

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
Centro Internacional.

Master en «Fisiología y Neurociencia»
13 de Enero 2014 – 4 Septiembre 2014

Trabajo de Fin de Máster

Jesús Fernández Abascal

Efecto del Trasplante de Células Madre Derivadas de la Médula Ósea en un Modelo de Ratón de Ataxia de Friedreich

Grupo de Terapia Celular en Neuropatologías
Departamento de Terapia Celular y Medicina Regenerativa
Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa
Sevilla. España

Tutor: José López-Barneo

Co-Tutor: Manuel Álvarez Dolado

Contenido

Introducción.....	3
<i>Antecedentes del tema</i>	3
Células Madre.....	3
<i>Células madre de la médula ósea.....</i>	4
<i>Propiedades de las BMSC relevantes en la terapia celular</i>	5
Ataxia de Friedreich.....	6
<i>La proteína frataxina</i>	7
<i>Patología e histopatología.....</i>	8
Modelos de ratón de Ataxia de Friedreich	9
<i>Modelo de ratón transgénico humanizado (FXN)YG8</i>	9
Objetivos del trabajo.....	11
Materiales y Métodos	12
Experimentación animal	13
<i>Condiciones de estabulación y manejo de los animales</i>	13
<i>La colonia RFP.....</i>	13
<i>La colonia YG8.....</i>	13
Trasplante de médula ósea	15
<i>Ablación de la médula ósea de los animales receptores</i>	15
<i>Obtención de las muestras de la médula ósea.....</i>	16
<i>Trasplante de células de la médula ósea</i>	16
Análisis y seguimiento de las células trasplantadas mediante FACS.....	17
<i>La citometría de flujo</i>	17
Pruebas de comportamiento	18
Análisis histológico.....	18
<i>Obtención y preparación del tejido.....</i>	18
<i>Técnicas de tinción histológicas.....</i>	20
<i>Análisis estadísticos</i>	22
Resultados	24
Efecto de los trasplantes de MO a nivel de comportamiento	24
Efecto de los trasplantes de MO a nivel histológico	25
<i>Cuantificación del número de células de Purkinje en el cerebelo</i>	25
<i>Cuantificación del número de neuronas en los DRG.....</i>	28

<i>Cuantificación del recubrimiento de mielina de los axones de los DRG</i>	<i>30</i>
Discusión.....	33
<i>Ablación de la médula ósea mediante busulfan</i>	<i>33</i>
<i>Pruebas de comportamiento</i>	<i>33</i>
<i>Análisis histológico.....</i>	<i>34</i>
<i>Efecto del trasplante de médula ósea en el cerebelo</i>	<i>34</i>
<i>Efecto del trasplante de médula ósea en los DRG</i>	<i>35</i>
<i>Conclusiones y perspectivas de futuro</i>	<i>36</i>
Bibliografía.....	37

Introducción

Antecedentes del tema

La terapia celular ha surgido en los últimos años como una posible alternativa terapéutica para no solo aliviar los síntomas de las enfermedades, sino también curarlas¹. El desarrollo de estas terapias se ha llevado a cabo mediante el aislamiento, uso y estudio de una gran variedad de células madre. Para la terapia celular en enfermedades neurodegenerativas se usan tanto células de origen neural como de origen no neural con el objetivo de reemplazar, reparar o mejorar la función del sistema nervioso dañado.

Actualmente no existe un tratamiento efectivo para la Ataxia de Friedreich (FA), por lo que los pacientes han de afrontar cada uno de los síntomas propios de esta enfermedad de un modo individual². Dado el desarrollo que actualmente está teniendo la terapia celular, ésta podría llegar a representar una alternativa fiable para el tratamiento de la FA. Varios estudios han postulado a las células madre, y especialmente dentro de éstas a las células madre de la médula ósea (BMSC), como unas candidatas ideales para la terapia celular en esta enfermedad³⁻⁸. Por ello, en este trabajo nos hemos propuesto analizar el posible efecto de un trasplante total sistémico de BMSC a edades tempranas como posible tratamiento de la FA.

Células Madre

Las células madre resultan de gran interés en investigación, principalmente para el desarrollo de nuevas terapias para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas⁹. Las células madre se definen como células indiferenciadas con gran capacidad de autorrenovación y de diferenciación en cualquier tipo de célula madura.

Atendiendo a su capacidad de diferenciación, podríamos clasificarlas en diferentes tipos¹⁰:

- *Células madre totipotentes*: dada su alta capacidad de diferenciación, pueden diferenciarse en cualquier tipo celular y por lo tanto llegan a generar un nuevo organismo completo.
- *Células madre pluripotentes*: presentan una gran capacidad de diferenciación, y pueden formar las tres capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo).
- *Células madre multipotentes*: tienen una capacidad de diferenciación mucho menor, pudiendo dar lugar exclusivamente a células de su propia capa germinal.

- Células madre unipotentes: tienen una capacidad de diferenciación muy exclusiva, dando lugar a un único tipo celular. Se distinguen de una célula normal debido a su capacidad de autorrenovación.

Otra clasificación muy común en la investigación atiende al origen de las células madre, las cuales podemos agrupar en tres grandes tipos¹¹:

- Células madre embrionarias: son aquellas células madre pluripotentes que se han obtenido de embriones en el estadio de blastocisto. Un hándicap a tener en cuenta es la gran controversia ética que presentan.
- Células madre del cordón umbilical: son células pluripotentes que pueden dar lugar a una gran variedad de tipos celulares, por lo que representan una alternativa importante al uso de las células madre embrionarias, principalmente debido a que apenas presentan problemas éticos.
- Células madre adultas: suelen incluir a las células madre multi- y unipotentes, debido a que tienen una capacidad de diferenciación más restringida. Podemos encontrarlas en la gran mayoría de tejidos y órganos de los mamíferos.

Células madre de la médula ósea

La médula ósea (MO) es un tejido localizado en los huesos cuya función principal es promover la hematopoyesis. En este sentido, podríamos diferenciar dos sistemas principales de células: un conjunto celular que no participa de forma directa en la hematopoyesis, denominado estroma; y un conjunto celular que participa directamente en la hematopoyesis. De la MO pueden obtenerse principalmente dos tipos de células madre, las *células madre hematopoyéticas* (HSC) y las *células madre mesenquimales* (MSC)¹². Ambas presentan una plasticidad que les permite diferenciarse en otros tipos celulares para reemplazar células dañadas o muertas, secretar factores que promuevan la supervivencia de las células en degeneración, y realizar fusión celular^{3,12}.

Células madre hematopoyéticas

Las células sanguíneas tienen una vida media muy corta, y dado que éstas se generan a partir de las HSC, podríamos asumir que dichas células madre presentan una gran capacidad de renovación. No obstante, las señales celulares que influyen en la elección entