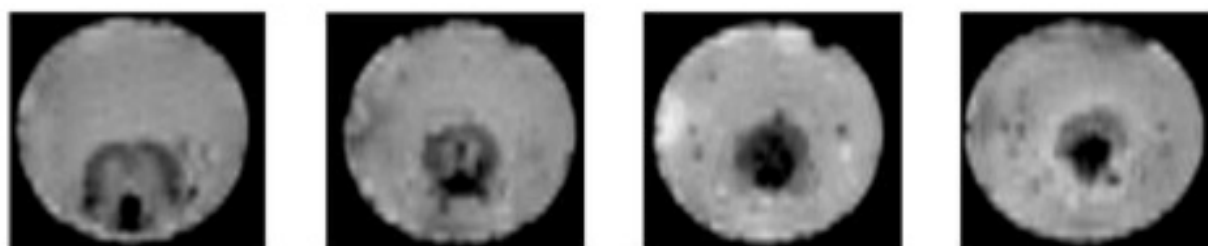
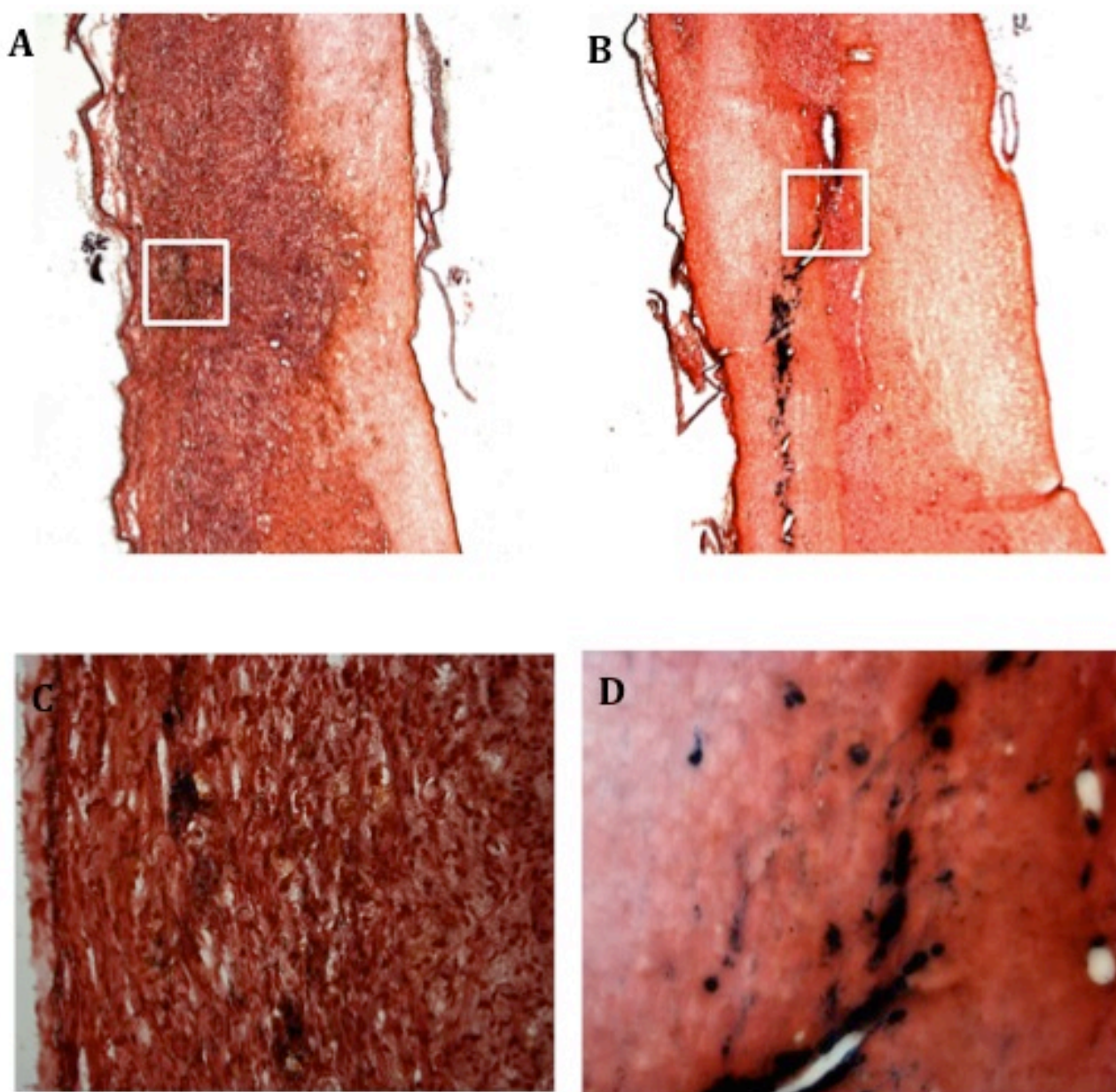
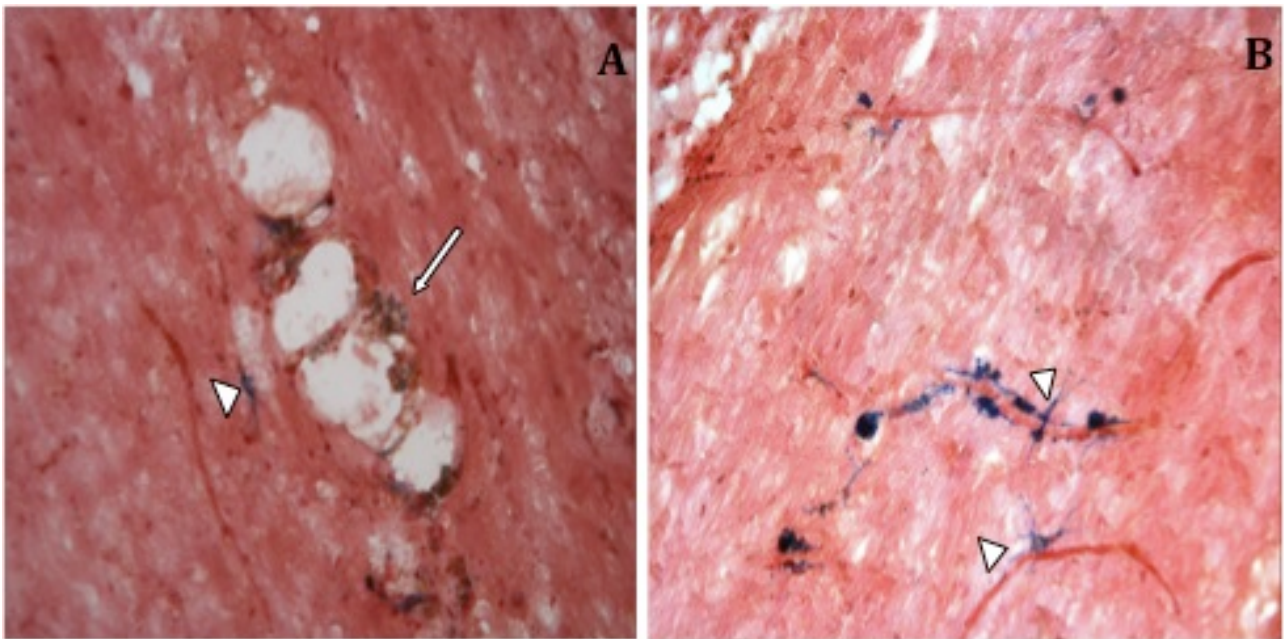


Fig. 50: MRI *ex vivo* di midollo di topo trapiantato per via endovenosa con PM-NPCs marcate con SPIOs . Il segnale ipointenso (nero) dovuto al ferro è rilevabile anche nel midollo *ex vivo* a conferma di quello osservato *in vivo*.





**Fig. 51:** Colorazione con Prussian Blue che mette in evidenza il ferro in sezioni sagittali di animali trapiantati con PM-NPCs per via endovenosa. Le cellule marcate con le SPIOs si ritrovano sia in sede di lesione (A e C) che ai suoi margini (B e D). Il ferro sembra localizzarsi principalmente a livello intracellulare (C e D). C e D sono i rispettivi ingrandimenti dei riquadri in A e B. A e B O.M 5X, C e D O.M 40x



**Fig. 52:** Colorazione con Prussian Blue (blu) che mette in evidenza il ferro in sezioni sagittali di animali trapiantati con PM-NPCs per via endovenosa. Il ferro è riscontrabile sia in aggregati cellulari di forma rotondeggiante (freccia), sia in cellule con morfologia ramificata (punta di freccia). O.M 40X.



# **DISCUSSIONE**

## 6. Discussione

In questo studio sono state valutate le potenzialità terapeutiche delle *Post Mortem Neural Precursor Cells* (PM-NPCs) (Marfia et al, 2011) nel trattamento della lesione traumatica acuta del midollo spinale. Nella terapia cellulare della lesione spinale sono state utilizzati diversi tipi di cellule, sia staminali: embrionali (Bottai et al, 2010), mesenchimali (Cizkova et al, 2006), ematopoetiche (Koshizuka et al, 2004), neurali (Bottai et al, 2008; Abematsu et al 2010), o altri tipi (Gorio et al, 2004); che non staminali: cellule di schwann (Schaal et al, 2007) e oligodendrocyte ensheathing cells (OECs) (Richter and Roskams, 2008); ma le cellule staminali/precursori neurali sono quelle più utilizzate, probabilmente perché già indirizzate verso un fenotipo neurale e quindi già programmate per differenziare in maniera idonea a rigenerare il tessuto neurale danneggiato in seguito al danno.

Dopo somministrazione per via endovenosa, le PM-NPCs raggiungono il sito di lesione attraverso il torrente circolatorio, superando l'ostacolo della barriera ematospinale, che è stata intaccata profondamente dalla lesione e dalla successiva reazione infiammatoria (Maikos and Shreiber, 2007).

Diversamente dalle cellule/precursori neurali classici (Bottai et al, 2008), le PM-NPCs non vengono fagocitate dai macrofagi durante le prime settimane di permanenza nel midollo danneggiato e si integrano ai margini del parenchima lesio; in seguito, si differenziano in senso neuronale e creano un vero e proprio territorio neurale all'interno del tessuto midollare lesionato (Marfia et al, dati non pubblicati). L'esame morfologico del midollo lesio ha mostrato che le PM-NPCs si sono sviluppate in neuroni neoformati, che in buona parte si sono differenziate secondo un fenotipo colinergico. Spesso le cellule trapiantate formano nel midollo lesio un cordoncino dalla sezione circolare con un diametro di poco inferiore al millimetro; questa struttura è prevalentemente costituita da PM-NPCs differenziate e da processi nervosi, assoni e dendriti da loro formati. Si ha così una vera e propria riorganizzazione tissutale all'interno della zona di lesione, con una struttura altamente idonea a sostenere eventi rigenerativi.

Il quadro morfologico differenziativo del tessuto lesso si associa ad un importante recupero funzionale degli arti posteriori. I test motori di libera locomozione sono stati quantificati attraverso la BMS e si è osservato che l'abilità di usare gli arti posteriori aumenta rapidamente a partire dal settimo giorno, raggiungendo il valore massimo entro tre settimane e rimanendo costante. I topi trattati con soluzione salina, invece, mostrano un recupero marcatamente inferiore.

Un importante recupero della funzionalità motoria è un dato comune che si riscontra nella maggior parte degli studi sulla lesione spinale che utilizzano una terapia cellulo-mediata (Barakat et al, 2005; Firouzi et al, 2006; Ramon-Cueto et al, 2000; Moreno-Flores et al, 2006; Setoguchi et al, 2004; Ziv et al, 2006; Bottai et al, 2008; Bambakidis and Miller. 2004).

Con il trapianto di PM-NPCs la citoarchitettura midollare nel sito di lesione migliora in seguito al trapianto delle cellule staminali neurali: l'estensione del tessuto necrotico post-lesione è significativamente ridotto nei topi trattati e le aree cicatriziali sono intersecate da tessuto nervoso neoformato dalle staminali. La citoprotezione esercitata dalle PM-NPCs si estende anche alla sostanza bianca, in particolare a 0,5 mm dalla lesione in posizione caudale la compatezza della sostanza bianca è simile a quella dei topi controllo, mentre gli animali trattati con PBS mostrano una densità mielinica significativamente ridotta.

La migliore preservazione della sostanza bianca può spiegare l'aumento del recupero di funzionalità motoria dopo trattamento con PM-NPCs. Infatti, sebbene in questo tipo di lesione il tratto corticospinale (CST) e in particolare la parte dorsale del CST che è quella che decorre nella parte ventrale della colonna dorsale e che nei roditori rappresenta la parte principale di questa via (Miller MW, 1987; Brosamle and Schwab, 1997), viene gravemente compromesso; vi sono tratti dello stesso pathway che decorrono al livello della colonna dorsolaterale: il tratto corticospinale dorso-laterale (lCST) (Steward et al, 2004) e della colonna ventrale: il tratto corticospinale ventrale (vCST) (Brosamle and Schwab, 1997), che sebbene normalmente abbiano una funzione di minore importanza rispetto al CST possono vicariarne in parte le funzioni in seguito a lesione midollare dorsale e rendere meno severo il quadro clinico (Brosamle and Schwab, 2000). Inoltre sempre a livello della sostanza bianca laterale e ventrale decorrono i fasci di altri 2 importanti pathway

motori che sono rispettivamente il tratto rubro-spinale (RST) (Brown LT, 1974; Wang et al, 2011) implicato nel controllo del movimento e nei movimenti delle zampe (Jarratt and Hyland, 1999, Kuchler et al, 2002) e il tratto reticolo-spinale (RtST) (Jones and Yang, 1985) in cui sono presenti i circuiti che controllano la postura del corpo, del collo e del tronco ed è anche il pathway che regola l'inizio del movimento (Jordan LM, 1998; Matsuyama et al, 2004). Queste due vie sono le responsabili principali del recupero fisiologico della locomozione in seguito a lesione spinale anche quando non viene somministrato nessun trattamento (Schucht et al, 2002; Ballermann and Fouad, 2006). Poiché tutte queste vie "secondarie" decorrono in zone della sostanza bianca che abbiamo dimostrato essere maggiormente preservate dal trattamento con PM-NPCs questo potrebbe probabilmente essere correlato al miglior recupero dell'attività motoria osservato nei topi trattati. Un miglior recupero motorio correlato ad una maggior preservazione della sostanza bianca è stato dimostrato anche in un modello di trauma spinale contusivo che utilizzava ratti in cui come trattamento veniva somministrata eritropoietina ricombinate umana rhEPO (Vitellaro-Zuccarello et al, 2007; Vitellaro-Zuccarello et al, 2008; Gorio et al, 2002).

Analisi immunoistochimiche hanno rilevato, che l'effetto neuroprotettivo delle PM-NPCs è efficace anche a livello della sostanza grigia; infatti, la presenza di fibre assonali sopravvissute al danno; come: i processi serotoninergici, positivi per la serotonina (5-HT), e catecolaminergici, positivi per la tirosina idrossilasi (TH), indicano che la presenza delle PM-NPCs in sede midollare fornisce un ambiente favorevole alla preservazione di queste vie degenerate in seguito al trauma e questo fenomeno rigenerativo di reinnervazione della sostanza grigia delle porzioni caudali del midollo è indicativo dell'abilità delle PM-NPCs di trasformare la zona lesa in un sito atto a sostenere la rigenerazione degli assoni lesi, che probabilmente contribuisce al miglioramento del recupero funzionale.

E' infatti noto che i neuroni se non vengono stimolati da un adeguata innervazione,; vanno incontro ad alcuni cambiamenti morfologici e fisiologici come la riduzione del numero di dendriti e la riduzione delle loro ramificazioni (Bose et al, 2005) che possono portare le cellule all'atrofia; un meccanismo definito degenerazione transinaptica (Eidelberg et al, 1989; Van De Meent et al, 2010). Questo può portare

ad una perdita di segnali sinaptici e ad una mancata attivazione dei neuroni, che diventano funzionalmente inattivi (McComas et al, 1973, Benecke et al, 1983).

Capita quindi che in seguito a lesione spinale anche i neuroni che non sono stati interessati ne dal danno primario ne da quello secondario vadano incontro ad atrofia perché la maggior parte degli assoni con cui facevano sinapsi appartenevano a neuroni che sono invece morti. Risulta essere quindi di grande importanza riuscire a preservare oltre al maggior numero di motoneuroni, anche il maggior numero di fibre possibili sebbene non siano quelle direttamente coinvolte nella trasmissione degli impulsi nervosi deputati al movimenti ma quelle implicate nella regolazione dell'attività dei motoneuroni (catecolaminergiche e serotoninergiche) o dei neuroni propriospinali che sono fibre intraspinali che connettono segmenti diversi del midollo spinale e se preservati possono mantenere il collegamento funzionale a monte e a valle della lesione (Dutton et al, 2006).

Il trattamento con PM-NPCs che preserva una buona parte di fibre catecolaminergiche e serotoninergiche da questo punto di vista aiuta a mantenere i neuroni attivi e quindi a mantenere un network neurale più funzionale che contribuisce al recupero dell'attività motoria.

Oltre a preservare maggiormente le fibre discendenti provenienti dall'encefalo le PM-NPCs hanno un'ulteriore funzione neuroprotettiva a favore della sostanza grigia, in particolare abbiamo dimostrato che esse esplicano la loro azione sui corpi cellulari dei neuroni che risiedono a livello delle corna ventrali che sono la zona in cui risiedono i motoneuroni. Queste cellule hanno quindi un effetto terapeutico sul midollo danneggiato che è triplice: preserva in maniera consistente i corpi cellulari presenti nelle corna ventrali dove risiedono i neuroni deputati al movimento; preserva le fibre monoaminergiche discendenti implicate anch'esse nel controllo della locomozione e infine preserva anche la sostanza bianca in zone in cui decorrono importanti pathway motori che possono vicariare almeno in parte le funzioni del pathway cortico-spinale danneggiato. Sempre a livello cellulare, abbiamo osservato che a 4 settimane dal lesione, molte PM-NPCs differenziano in senso neuronale e hanno quindi la possibilità di integrarsi in maniera funzionale nel network neurale che si ri-arrangia in seguito alla lesione (Abematsu et al, 2010, Xu

et al, 2011) contribuendo anche in questo caso alla ripresa della funzionalità motoria.

La terapia della SCI ha dimostrato inoltre che in alcuni casi l'effetto dei trattamenti somministrati riesce a preservare in parte anche la funzionalità del CST (Joosten et al, 1995; Raineteau et al, 2002), questo avviene non tanto perché gli assoni del CST ricrescono e attraversano la zona di lesione, ma perché da questo fascio che si trova rostralmente alla lesione fuoriescono degli assoni (Fouad and Tse, 2008) che si immettono nel tessuto neurale sano intorno alla lesione, la aggirano e poi una volta giunti a livello caudale rispetto alla lesione si vanno a fare sinapsi nelle stesse lamine in cui normalmente giungono gli assoni del CST negli animali sani (Maier and Schwab, 2006). L'iniezione di Fluororuby (Lu et al, 2001) nel CST rostralmente alla lesione ha dimostrato che negli animali trattati con PM-NPCs il tracciante fluorescente viene trasportato in maniera anterograda degli assoni del CST risparmiati o dai suoi rami collaterali che passano attorno alla lesione e a livello caudale rispetto alla tessuto midollare lesionato si rileva una quantità di fluororuby significativamente superiore rispetto a quella rilevata nel topo trattato con soluzione salina. Questo dimostra che probabilmente in aggiunta alla migliore preservazione tissutale, il trattamento con PM-NPCs fornisce un ambiente favorevole alla rigenerazione nervosa nel midollo lesio.

Il trattamento con PM-NPCs mostra anche una marcata riduzione dell'infiltrazione di neutrofili che si accompagna ad una miglior preservazione della citoarchitettura midollare; i neutrofili solitamente invadono il tessuto midollare danneggiato 12-24 ore dopo la lesione (Popovich et al 1997) e li rilasciano citochine pro-infiammatorie e specie reattive dell'ossigeno (Popovich et al 1999; Taoka and Akajima 1998). Allo stesso modo, anche l'infiltrazione di macrofagi nella sede del danno, che solitamente ha il suo picco 5-7 giorni dopo la lesione (Taoka et al 1997) risulta essere ridotta in seguito a somministrazione di PM-NPCs. E' stato inoltre già dimostrato che trattamenti anti-infiammatori hanno un'elevata efficacia nel ridurre selettivamente il danno precoce mediato dai leucociti in caso di trauma midollare, lasciando l'opportunità di intervenire in un secondo momento con interventi mirati alla riparazione del tessuto danneggiato e alla rigenerazione (Gorio et al 2007; Gris et al 2004). Il trattamento con questo tipo di precursori neurali sembra quindi avere

anche un potente effetto anti-infiammatorio probabilmente dovuto a fattori/citochine che le cellule stesse rilasciano una volta giunte in sede di lesione.

L'effetto anti-infiammatorio delle PM-NPCs si esplica anche nei confronti della reazione gliale, un evento che si accompagna sempre alla lesione midollare (Silver and Miller, 2004; Fitch and Silver, 2008). Se da un lato la formazione della cicatrice gliale è importante per creare una barriera che protegga l'area già danneggiata del SNC dal subire ulteriori danni (Myer et al. 2006), dall'altro è stato dimostrato che essa funge da vero e proprio ostacolo alla rigenerazione assonale; sia dal punto di vista fisico, che dal punto di vista di interazioni cellulari e molecolari (Fitch and Silver, 1997; Fitch and Silver 2008). La riduzione dell'attività gliale che si ottiene in seguito a somministrazione di PM-NPCs e quindi la conseguente riduzione dell'entità della cicatrice, consente di mantenere un microambiente con un ridotto quantitativo di molecole/stimoli inibitori per la crescita assonale; che può portare ad una maggior rigenerazione delle fibre nervose nel lungo periodo.

Il trattamento con le PM-NPCs ha influenzato anche l'espressione di numerose delle citochine pro e anti-infiammatorie analizzate, le quali non sono normalmente prodotte dal tessuto midollare (Pineau et al, 2007) e possono quindi giocare un ruolo molto importante in seguito al trauma spinale. E' noto infatti che la somministrazione esogena di differenti tipi di citochine è in grado di migliorare il recupero funzionale in seguito a trauma spinale (Giehl and Tetzlaff, 1996; Ruitenbergh et al, 2004; Sayer et al, 2002) e infatti l'aumento del recupero motorio promosso dalle NSCs adulte è accompagnato da un significativo aumento dell'espressione di citochine (Bottai et al, 2008). L'aumento dell'espressione di fattori trofici in sede di lesione può non derivare direttamente dalle NSCs, poiché saggi effettuati in coltura *in vitro* hanno rivelato che c'è solo una bassa produzione di queste molecole (Pluchino et al, 2003). E' comunque possibile, che l'interazione delle cellule con l'ambiente della lesione possa avere aumentato la loro abilità di produrre fattori trofici (Sroga et al, 2003).

IL-6 è una delle principali citochine pro-infiammatorie la cui espressione aumenta notevolmente in seguito a SCI, questo aumento è stato associato ad un incremento di 6 volte dell'infiltrazione di neutrofili, e ad un espansione dell'area neurale danneggiata in seguito al danno (Lacroix et al, 2002); le PM-NPCs ne riducono

significativamente l'espressione in fase acuta di lesione andando così a diminuire il danno tissutale, tuttavia, a 7 giorni dalla lesione quando l'evento acuto si è ormai risolto, gli animali trattati con e cellule mostrano un'espressione di questa citochina che è significativamente aumentata rispetto agli animali trattati con PBS. Questo dato è concorde con alcuni risultati riscontrati in letteratura che mostrano che in aggiunta al coinvolgimento di IL-6 nella fase iniziale della risposta infiammatoria, essa può anche influenzare direttamente e/o indirettamente la sopravvivenza neuronale (Marz et al, 1999). Inoltre, IL-6 è stata dimostrata anche avere effetti neuroprotettivi (Loddick et al, 1998; Allan and Rothwell, 2001) e promuovere la rigenerazione e lo sprouting assonale (Hakkoum et al, 2007). Questa citochina ha dunque un effetto neurotossico in fase acuta di danno dove la sua attività viene antagonizzata dalle PM-NPCs, mentre in fase più tardiva ha un effetto positivo nei confronti del tessuto neurale e il trattamento con le cellule contribuisce ad aumentarne l'espressione.

La produzione di TNF- $\alpha$  al sito di lesione aumenta in pochissimo tempo dalla lesione e la sua attività è implicata nel danno di tipo secondario a molteplici livelli e tramite diversi pathway (Wang et al, 1996; Liefner et al., 2000; Paterniti et al, 2009); infatti i suoi livelli di espressione si aumentano molto negli animali trattati con PBS, mentre il trattamento con le PM-NPCs ne mantiene l'espressione in fase di danno acuto a livelli significativamente più bassi il che concorre a ridurre gli effetti del danno secondario. A una settimana dal danno però, i topi trattati con le cellule mostrano valori di TNF- $\alpha$  più elevati rispetto agli animali trattati con PBS; questo potrebbe in parte spiegare i miglioramenti riscontrati con la PM-NPCs poiché è stato dimostrato che: il TNF- $\alpha$  ha anche un effetto neuroprotettivo (Shohami et al, 1999) ed è indirettamente coinvolto nella sopravvivenza neuronale mediante stimolo alla produzione di fattori neurotrofici come l'NGF (Hattori et al, 1993) e il BDNF (Saha et al, 2006).

Il TNF- $\alpha$  è risaputo anche essere implicato nei processi di mielinizzazione e demielinizzazione, quindi il miglioramento del recupero motorio potrebbe anche essere in parte dovuto all'effetto che il TNF- $\alpha$  promuove sulla rimielinizzazione degli assoni sopravvissuti nell'area di lesione (Arnett et al, 2001; Huang et al,



2002). Questa ipotesi è supportata dalla riduzione del grado di recupero motorio osservata in seguito a trauma del CNS in topi KO per l'espressione di TNF- $\alpha$  o del suo recettore (Sullivan et al, 1999).

Anche il LIF è una citochina che è stata dimostrata avere effetti pro-infiammatori ed è considerata uno dei più potenti mediatori della fase iniziale della risposta infiammatoria in seguito a danno del CNS; è stata dimostrata essere fondamentale per il reclutamento iniziale di macrofagi e neutrofili (Sugiura et al, 2000) ed una delle molecole principali che regola la risposta della glia in seguito a danno corticale (Sugiura et al, 2000). Anche in questo caso il trattamento con le PM-NPCs ne riduce notevolmente l'espressione nelle prime ore dopo il trauma midollare andando ancora una volta ad antagonizzare un effetto dannoso sul tessuto midollare. Come accade però con IL-6 e TNF- $\alpha$ , anche il LIF una volta esaurita la fase acuta del danno mantiene un'espressione più elevata negli animali trattati con le cellule rispetto a quelli trattati con PBS, e anche in questo caso, dati in letteratura supportano i nostri dati in quanto è stato dimostrato che la somministrazione di LIF esogeno porta una volta esaurita la fase acuta della lesione ad un arresto della morte degli oligodendrociti attraverso una upregolazione di molecole anti-apoptotiche e ad una downregolazione di quelle pro-apoptotiche; con conseguente diminuzione della demielinizzazione e quindi riduzione delle molecole inibitorie della crescita assonale (Azari et al, 2006).

Abbiamo quindi osservato che 3 importanti molecole pro-infiammatorie come IL-6, TNF- $\alpha$  e LIF hanno un effetto negativo in fase acuta dopo la lesione, ma risultano invece molto importanti per la fase successiva in cui possono partecipare a processi neuroprotettivi e rigenerativi. Il trattamento con le PM-NPCs regola perfettamente l'attività di queste citochine, andando a ridurre l'espressione quando esse hanno un effetto dannoso sul tessuto neurale e promuovendola invece quando possono dare un contributo positivo.

MIP 2 è uno dei principali fattori chemiotattici e di attivazione per i neutrofili. La sua overproduzione all'interno del midollo spinale danneggiato è associata all'infiltrazione dei neutrofili indicando che questo mediatore gioca un ruolo chiave nel reclutamento delle cellule infiammatorie in seguito a SCI (Bethea et al, 2000;

Gris et al, 2004). In fase acuta dopo la lesione l'espressione MIP 2 aumenta in maniera considerevole rispetto ai controlli, com'è già noto dalla letteratura; il trattamento con PM-NPCs antagonizza quest'aumento in maniera eclatante, mantenendo i livelli di espressione della citochina a valori simili agli animali controllo; in accordo con il dato morfologico precedentemente riscontrato analizzando l'invasione dei neutrofili. L'effetto inibitorio delle cellule su MIP 2 è mantenuto anche a 1 settimana dalla lesione sebbene a questi tempi l'infiltrazione neutrofilica abbia già abbondantemente superato il suo picco e quindi l'effetto riscontrato risulta essere meno marcato.

BDNF è una neurotropina che ha effetti neuroprotettivi *in vivo* (Novikova et al, 2000) e stimola la ricrescita assonale (Oudega and Hagg, 1999; Zhou and Shine, 2003). E' stato dimostrato che la somministrazione locale di BDNF può revertire l'atrofia dei corpi cellulari neuronali nel nucleo rosso indotta dalla SCI (Ruitenbergh et al, 2004) e che esso può anche prevenire la degenerazione delle fibre sensoriali ascendenti (Sayer et al, 2002).

Il trattamento con PM-NPCs porta ad un significativo aumento nell'espressione di BDNF in fase acuta del danno, mentre a tempi più tardivi non abbiamo trovato differenze nei due tipi di trattamenti.

Anche l'NGF è un'importante neurotropina che è molto importante per i processi di sopravvivenza (Cao et al, 2002) e rigenerazione (Oudega and Hagg, 1996) neuronale che si instaurano in seguito a trauma al SNC; ed è stato dimostrato essere efficace anche quando somministrato in fase cronica di lesione (Grill et al, 1997). La sua espressione è sempre aumentata in seguito a lesione del midollo spinale (Brown et al, 2004), e infatti, in fase acuta non abbiamo riscontrato differenze significative negli animali trattati con PBS rispetto a quelli trattati con le cellule; probabilmente l'aumento nell'espressione di questa citochina, almeno nelle prime fasi della lesione è un meccanismo fisiologico con cui il tessuto neurale cerca di auto-proteggersi e di ridurre per quanto possibile l'entità del danno e quindi anche l'aggiunta di trattamenti esterni non riesce ad incrementarne ulteriormente l'espressione. In fase più tardiva abbiamo osservato come il trattamento con le PM-NPCs mantenga l'espressione dell'NGF a valori più elevati, il che probabilmente contribuisce all'effetto rigenerativo che abbiamo riscontrato.

Le PM-NPCs si sono quindi rivelate un valido strumento terapeutico per il trattamento della lesione spinale, che scavalca non solo i problemi etici legati all'uso di cellule staminali embrionali, ma che riduce notevolmente il danno tissutale dovuto alla degenerazione secondaria in seguito al danno meccanico. Esse, infatti, migrando al sito di lesione, modulano l'infiammazione, recuperano parzialmente l'architettura istologica del midollo, promuovono la formazione di un microambiente idoneo alla ricrescita e concretamente contribuiscono ad essa, differenziandosi in neuroni e ripristinando il network nervoso tipico del tessuto midollare.

L'accertamento preclinico della sicurezza e dell'efficacia di questi nuovi approcci terapeutici basati sul trapianto di cellule staminali, è la via giusta per riuscire a spingere questo tipo di terapia sempre più vicino alla sperimentazione clinica. Ad ogni modo, parametri importanti come il meccanismo che porta alla guarigione/miglioramento e il protocollo di trattamento ottimale devono essere elucidati, e questo riguardo, l'imaging cellulare e molecolare può dare un contributo molto importante alla causa.

Queste tecniche possono permettere una valutazione precoce ed accurata di alcune importanti variabili implicate nell'efficacia finale del trattamento; ad esempio, lo studio dell'homing cellulare verso il tessuto bersaglio, nella terapia cellulare in seguito a lesione del midollo spinale, effettuato utilizzando tecniche di imaging, può consentire di ottenere una valutazione dinamica della correlazione tra la localizzazione delle cellule in sede di lesione (o perilesione) ed il recupero motorio degli animali lesionati. Infatti, metodologie di imaging non invasive sono state recentemente sviluppate per tracciare in vivo, le cellule trapiantate che erano state precedentemente marcate in maniera opportuna (Lecchi e t al, 2007). Queste tecniche di imaging consentono di monitorare: la distribuzione; la migrazione e la localizzazione delle cellule introdotte in un modello sperimentale vivente. La possibilità di monitorare in vivo le cellule una volta trapiantate, può consentirci di rispondere ad alcune domande cruciali: 1) Se le cellule vengono iniettate endovena, dove vanno a finire? 2) Se impiantate direttamente nel tessuto, le cellule rimangono nel sito di impianto o migrano invece al tessuto bersaglio? 3) Una volta raggiunto il tessuto/organo bersaglio, le cellule come interagiscono con il

microambiente e con le cellule residenti? 4) Quanto sopravvivono le cellule una volta trapiantate? 5) Le cellule trapiantate differenziano nel tessuto di interesse? La marcatura delle cellule può essere effettuata attraverso due differenti strategie: diretta o indiretta. Date le difficoltà che sono implicate nella manipolazione genetica delle cellule per utilizzo clinico, in questo studio abbiamo utilizzato un protocollo di marcatura diretta delle cellule basato sull'utilizzo di reagenti approvati per l'uso clinico. Esistono già infatti, numerose procedure diagnostiche utilizzate in clinica che prevedono la marcatura di cellule autologhe o l'utilizzo di molecole radioattive, la cui localizzazione può essere identificata utilizzando strumenti diagnostici standard. Ad ogni modo, l'utilizzo di molecole radio-emettitrici limita il campo di applicazioni di queste procedure; il segnale infatti, si mantiene rilevabile solo per un breve periodo di tempo che dipenda dal tempo di dimezzamento del radionuclide utilizzato; inoltre, se applicata nel contesto dei trattamenti clinici cellulo-mediati, i dati ottenuti da questo tipo di tecnologia di imaging sarebbe in grado di fornirci solo informazioni iniziali sulla corretta somministrazione delle cellule e sulla distribuzioni iniziale di quest'ultime nell'organismo. Per queste ragioni, è necessario identificare e testare un metodo di marcatura più stabile, anche per le applicazioni cliniche, con lo scopo di consentire la localizzazione delle cellule marcate anche nel lungo periodo. Tra gli agenti di contrasto già approvati nell'uso clinico, le piccole particelle paramagnetiche che sono in grado di produrre un segnale in MRI (agenti marcanti basati sul ferro o sul gadolinio) sono già state testate per applicazioni di imaging cellulare (Meng et al, 2011; Libani et al, 2011, Kraitchman et al, 2011; Son et al, 2010) e saranno probabilmente destinate a diventare uno strumento sempre più importante nella valutazione di numerosi trattamenti cellulo-mediati. Per questo motivo, abbiamo dimostrato la possibilità di marcare efficientemente e in maniera non tossica le PM-NPCs con particelle paramagnetiche; in particolare, sono state utilizzate nanoparticelle superparamagnetiche (SPIOs) (nome commerciale Endorem®) come agente di contrasto e protamina solfato (PrS) come agente carrier per facilitare l'ingresso delle SPIOs nelle cellule; entrambi questi agenti hanno il vantaggio di essere già autorizzati nell'uso clinico. Esperimenti su dose-risposta e sui tempi di incubazione ci hanno consentito di ottimizzare il processo di marcatura in modo tale da ottenere una marcatura cellulare che fosse il più

possibile omogenea ed efficiente, ma anche non tossica per le PM-NPCs. Per le cellule utilizzate in questo studio, le condizioni di marcatura ottimali tra tutte quelle testate si sono rivelate essere: incubazione con 200 µg ferro/ml terreno e tempo di incubazione di 24h con l'utilizzo di PrS (rapporto Fe/PrS 1:0.025) come agente trasfettante. Questo protocollo di marcatura che utilizza le concentrazioni di reagenti appena descritte rappresenta il miglior compromesso possibile tra grado di marcatura delle cellule e vitalità cellulare alla fine dell'incubazione, fra tutte le diverse concentrazioni utilizzate. Infatti, a queste condizioni abbiamo ottenuto una marcatura delle cellule che è superiore al 70%, e anche la qualità della marcatura risulta essere ottimale, in quanto l'analisi effettuata con la colorazione di PERL che mette in evidenza il ferro, mostra come esso sia per la maggior parte internalizzato dalle PM-NPCs e non semplicemente attaccato alla membrana cellulare. Questo è un aspetto importante nell'ottica di un utilizzo in vivo di queste cellule, poiché se l'agente marcante che verrà poi visualizzato mediante RM si trova all'interno delle cellule, sarà possibile associare il segnale rilevato con la presenza delle cellule marcate, inoltre, un eventuale differenziamento delle cellule in vivo non porterebbe ad una perdita del segnale ed esse potrebbero ancora essere rilevate mediante RM.

Questo protocollo di marcatura ha inoltre un altro vantaggio, la vitalità delle PM-NPCs alla fine del processo si mantiene a livelli molto elevati (> 90%), indicando che la quantità di ferro non è particolarmente tossica e consente quindi la sopravvivenza delle cellule che possono essere visualizzate in vivo anche dopo un lungo periodo di tempo.

Dopo avere verificato la non tossicità e la funzionalità della marcatura, è stato valutato se tutto il procedimento non avesse in qualche modo alterato le proprietà fisiologiche di staminalità delle PM-NPCs, le cellule sono state dunque ripiastrate subito dopo la marcatura e tenute in coltura il tempo necessario per poter dare luogo a neurosfere; in parallelo sono state piastrate anche PM-NPCs che non hanno subito il procedimento di marcatura ed è stata valutata per entrambe la capacità di generare neurosfere. In entrambi i casi le neurosfere sono cresciute nello stesso tempo e con morfologia paragonabile; questo indica che la marcatura con ENDOREM non ha influenzato la capacità proliferativa delle PM-NPCs.

Subito dopo la marcatura è stata effettuata sulle PM-NPCs marcate con ENDOREM anche un'analisi di immunofluorescenza per nestina, un tipico marcatore di staminalità per le NSCs e la maggior parte delle cellule è risultata positiva per l'anticorpo; questo dimostra che anche le caratteristiche di staminalità delle PM-NPCs non vengono influenzate in maniera significativa dal procedimento di marcatura.

L'ultimo parametro analizzato è stato la capacità delle PM-NPCs marcate con ENDEROM di andare incontro ad un classico differenziamento neurale; le cellule sono state messe in condizioni che inducessero il differenziamento per 7 giorni e poi è stata effettuata un'analisi di immunofluorescenza per verificare la capacità differenziativa nei 3 classici tipi cellulari neurali. Le reazioni di immunofluorescenza hanno mostrato che le PM-NPCs anche dopo la marcatura con ENDOREM risultano positive per TUJ-1 (differenziamento in senso neuronale), GFAP (differenziamento in senso astrocitario) e GalC (differenziamento in senso oligodendrocitario); anche in questo caso abbiamo dunque verificato che il procedimento di marcatura non influisce con le caratteristiche fisiologiche delle PM-NPCs.

Sulla base di questi risultati, possiamo quindi affermare che le Endorem® possono essere efficacemente utilizzate per marcare le PM-NPCs senza alterarne le proprietà così da poter essere utilizzate in un protocollo terapeutico che preveda anche l'analisi in vivo mediante MRI.

Il problema principale nella messa a punto di un protocollo di imaging per la valutazione di un trattamento cellulo-mediato è la necessità di riuscire a visualizzare con il metodo di rilevazione anche delle quantità molto piccole di cellule nel tessuto/organo bersaglio.

Molti studi hanno descritto MRI di differenti tipi di cellule staminali iniettati per via intraspinale o endovenosa, in modelli murini di trauma al midollo spinale sia in topi che in ratti. In particolare, uno studio di Syková e colleghi (Syková et al, 2005), ha riportato che cellule staminali mesenchimali (MSCs), in seguito ad iniezione endovenosa in ratti con lesione midollare, potessero essere visualizzati mediante MRI sono nel tessuto ex vivo a causa della presenza, nel modello vivente, del rumore di fondo nella zona toracica in cui c'è la sede di lesione dovuto alla

respirazione dell'animale (Jendelová et al, 2004; Syková et al, 2005). Un altro studio molto recente pubblicato da Gonzalez-Lara e colleghi hanno dimostrato per la prima volta come sia possibile effettuare un'analisi di MRI in vivo nel midollo spinale di un topo lesionato; anche se, questa tecnica è riuscito a rivelare un segnali di MRI solo nelle cellule marcate con particelle ferrose iniettate intraspinalmente. Questo studio descrive in maniera molto interessante come la regione di segnale ipointenso modifica il suo volume al passare del tempo in maniera diversa a seconda dell'evento che l'ha originato (cellule vive, cellule morte, particelle di ferro libero) (Gonzalez-Lara et al, 2010).

Nel nostro lavoro, siamo riusciti ad utilizzare l'MRI in vivo per valutare la localizzazione delle cellule trapiantate in un modello murino di lesione spinale in seguito a somministrazione per via endovenosa.

Prima di tutto gli animali sono stati sottoposti a trapianto intramidollare di cellule, per vedere se le PM-NPCs marcate, inserite direttamente in sede di lesione fossero rilevabili mediante MRI, il segnale è stato rilevato e si mantiene per tutto il periodo di osservazione; anche l'analisi ex-vivo effettuata sui midolli estratti e colorati con prussian blu mostra la presenza del ferro delle ENDOREM all'interno delle cellule in sede di lesione quindi siamo passati all'iniezione per via endovenosa che era il nostro obiettivo iniziale.

Gli animali lesionati e trapiantati con le cellule sono stati sottoposti a RM a tempi successivi dal trapianto, poiché studi precedenti effettuati nel nostro laboratorio hanno dimostrato che le PM-NPCs non marcate con ENDOREM e trapiantate nel nostro modello murino di trauma spinale contusivo, hanno tropismo per la sede di lesione e sono in grado di sopravvivere all'interno dell'area danneggiata anche per lunghi periodi di tempo (Marfia et al, dati non pubblicati); le PM-NPCs dopo marcatura con ENDOREM dovrebbero quindi consentire la loro visualizzazione in vivo per lo stesso periodo di tempo.

I dati ottenuti mostrano come effettivamente in zona di lesione, a livello dorsale vi sia un segnale ipointenso dovuto alla presenza di ferro che si osserva fino a 6 settimane dopo il trapianto, che è il periodo di tempo più lungo fin'ora osservato, il segnale è stato osservato in tutti gli animali lesionati e trapiantati con le PM-NPCs marcate e si ritrova maggiormente sempre a livello dell'epicentro di lesione;

riconoscibile sia dal restringimento del midollo che dalla mancanza delle vertebre asportate durante l'operazione.

Le immagini mostrano anche come il segnale ipointenso maggiore sia a livello dell'epicentro di lesione, ma non rimane localizzato solamente in quel punto, si vede un segnale anche a livello rostrale e caudale di esso che diminuisce sempre di più fino a sparire mano a mano che ci si allontana dall'epicentro.

L'analisi con RM mostra anche un segnale iperintenso sempre a livello dell'epicentro di lesione, ma in questo caso localizzato a livello ventrale; un segnale di questo tipo è indice di una sostanza ricca di acqua e in questo caso potrebbe trattarsi di un accumulo di liquor. Questo potrebbe essere dovuto alla combinazione di due eventi: la riduzione dello spessore midollare che è massima nel punto di impatto del pistone e la formazione della cicatrice gliale (Bottai et al, 2008) a livello dorsale del midollo che tende a mantenerlo attaccato al tessuto fibroso che si è formato intorno alla sede della lesione; l'effetto finale di questi due eventi porta ad un sollevamento del midollo verso la parte dorsale della colonna vertebrale con conseguente aumento dello spazio subaracnoideo ventrale che consentirebbe quindi l'accumulo del liquor proprio sotto la lesione che darebbe poi quel segnale iperintenso rilevato dalla RM.

Il segnale ipointenso rilevato si mantiene per tutto il periodo di osservazione con solo una debole riduzione dell'intensità al passare del tempo; questo implica che le cellule giunte in sede di lesione sono per la maggior parte ancora vitali dato che in caso contrario le cellule morte avrebbero liberato il ferro che sarebbe stato poi catabolizzato dai meccanismi fisiologici deputati a questo processo venendo quindi rimosso dalla sede di lesione e andando perciò a diminuire il segnale rilevabile in RM.

Dopo 4, 5 o 6 settimane dalla lesione e dal trapianto, gli animali sono stati sacrificati per analizzare sempre mediante RM il midollo spinale ex vivo in modo tale da poter confrontare i dati ottenuti con l'analisi in vivo.

Anche nelle analisi ex vivo è stata riscontrata la presenza di un segnale ipointenso nella stessa zona in cui si era visto in vivo, cioè nella parte dorsale del midollo all'altezza della zona di lesione. Questo dato conferma che il dato ottenuto in precedenza nell'animale vivo era effettivamente dovuto alla presenza del ferro e



non semplicemente un artefatto o un falso positivo dovuto alla tecnica utilizzata per rilevare il segnale.

La RM ex vivo inoltre non mostra più il segnale iperintenso che si vedeva in vivo, questo dimostra che esso si trattava effettivamente di un accumulo di liquido che molto probabilmente era liquor e che una volta estratto il midollo dalla colonna vertebrale è andato perso in quanto era un accumulo extramidollare e non intramidollare.

Dopo avere dimostrato che il segnale ipointenso rilevato in RM fosse effettivamente un segnale dovuto ad un accumulo di ferro, siamo andati a verificare che questo ferro fosse effettivamente all'interno delle cellule e se esse fossero ancora vitali; o se invece fosse semplicemente un accumulo fuoriuscito dalle PM-NPCs morte e poi rimasto in zona di lesione.

Analisi immunoistochimiche sono state effettuate sui midolli dei topi trapiantati con PM-NPCs marcate con ENDOREM utilizzando la colorazione di PERL precedentemente descritta, i risultati ottenuti mostrano che la positività per la colorazione si ritrova all'interno di cellule con una morfologia tondeggiante che è classica delle cellule di tipo staminale indifferenziato, esse somigliano molto alle PM-NPCs iniettate e si ritrovano principalmente in piccoli aggregati in zona di lesione ma anche in zona peri-lesione.

Sono state trovate anche cellule contenenti ferro ma di morfologia tipicamente neurale, con numerosi processi e ramificazioni; poiché anche in queste cellule il segnale dovuto alla colorazione di PERL è chiaramente visibile ed è intracellulare, possiamo supporre che esse siano le PM-NPCs iniettate che una volta giunte nell'area di lesione si sono differenziate quantomeno in senso morfologico in cellule di tipo neurale.

Questa è un'ulteriore conferma del fatto che le PM-NPCs marcate con ENDOREM e poi iniettate raggiungono la sede di lesione e non solo, una volta arrivate li riescono a sopravvivere e anche a differenziare, confermando definitivamente che il segnale ottenuto in RM era dovuto al ferro presente nelle cellule e che queste cellule anche a diverse settimane dal trapianto erano ancora vitali.

I dati ottenuti dimostrano che, nonostante le difficoltà nel trovare un piano di acquisizione adeguato per visualizzare al meglio l'intera colonna midollare dovute

alla scogliosi causata sia dalla laminectomia che dal trauma; l'analisi in MRI è in grado di rilevare l'accumulo di PM-NPCs all'interno del tessuto di interesse in maniera estremamente sensibile e fornendo inoltre delle immagini contenenti importanti dettagli anatomici per la valutazione della localizzazione cellulare nel sito di lesione. In particolare, le sequenze RARE sottolineano il restringimento del midollo spinale a tre settimane dalla lesione, con il conseguente aumento del segnale iperintenso rilevato a causa dell'accumulo di liquor che si ha a livello del sito di lesione dove il midollo si è ristretto e quindi vi è più spazio tra esso e il canale vertebrale per consentirne l'accumulo. Questo dato potrebbe essere utilizzato per valutare l'efficacia del trattamento cellulare nel ridurre il danno midollare andando a rapportare il valore del segnale iperintenso con l'integrità ed il diametro del midollo.

L'MRI mostra un'elevata omogeneità del segnale ipointenso in tutti gli animali trapiantati per via endovenosa, a dimostrazione che il protocollo di somministrazione delle cellule marcate è altamente riproducibile.

Ulteriori esperimenti in futuro, avranno lo scopo di quantificare il volume del segnale ipointenso al passare del tempo, per cercare di correlare il dato numerico ottenuto al numero di cellule marcate che raggiungono il sito di lesione. In questo modo si cercherà di valutare se ci sia una correlazione tra l'eventuale recupero della funzionalità motoria degli animali lesionati con l'accumulo delle cellule marcate in sede di lesione. In questi primi esperimenti, il nostro scopo è stato quello di capire se ci fosse una reale possibilità di effettuare un'analisi di imaging in vivo utilizzando delle NSCs (PM-NPCs) per un trattamento cellulo-mediato di una lesione midollare utilizzando un protocollo di trattamento che prevede l'utilizzo di reagenti già approvati per l'uso clinico.

# CONCLUSIONI

## 7. Conclusioni

In conclusione abbiamo dimostrato che il trattamento con PM-NPCs è in grado di limitare gli effetti della degenerazione secondaria alla lesione traumatica del midollo spinale attraverso un significativo contenimento dell'area interessata dal processo neurodegenerativo e alla preservazione della sostanza bianca sia rostralmente che caudalmente alla lesione.

Le PM-NPCs hanno anche un importante effetto anti-infiammatorio che si esplica con una forte riduzione della gliosi reattiva e una diminuzione dell'infiltrazione di neutrofili e macrofagi nell'area di lesione. Le PM-NPCs modulano inoltre l'espressione delle citochine riducendo quelle delle citochine pro-infiammatorie e aumentando quella delle citochine con funzione neurotrofica/anti-infiammatoria. Il trattamento con queste cellule del midollo lesio promuove quindi la formazione di un ambiente favorevole che porta al differenziamento neuronale delle cellule stesse e ad una vigorosa rigenerazione assonale che passa il sito di lesione come dimostrato mediante l'iniezione di fluororuby a livello cervicale del tratto cortico spinale. Infatti, gli animali trattati con le cellule mostrano un maggior numero di assoni con il tracciante in posizione caudale alla lesione ad indicare una significativa ricrescita assonale attraverso il sito di lesione.

L'analisi *in vivo* effettuata mediante risonanza magnetica dopo marcatura delle cellule con SPIOs permette di visualizzarne il segnale in tempo reale e conferma che le PM-NPCs hanno tropismo per la lesione, dove vanno ad accumularsi.

I molteplici effetti che hanno le PM-NPCs sul danno midollare portano quindi ad un buon risultato terapeutico che si esplica in un significativo miglioramento del recupero della funzionalità motoria.

# **BIBLIOGRAFIA**

## 7. Bibliografia

- Abematsu, M., Tsujimura, K., Yamano, M., Saito, M., Kohno, K., Kohyama, J., Namihira, M., Komiya, S. & Nakashima, K. (2010) Neurons derived from transplanted neural stem cells restore disrupted neuronal circuitry in a mouse model of spinal cord injury. *J Clin Invest*, **120**, 3255-3266.
- Ackery, A., Tator, C. & Krassioukov, A. (2004) A global perspective on spinal cord injury epidemiology. *J Neurotrauma*, **21**, 1355-1370.
- Allan, S.M. & Rothwell, N.J. (2001) Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*, **2**, 734-744.
- Aoki, I., Takahashi, Y., Chuang, K.H., Silva, A.C., Igarashi, T., Tanaka, C., Childs, R.W. & Koretsky, A.P. (2006) Cell labeling for magnetic resonance imaging with the T1 agent manganese chloride. *NMR Biomed*, **19**, 50-59.
- Arbab, A.S., Yocum, G.T., Kalish, H., Jordan, E.K., Anderson, S.A., Khakoo, A.Y., Read, E.J. & Frank, J.A. (2004) Efficient magnetic cell labeling with protamine sulfate complexed to ferumoxides for cellular MRI. *Blood*, **104**, 1217-1223.
- Azari, M.F., Profyris, C., Karnezis, T., Bernard, C.C., Small, D.H., Cheema, S.S., Ozturk, E., Hatzinisiriou, I. & Petratos, S. (2006) Leukemia inhibitory factor arrests oligodendrocyte death and demyelination in spinal cord injury. *J Neuropathol Exp Neurol*, **65**, 914-929.
- Bae, K.H., Lee, K., Kim, C. & Park, T.G. (2011) Surface functionalized hollow manganese oxide nanoparticles for cancer targeted siRNA delivery and magnetic resonance imaging. *Biomaterials*, **32**, 176-184.
- 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.
- Bambakidis, N.C. & Miller, R.H. (2004) Transplantation of oligodendrocyte precursors and sonic hedgehog results in improved function and white matter sparing in the spinal cords of adult rats after contusion. *Spine J*, **4**, 16-26.
- Bao, F. & Liu, D. (2003) Peroxynitrite generated in the rat spinal cord induces apoptotic cell death and activates caspase-3. *Neuroscience*, **116**, 59-70.
- Barakat, D.J., Gaglani, S.M., Neravetla, S.R., Sanchez, A.R., Andrade, C.M., Pressman, Y., Puzis, R., Garg, M.S., Bunge, M.B. & Pearce, D.D. (2005) Survival, integration, and axon growth support of glia transplanted into the chronically contused spinal cord. *Cell Transplant*, **14**, 225-240.

- Barbeau, H. & Rossignol, S. (1991) Initiation and modulation of the locomotor pattern in the adult chronic spinal cat by noradrenergic, serotonergic and dopaminergic drugs. *Brain Res*, **546**, 250-260.
- 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**, 635-659.
- Baumjohann, D., Hess, A., Budinsky, L., Brune, K., Schuler, G. & Lutz, M.B. (2006) In vivo magnetic resonance imaging of dendritic cell migration into the draining lymph nodes of mice. *Eur J Immunol*, **36**, 2544-2555.
- Beattie, M.S., Farooqui, A.A. & Bresnahan, J.C. (2000) Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury. *J Neurotrauma*, **17**, 915-925.
- 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. (2002a) ProNGF induces p75-mediated death of oligodendrocytes following spinal cord injury. *Neuron*, **36**, 375-386.
- Beattie, M.S., Hermann, G.E., Rogers, R.C. & Bresnahan, J.C. (2002b) Cell death in models of spinal cord injury. *Prog Brain Res*, **137**, 37-47.
- Beirowski, B., Adalbert, R., Wagner, D., Grumme, D.S., Addicks, K., Ribchester, R.R. & Coleman, M.P. (2005) The progressive nature of Wallerian degeneration in wild-type and slow Wallerian degeneration (WldS) nerves. *BMC Neurosci*, **6**, 6.
- Bethea, J.R. (2000) Spinal cord injury-induced inflammation: a dual-edged sword. *Prog Brain Res*, **128**, 33-42.
- Bethea, J.R., Nagashima, H., Acosta, M.C., Briceno, C., Gomez, F., Marcillo, A.E., Loo, K., Green, J. & Dietrich, W.D. (1999) Systemically administered interleukin-10 reduces tumor necrosis factor-alpha production and significantly improves functional recovery following traumatic spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma*, **16**, 851-863.
- Blaustein, M.P., Goldman, W.F., Fontana, G., Krueger, B.K., Santiago, E.M., Steele, T.D., Weiss, D.N. & Yarowsky, P.J. (1991) Physiological roles of the sodium-calcium exchanger in nerve and muscle. *Ann N Y Acad Sci*, **639**, 254-274.
- Bose, P., Parmer, R., Reier, P.J. & Thompson, F.J. (2005) Morphological changes of the soleus motoneuron pool in chronic midthoracic contused rats. *Exp Neurol*, **191**, 13-23.
- Bottai, D., Cigognini, D., Madaschi, L., Adami, R., Nicora, E., Menarini, M., Di Giulio, A.M. & Gorio, A. (2010) Embryonic stem cells promote motor recovery and affect inflammatory cell infiltration in spinal cord injured mice. *Exp Neurol*, **223**, 452-463.

- 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.
- Boutry, S., Brunin, S., Mahieu, I., Laurent, S., Vander Elst, L. & Muller, R.N. (2008) Magnetic labeling of non-phagocytic adherent cells with iron oxide nanoparticles: a comprehensive study. *Contrast Media Mol Imaging*, **3**, 223-232.
- Brosamle, C. & Schwab, M.E. (1997) Cells of origin, course, and termination patterns of the ventral, uncrossed component of the mature rat corticospinal tract. *J Comp Neurol*, **386**, 293-303.
- Brosamle, C. & Schwab, M.E. (2000) Ipsilateral, ventral corticospinal tract of the adult rat: ultrastructure, myelination and synaptic connections. *J Neurocytol*, **29**, 499-507.
- Brown, A., Ricci, M.J. & Weaver, L.C. (2004) NGF message and protein distribution in the injured rat spinal cord. *Exp Neurol*, **188**, 115-127.
- Brown, L.T. (1974) Rubrospinal projections in the rat. *J Comp Neurol*, **154**, 169-187.
- Bulte, J.W., Zhang, S., van Gelderen, P., Herynek, V., Jordan, E.K., Duncan, I.D. & Frank, J.A. (1999) Neurotransplantation of magnetically labeled oligodendrocyte progenitors: magnetic resonance tracking of cell migration and myelination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 15256-15261.
- Cao, X., Tang, C. & Luo, Y. (2002) Effects of nerve growth factor on N-methyl-D-aspartate receptor 1 after spinal cord injury in rats. *Chin J Traumatol*, **5**, 228-231.
- Casha, S., Yu, W.R. & Fehlings, M.G. (2001) Oligodendroglial apoptosis occurs along degenerating axons and is associated with FAS and p75 expression following spinal cord injury in the rat. *Neuroscience*, **103**, 203-218.
- Casha, S., Yu, W.R. & Fehlings, M.G. (2005) FAS deficiency reduces apoptosis, spares axons and improves function after spinal cord injury. *Exp Neurol*, **196**, 390-400.
- Cheng, B., Christakos, S. & Mattson, M.P. (1994) Tumor necrosis factors protect neurons against metabolic-excitotoxic insults and promote maintenance of calcium homeostasis. *Neuron*, **12**, 139-153.
- Chu, G.K., Yu, W. & Fehlings, M.G. (2007) The p75 neurotrophin receptor is essential for neuronal cell survival and improvement of functional recovery after spinal cord injury. *Neuroscience*, **148**, 668-682.
- Cizkova, D., Rosocha, J., Vanicky, I., Jergova, S. & Cizek, M. (2006) Transplants of human mesenchymal stem cells improve functional recovery after spinal cord injury in the rat. *Cell Mol Neurobiol*, **26**, 1167-1180.



- Coleman, M.P. & Perry, V.H. (2002) Axon pathology in neurological disease: a neglected therapeutic target. *Trends Neurosci*, **25**, 532-537.
- 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.
- De Vivo, M.J., Kirshblum, S., Camapgnolo, D.I., & De Lisa, J.A. (2002) Spinal cord medicine. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins p. 69-81.
- De Vries, I.J., Lesterhuis, W.J., Barentsz, J.O., Verdijk, P., van Krieken, J.H., Boerman, O.C., Oyen, W.J., Bonenkamp, J.J., Boezeman, J.B., Adema, G.J., Bulte, J.W., Scheenen, T.W., Punt, C.J., Heerschap, A. & Figdor, C.G. (2005) Magnetic resonance tracking of dendritic cells in melanoma patients for monitoring of cellular therapy. *Nat Biotechnol*, **23**, 1407-1413.
- Ditunno, J.F., Little, J.W., Tessler, A. & Burns, A.S. (2004) Spinal shock revisited: a four-phase model. *Spinal Cord*, **42**, 383-395.
- Donnelly, D.J. & Popovich, P.G. (2008) Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Exp Neurol*, **209**, 378-388.
- Doucette, R. (1991) PNS-CNS transitional zone of the first cranial nerve. *J Comp Neurol*, **312**, 451-466.
- Dumont, R.J., Okonkwo, D.O., Verma, S., Hurlbert, R.J., Boulos, P.T., Ellegala, D.B. & Dumont, A.S. (2001) Acute spinal cord injury, part I: pathophysiologic mechanisms. *Clin Neuropharmacol*, **24**, 254-264.
- Duncan, I.D. & Milward, E.A. (1995) Glial cell transplants: experimental therapies of myelin diseases. *Brain Pathol*, **5**, 301-310.
- Dutton, R.C., Carstens, M.I., Antognini, J.F. & Carstens, E. (2006) Long ascending propriospinal projections from lumbosacral to upper cervical spinal cord in the rat. *Brain Res*, **1119**, 76-85.
- Ehlers, M.D. (2004) Deconstructing the axon: Wallerian degeneration and the ubiquitin-proteasome system. *Trends Neurosci*, **27**, 3-6.
- Eidelberg, E., Nguyen, L.H., Polich, R. & Walden, J.G. (1989) Transsynaptic degeneration of motoneurons caudal to spinal cord lesions. *Brain Res Bull*, **22**, 39-45.
- Emery, E., Aldana, P., Bunge, M.B., Puckett, W., Srinivasan, A., Keane, R.W., Bethea, J. & Levi, A.D. (1998) Apoptosis after traumatic human spinal cord injury. *J Neurosurg*, **89**, 911-920.

- Feraboli-Lohnherr, D., Barthe, J.Y. & Orsal, D. (1999) Serotonin-induced activation of the network for locomotion in adult spinal rats. *J Neurosci Res*, **55**, 87-98.
- Firouzi, M., Moshayedi, P., Saberi, H., Mobasheri, H., Abolhassani, F., Jahanzad, I. & Raza, M. (2006) Transplantation of Schwann cells to subarachnoid space induces repair in contused rat spinal cord. *Neurosci Lett*, **402**, 66-70.
- Fitch, M.T. & Silver, J. (1997) Glial cell extracellular matrix: boundaries for axon growth in development and regeneration. *Cell Tissue Res*, **290**, 379-384.
- Fitch, M.T. & Silver, J. (2008) CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Exp Neurol*, **209**, 294-301.
- Fleming, J.C., Norenberg, M.D., Ramsay, D.A., Dekaban, G.A., Marcillo, A.E., Saenz, A.D., Pasquale-Styles, M., Dietrich, W.D. & Weaver, L.C. (2006) The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury. *Brain*, **129**, 3249-3269.
- Fouad, K. & Tse, A. (2008) Adaptive changes in the injured spinal cord and their role in promoting functional recovery. *Neurol Res*, **30**, 17-27.
- Fruchtman, S.M., Scigliano, E., Ross, V., Abramowitz, A., Lipton, J., Mandell, L. & Shank, B. (1994) Bone marrow transplantation at The Mount Sinai Hospital. *Mt Sinai J Med*, **61**, 3-12.
- Gassmann, M. & Hennet, T. (1998) From Genetically Altered Mice to Integrative Physiology. *News Physiol Sci*, **13**, 53-57.
- 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.
- Glunde, K., Pathak, A.P. & Bhujwalla, Z.M. (2007) Molecular-functional imaging of cancer: to image and imagine. *Trends Mol Med*, **13**, 287-297.
- Gonzalez-Lara, L.E., Xu, X., Hofstetrova, K., Pniak, A., Chen, Y., McFadden, C.D., Martinez-Santesteban, F.M., Rutt, B.K., Brown, A. & Foster, P.J. (2011) The use of cellular magnetic resonance imaging to track the fate of iron-labeled multipotent stromal cells after direct transplantation in a mouse model of spinal cord injury. *Mol Imaging Biol*, **13**, 702-711.
- 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., 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.

- 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.
- Grill, R.J., Blesch, A. & Tuszynski, M.H. (1997) Robust growth of chronically injured spinal cord axons induced by grafts of genetically modified NGF-secreting cells. *Exp Neurol*, **148**, 444-452.
- 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.
- Gritti, A., Parati, E.A., Cova, L., Frolichsthal, P., Galli, R., Wanke, E., Faravelli, L., Morassutti, D.J., Roisen, F., Nickel, D.D. & Vescovi, A.L. (1996) Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *J Neurosci*, **16**, 1091-1100.
- Hakkoum, D., Stoppini, L. & Muller, D. (2007) Interleukin-6 promotes sprouting and functional recovery in lesioned organotypic hippocampal slice cultures. *J Neurochem*, **100**, 747-757.
- Hall, E.D. & Braughler, J.M. (1993) Free radicals in CNS injury. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis*, **71**, 81-105.
- Hattori, A., Tanaka, E., Murase, K., Ishida, N., Chatani, Y., Tsujimoto, M., Hayashi, K. & Kohno, M. (1993) Tumor necrosis factor stimulates the synthesis and secretion of biologically active nerve growth factor in non-neuronal cells. *J Biol Chem*, **268**, 2577-2582.
- Herrmann, J.E., Imura, T., Song, B., Qi, J., Ao, Y., Nguyen, T.K., Korsak, R.A., Takeda, K., Akira, S. & Sofroniew, M.V. (2008) STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury. *J Neurosci*, **28**, 7231-7243.
- Hill, C.E., Beattie, M.S. & Bresnahan, J.C. (2001) Degeneration and sprouting of identified descending supraspinal axons after contusive spinal cord injury in the rat. *Exp Neurol*, **171**, 153-169.
- Ho, C.H., Wuermser, L.A., Priebe, M.M., Chiodo, A.E., Scelza, W.M. & Kirshblum, S.C. (2007) Spinal cord injury medicine. 1. Epidemiology and classification. *Arch Phys Med Rehabil*, **88**, S49-54.
- Jackson, A.B., Dijkers, M., Devivo, M.J. & Poczatek, R.B. (2004) A demographic profile of new traumatic spinal cord injuries: change and stability over 30 years. *Arch Phys Med Rehabil*, **85**, 1740-1748.
- Jacobs, R.E. & Cherry, S.R. (2001) Complementary emerging techniques: high-resolution PET and MRI. *Curr Opin Neurobiol*, **11**, 621-629.

- Jaeger, C.B. & Blight, A.R. (1997) Spinal cord compression injury in guinea pigs: structural changes of endothelium and its perivascular cell associations after blood-brain barrier breakdown and repair. *Exp Neurol*, **144**, 381-399.
- Jarratt, H. & Hyland, B. (1999) Neuronal activity in rat red nucleus during forelimb reach-to-grasp movements. *Neuroscience*, **88**, 629-642.
- Jendelova, P., Herynek, V., Urdzikova, L., Glogarova, K., Kroupova, J., Andersson, B., Bryja, V., Burian, M., Hajek, M. & Sykova, E. (2004) Magnetic resonance tracking of transplanted bone marrow and embryonic stem cells labeled by iron oxide nanoparticles in rat brain and spinal cord. *J Neurosci Res*, **76**, 232-243.
- Johnson, K.M., Tao, J.Z., Kennan, R.P. & Gore, J.C. (1998) Gadolinium-bearing red cells as blood pool MRI contrast agents. *Magn Reson Med*, **40**, 133-142.
- Jones, B.E. & Yang, T.Z. (1985) The efferent projections from the reticular formation and the locus coeruleus studied by anterograde and retrograde axonal transport in the rat. *J Comp Neurol*, **242**, 56-92.
- Joosten, E.A., Bar, P.R. & Gispen, W.H. (1995) Directional regrowth of lesioned corticospinal tract axons in adult rat spinal cord. *Neuroscience*, **69**, 619-626.
- Jordan, L.M. (1998) Initiation of locomotion in mammals. *Ann N Y Acad Sci*, **860**, 83-93.
- Jordan, L.M., Liu, J., Hedlund, P.B., Akay, T. & Pearson, K.G. (2008) Descending command systems for the initiation of locomotion in mammals. *Brain Res Rev*, **57**, 183-191.
- Kabatas, S. & Teng, Y.D. (2010) Potential roles of the neural stem cell in the restoration of the injured spinal cord: review of the literature. *Turk Neurosurg*, **20**, 103-110.
- Keane, R.W., Kraydieh, S., Lotocki, G., Bethea, J.R., Krajewski, S., Reed, J.C. & Dietrich, W.D. (2001) Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury. *J Neuropathol Exp Neurol*, **60**, 422-429.
- Kim, G.M., Xu, J., Song, S.K., Yan, P., Ku, G., Xu, X.M. & Hsu, C.Y. (2001) Tumor necrosis factor receptor deletion reduces nuclear factor-kappaB activation, cellular inhibitor of apoptosis protein 2 expression, and functional recovery after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci*, **21**, 6617-6625.
- Kim, W.K., Kan, Y., Ganea, D., Hart, R.P., Gozes, I. & Jonakait, G.M. (2000) Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide inhibit tumor necrosis factor-alpha production in injured spinal cord and in activated microglia via a cAMP-dependent pathway. *J Neurosci*, **20**, 3622-3630.

- Koshizuka, S., Okada, S., Okawa, A., Koda, M., Murasawa, M., Hashimoto, M., Kamada, T., Yoshinaga, K., Murakami, M., Moriya, H. & Yamazaki, M. (2004) Transplanted hematopoietic stem cells from bone marrow differentiate into neural lineage cells and promote functional recovery after spinal cord injury in mice. *J Neuropathol Exp Neurol*, **63**, 64-72.
- Kuchler, M., Fouad, K., Weinmann, O., Schwab, M.E. & Raineteau, O. (2002) Red nucleus projections to distinct motor neuron pools in the rat spinal cord. *J Comp Neurol*, **448**, 349-359.
- Kwon, B.K., Tetzlaff, W., Grauer, J.N., Beiner, J. & Vaccaro, A.R. (2004) Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *Spine J*, **4**, 451-464.
- Lacroix, S., Chang, L., Rose-John, S. & Tuszynski, M.H. (2002) Delivery of hyper-interleukin-6 to the injured spinal cord increases neutrophil and macrophage infiltration and inhibits axonal growth. *J Comp Neurol*, **454**, 213-228.
- Lecchi, M., Ottobriani, L., Martelli, C., Del Sole, A. & Lucignani, G. (2007) Instrumentation and probes for molecular and cellular imaging. *Q J Nucl Med Mol Imaging*, **51**, 111-126.
- Lewis, J.S., Achilefu, S., Garbow, J.R., Laforest, R. & Welch, M.J. (2002) Small animal imaging. current technology and perspectives for oncological imaging. *Eur J Cancer*, **38**, 2173-2188.
- Libani, I.V., Lucignani, G., Gianelli, U., Degrassi, A., Russo, M., Bosari, S., Clerici, M. & Ottobriani, L. (2011) Labeling Protocols for In Vivo Tracking of Human Skeletal Muscle Cells (HskMCs) by Magnetic Resonance and Bioluminescence Imaging. *Mol Imaging Biol*.
- Liefner, M., Siebert, H., Sachse, T., Michel, U., Kollias, G. & Bruck, W. (2000) The role of TNF-alpha during Wallerian degeneration. *J Neuroimmunol*, **108**, 147-152.
- Lipton, S.A. & Rosenberg, P.A. (1994) Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med*, **330**, 613-622.
- Liu, J. & Jordan, L.M. (2005) Stimulation of the parapyramidal region of the neonatal rat brain stem produces locomotor-like activity involving spinal 5-HT7 and 5-HT2A receptors. *J Neurophysiol*, **94**, 1392-1404.
- Livingston, J.N. (1999) Genetically engineered mice in drug development. *J Intern Med*, **245**, 627-635.
- Loddick, S.A., Turnbull, A.V. & Rothwell, N.J. (1998) Cerebral interleukin-6 is neuroprotective during permanent focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, **18**, 176-179.
- Lou, J., Lenke, L.G., Ludwig, F.J. & O'Brien, M.F. (1998) Apoptosis as a mechanism of neuronal cell death following acute experimental spinal cord injury. *Spinal Cord*, **36**, 683-690.

- Lu, J., Ashwell, K.W., Hayek, R. & Waite, P. (2001) Fluororuby as a marker for detection of acute axonal injury in rat spinal cord. *Brain Res*, **915**, 118-123.
- Lu, J., Ashwell, K.W. & Waite, P. (2000) Advances in secondary spinal cord injury: role of apoptosis. *Spine (Phila Pa 1976)*, **25**, 1859-1866.
- Lucignani, G., Ottobrini, L., Martelli, C., Rescigno, M. & Clerici, M. (2006) Molecular imaging of cell-mediated cancer immunotherapy. *Trends Biotechnol*, **24**, 410-418.
- Lutz, M.B., Kukutsch, N., Ogilvie, A.L., Rossner, S., Koch, F., Romani, N. & Schuler, G. (1999) An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods*, **223**, 77-92.
- Maier, I.C. & Schwab, M.E. (2006) Sprouting, regeneration and circuit formation in the injured spinal cord: factors and activity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **361**, 1611-1634.
- Maikos, J.T. & Shreiber, D.I. (2007) Immediate damage to the blood-spinal cord barrier due to mechanical trauma. *J Neurotrauma*, **24**, 492-507.
- Marfia, G., Madaschi, L., Marra, F., Menarini, M., Bottai, D., Formenti, A., Bellardita, C., Di Giulio, A.M., Carelli, S. & Gorio, A. (2011) Adult neural precursors isolated from post mortem brain yield mostly neurons: an erythropoietin-dependent process. *Neurobiol Dis*, **43**, 86-98.
- Marz, P., Heese, K., Dimitriades-Schmutz, B., Rose-John, S. & Otten, U. (1999) Role of interleukin-6 and soluble IL-6 receptor in region-specific induction of astrocytic differentiation and neurotrophin expression. *Glia*, **26**, 191-200.
- Massoud, T.F. & Gambhir, S.S. (2003) Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes Dev*, **17**, 545-580.
- Matsuyama, K., Mori, F., Nakajima, K., Drew, T., Aoki, M. & Mori, S. (2004) Locomotor role of the corticoreticular-reticulospinal-spinal interneuronal system. *Prog Brain Res*, **143**, 239-249.
- McAdoo, D.J., Hughes, M.G., Nie, L., Shah, B., Clifton, C., Fullwood, S. & Hulsebosch, C.E. (2005) The effect of glutamate receptor blockers on glutamate release following spinal cord injury. Lack of evidence for an ongoing feedback cascade of damage --> glutamate release --> damage --> glutamate release --> etc. *Brain Res*, **1038**, 92-99.
- McComas, A.J., Sica, R.E., Upton, A.R. & Aguilera, N. (1973) Functional changes in motoneurons of hemiparetic patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **36**, 183-193.
- McDonald, J.W., Becker, D., Sadowsky, C.L., Jane, J.A., Sr., Conturo, T.E. & Schultz, L.M. (2002) Late recovery following spinal cord injury. Case report and review of the literature. *J Neurosurg*, **97**, 252-265.

- McDonald, J.W. & Belegu, V. (2006) Demyelination and remyelination after spinal cord injury. *J Neurotrauma*, **23**, 345-359.
- Meng, X., Seton, H.C., Lu le, T., Prior, I.A., Thanh, N.T. & Song, B. (2011) Magnetic CoPt nanoparticles as MRI contrast agent for transplanted neural stem cells detection. *Nanoscale*, **3**, 977-984.
- Miller, M.W. (1987) The origin of corticospinal projection neurons in rat. *Exp Brain Res*, **67**, 339-351.
- Molcanyi, M., Riess, P., Bentz, K., Maegele, M., Hescheler, J., Schafke, B., Trapp, T., Neugebauer, E., Klug, N. & Schafer, U. (2007) Trauma-associated inflammatory response impairs embryonic stem cell survival and integration after implantation into injured rat brain. *J Neurotrauma*, **24**, 625-637.
- Moreno-Flores, M.T., Bradbury, E.J., Martin-Bermejo, M.J., Agudo, M., Lim, F., Pastrana, E., Avila, J., Diaz-Nido, J., McMahon, S.B. & Wandosell, F. (2006) A clonal cell line from immortalized olfactory ensheathing glia promotes functional recovery in the injured spinal cord. *Mol Ther*, **13**, 598-608.
- Myer, D.J., Gurkoff, G.G., Lee, S.M., Hovda, D.A. & Sofroniew, M.V. (2006) Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. *Brain*, **129**, 2761-2772.
- Nandoe Tewarie, R.S., Hurtado, A., Bartels, R.H., Grotenhuis, A. & Oudega, M. (2009) Stem cell-based therapies for spinal cord injury. *J Spinal Cord Med*, **32**, 105-114.
- Nashmi, R. & Fehlings, M.G. (2001) Changes in axonal physiology and morphology after chronic compressive injury of the rat thoracic spinal cord. *Neuroscience*, **104**, 235-251.
- Noble, L.J. & Wrathall, J.R. (1989) Distribution and time course of protein extravasation in the rat spinal cord after contusive injury. *Brain Res*, **482**, 57-66.
- Norenberg, M.D., Smith, J. & Marcillo, A. (2004) The pathology of human spinal cord injury: defining the problems. *J Neurotrauma*, **21**, 429-440.
- Novikova, L.N., Novikov, L.N. & Kellerth, J.O. (2000) Survival effects of BDNF and NT-3 on axotomized rubrospinal neurons depend on the temporal pattern of neurotrophin administration. *Eur J Neurosci*, **12**, 776-780.
- Oudega, M. & Hagg, T. (1996) Nerve growth factor promotes regeneration of sensory axons into adult rat spinal cord. *Exp Neurol*, **140**, 218-229.
- Oudega, M. & Hagg, T. (1999) Neurotrophins promote regeneration of sensory axons in the adult rat spinal cord. *Brain Res*, **818**, 431-438.

- Pagliacci, M.C., Celani, M.G., Zampolini, M., Spizzichino, L., Franceschini, M., Baratta, S., Finali, G., Gatta, G., Perdon, L. & Gruppo Italiano Studio Epidemiologico, M. (2003) An Italian survey of traumatic spinal cord injury. The Gruppo Italiano Studio Epidemiologico Mielolesioni study. *Arch Phys Med Rehabil*, **84**, 1266-1275.
- Park, E., Velumian, A.A. & Fehlings, M.G. (2004) The role of excitotoxicity in secondary mechanisms of spinal cord injury: a review with an emphasis on the implications for white matter degeneration. *J Neurotrauma*, **21**, 754-774.
- Parr, A.M., Kulbatski, I. & Tator, C.H. (2007a) Transplantation of adult rat spinal cord stem/progenitor cells for spinal cord injury. *J Neurotrauma*, **24**, 835-845.
- Parr, A.M., Tator, C.H. & Keating, A. (2007b) Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the repair of central nervous system injury. *Bone Marrow Transplant*, **40**, 609-619.
- Paterniti, I., Genovese, T., Crisafulli, C., Mazzon, E., Di Paola, R., Galuppo, M., Bramanti, P. & Cuzzocrea, S. (2009) Treatment with green tea extract attenuates secondary inflammatory response in an experimental model of spinal cord trauma. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **380**, 179-192.
- Pineau, I. & Lacroix, S. (2007) Proinflammatory cytokine synthesis in the injured mouse spinal cord: multiphasic expression pattern and identification of the cell types involved. *J Comp Neurol*, **500**, 267-285.
- Pluchino, S., Quattrini, A., Brambilla, E., Gritti, A., Salani, G., Dina, G., Galli, R., Del Carro, U., Amadio, S., Bergami, A., Furlan, R., Comi, G., Vescovi, A.L. & Martino, G. (2003) Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis. *Nature*, **422**, 688-694.
- Politi, L.S., Bacigaluppi, M., Brambilla, E., Cadioli, M., Falini, A., Comi, G., Scotti, G., Martino, G. & Pluchino, S. (2007) Magnetic-resonance-based tracking and quantification of intravenously injected neural stem cell accumulation in the brains of mice with experimental multiple sclerosis. *Stem Cells*, **25**, 2583-2592.
- Popovich, P.G., van Rooijen, N., Hickey, W.F., Preidis, G. & McGaughy, V. (2003) Hematogenous macrophages express CD8 and distribute to regions of lesion cavitation after spinal cord injury. *Exp Neurol*, **182**, 275-287.
- 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.
- Priebe, M.M., Chiodo, A.E., Scelza, W.M., Kirshblum, S.C., Wuermsler, L.A. & Ho, C.H. (2007) Spinal cord injury medicine. 6. Economic and societal issues in spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil*, **88**, S84-88.



- Quencer, R.M. & Bunge, R.P. (1996) The injured spinal cord: imaging, histopathologic clinical correlates, and basic science approaches to enhancing neural function after spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)*, **21**, 2064-2066.
- Raineteau, O., Fouad, K., Bareyre, F.M. & Schwab, M.E. (2002) Reorganization of descending motor tracts in the rat spinal cord. *Eur J Neurosci*, **16**, 1761-1771.
- Ramon-Cueto, A., Cordero, M.I., Santos-Benito, F.F. & Avila, J. (2000) Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia. *Neuron*, **25**, 425-435.
- Richter, M.W. & Roskams, A.J. (2008) Olfactory ensheathing cell transplantation following spinal cord injury: hype or hope? *Exp Neurol*, **209**, 353-367.
- Rowland, J.W., Hawryluk, G.W., Kwon, B. & Fehlings, M.G. (2008) Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurg Focus*, **25**, E2.
- 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.
- Saha, R.N., Liu, X. & Pahan, K. (2006) Up-regulation of BDNF in astrocytes by TNF-alpha: a case for the neuroprotective role of cytokine. *J Neuroimmune Pharmacol*, **1**, 212-222.
- Sakamoto, A., Ohnishi, S.T., Ohnishi, T. & Ogawa, R. (1991) Relationship between free radical production and lipid peroxidation during ischemia-reperfusion injury in the rat brain. *Brain Res*, **554**, 186-192.
- 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.
- Schaal, S.M., Kitay, B.M., Cho, K.S., Lo, T.P., Jr., Barakat, D.J., Marcillo, A.E., Sanchez, A.R., Andrade, C.M. & Pearse, D.D. (2007) Schwann cell transplantation improves reticulospinal axon growth and forelimb strength after severe cervical spinal cord contusion. *Cell Transplant*, **16**, 207-228.
- Schanne, F.A., Kane, A.B., Young, E.E. & Farber, J.L. (1979) Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. *Science*, **206**, 700-702.
- Schnell, L., Fearn, S., Schwab, M.E., Perry, V.H. & Anthony, D.C. (1999) Cytokine-induced acute inflammation in the brain and spinal cord. *J Neuropathol Exp Neurol*, **58**, 245-254.

- 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.
- Sekhon, L.H. & Fehlings, M.G. (2001) Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)*, **26**, S2-12.
- Setoguchi, T., Nakashima, K., Takizawa, T., Yanagisawa, M., Ochiai, W., Okabe, M., Yone, K., Komiya, S. & Taga, T. (2004) Treatment of spinal cord injury by transplantation of fetal neural precursor cells engineered to express BMP inhibitor. *Exp Neurol*, **189**, 33-44.
- Shohami, E., Ginis, I. & Hallenbeck, J.M. (1999) Dual role of tumor necrosis factor alpha in brain injury. *Cytokine Growth Factor Rev*, **10**, 119-130.
- Silver, J. & Miller, J.H. (2004) Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci*, **5**, 146-156.
- Son, K.R., Chung, S.Y., Kim, H.C., Kim, H.S., Choi, S.H., Lee, J.M. & Moon, W.K. (2010) MRI of magnetically labeled mesenchymal stem cells in hepatic failure model. *World J Gastroenterol*, **16**, 5611-5615.
- Sroga, J.M., Jones, T.B., Kigerl, K.A., McGaughy, V.M. & Popovich, P.G. (2003) Rats and mice exhibit distinct inflammatory reactions after spinal cord injury. *J Comp Neurol*, **462**, 223-240.
- Steward, O., Zheng, B., Ho, C., Anderson, K. & Tessier-Lavigne, M. (2004) The dorsolateral corticospinal tract in mice: an alternative route for corticospinal input to caudal segments following dorsal column lesions. *J Comp Neurol*, **472**, 463-477.
- Stoodley, M.A. (2000) Pathophysiology of syringomyelia. *J Neurosurg*, **92**, 1069-1070; author reply 1071-1063.
- Stys, P.K. & Lipton, S.A. (2007) White matter NMDA receptors: an unexpected new therapeutic target? *Trends Pharmacol Sci*, **28**, 561-566.
- Stys, P.K., Waxman, S.G. & Ransom, B.R. (1991) Na(+)-Ca<sup>2+</sup> exchanger mediates Ca<sup>2+</sup> influx during anoxia in mammalian central nervous system white matter. *Ann Neurol*, **30**, 375-380.
- Sugiura, S., Lahav, R., Han, J., Kou, S.Y., Banner, L.R., de Pablo, F. & Patterson, P.H. (2000) Leukaemia inhibitory factor is required for normal inflammatory responses to injury in the peripheral and central nervous systems in vivo and is chemotactic for macrophages in vitro. *Eur J Neurosci*, **12**, 457-466.
- Sullivan, P.G., Bruce-Keller, A.J., Rabchevsky, A.G., Christakos, S., Clair, D.K., Mattson, M.P. & Scheff, S.W. (1999) Exacerbation of damage and altered NF-kappaB activation in mice

lacking tumor necrosis factor receptors after traumatic brain injury. *J Neurosci*, **19**, 6248-6256.

Sykova, E. & Jendelova, P. (2005) Magnetic resonance tracking of implanted adult and embryonic stem cells in injured brain and spinal cord. *Ann N Y Acad Sci*, **1049**, 146-160.

Sykova, E. & Jendelova, P. (2007) In vivo tracking of stem cells in brain and spinal cord injury. *Prog Brain Res*, **161**, 367-383.

Taoka, Y. & Okajima, K. (1998) Spinal cord injury in the rat. *Prog Neurobiol*, **56**, 341-358.

Taoka, Y., Okajima, K., Uchiba, M. & Johno, M. (2001) Methylprednisolone reduces spinal cord injury in rats without affecting tumor necrosis factor-alpha production. *J Neurotrauma*, **18**, 533-543.

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.

Tator, C.H. & Fehlings, M.G. (1991) Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg*, **75**, 15-26.

Tator, C.H. & Koyanagi, I. (1997) Vascular mechanisms in the pathophysiology of human spinal cord injury. *J Neurosurg*, **86**, 483-492.

Tetzlaff, W., Kobayashi, N.R., Giehl, K.M., Tsui, B.J., Cassar, S.L. & Bedard, A.M. (1994) Response of rubrospinal and corticospinal neurons to injury and neurotrophins. *Prog Brain Res*, **103**, 271-286.

Tetzlaff, W., Okon, E.B., Karimi-Abdolrezaee, S., Hill, C.E., Sparling, J.S., Plemel, J.R., Plunet, W.T., Tsai, E.C., Baptiste, D., Smithson, L.J., Kawaja, M.D., Fehlings, M.G. & Kwon, B.K. (2011) A systematic review of cellular transplantation therapies for spinal cord injury. *J Neurotrauma*, **28**, 1611-1682.

Totoiu, M.O. & Keirstead, H.S. (2005) Spinal cord injury is accompanied by chronic progressive demyelination. *J Comp Neurol*, **486**, 373-383.

Totoiu, M.O., Nistor, G.I., Lane, T.E. & Keirstead, H.S. (2004) Remyelination, axonal sparing, and locomotor recovery following transplantation of glial-committed progenitor cells into the MHV model of multiple sclerosis. *Exp Neurol*, **187**, 254-265.

Van De Meent, H., Hosman, A.J., Hendriks, J., Zwartz, M., Group, E.-S.S. & Schubert, M. (2010) Severe degeneration of peripheral motor axons after spinal cord injury: a European multicenter study in 345 patients. *Neurorehabil Neural Repair*, **24**, 657-665.

- Vitellaro-Zuccarello, L., Mazzetti, S., Madaschi, L., Bosisio, P., Fontana, E., Gorio, A. & De Biasi, S. (2008) Chronic erythropoietin-mediated effects on the expression of astrocyte markers in a rat model of contusive spinal cord injury. *Neuroscience*, **151**, 452-466.
- 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.
- Wang, C.X., Nuttin, B., Heremans, H., Dom, R. & Gybels, J. (1996) Production of tumor necrosis factor in spinal cord following traumatic injury in rats. *J Neuroimmunol*, **69**, 151-156.
- Wang, X., Smith, G.M. & Xu, X.M. (2011) Preferential and bidirectional labeling of the rubrospinal tract with adenovirus-GFP for monitoring normal and injured axons. *J Neurotrauma*, **28**, 635-647.
- Warden, P., Bamber, N.I., Li, H., Esposito, A., Ahmad, K.A., Hsu, C.Y. & Xu, X.M. (2001) Delayed glial cell death following wallerian degeneration in white matter tracts after spinal cord dorsal column cordotomy in adult rats. *Exp Neurol*, **168**, 213-224.
- Wrathall, J.R., Teng, Y.D. & Choiniere, D. (1996) Amelioration of functional deficits from spinal cord trauma with systemically administered NBQX, an antagonist of non-N-methyl-D-aspartate receptors. *Exp Neurol*, **137**, 119-126.
- Wyndaele, M. & Wyndaele, J.J. (2006) Incidence, prevalence and epidemiology of spinal cord injury: what learns a worldwide literature survey? *Spinal Cord*, **44**, 523-529.
- Xiong, Y., Rabchevsky, A.G. & Hall, E.D. (2007) Role of peroxynitrite in secondary oxidative damage after spinal cord injury. *J Neurochem*, **100**, 639-649.
- Xu, C.J., Xu, L., Huang, L.D., Li, Y., Yu, P.P., Hang, Q., Xu, X.M. & Lu, P.H. (2011) Combined NgR vaccination and neural stem cell transplantation promote functional recovery after spinal cord injury in adult rats. *Neuropathol Appl Neurobiol*, **37**, 135-155.
- Yan, P., Li, Q., Kim, G.M., Xu, J., Hsu, C.Y. & Xu, X.M. (2001) Cellular localization of tumor necrosis factor-alpha following acute spinal cord injury in adult rats. *J Neurotrauma*, **18**, 563-568.
- Yong, C., Arnold, P.M., Zoubine, M.N., Citron, B.A., Watanabe, I., Berman, N.E. & Festoff, B.W. (1998) Apoptosis in cellular compartments of rat spinal cord after severe contusion injury. *J Neurotrauma*, **15**, 459-472.
- Yune, T.Y., Chang, M.J., Kim, S.J., Lee, Y.B., Shin, S.W., Rhim, H., Kim, Y.C., Shin, M.L., Oh, Y.J., Han, C.T., Markelonis, G.J. & Oh, T.H. (2003) Increased production of tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis after traumatic spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma*, **20**, 207-219.

Zhou, L. & Shine, H.D. (2003) Neurotrophic factors expressed in both cortex and spinal cord induce axonal plasticity after spinal cord injury. *J Neurosci Res*, **74**, 221-226.

Zimmer, C., Weissleder, R., O'Connor, D., LaPointe, L., Brady, T.J. & Enochs, W.S. (1995) Cerebral iron oxide distribution: in vivo mapping with MR imaging. *Radiology*, **196**, 521-527.

Ziv, Y., Avidan, H., Pluchino, S., Martino, G. & Schwartz, M. (2006) Synergy between immune cells and adult neural stem/progenitor cells promotes functional recovery from spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 13174-13179.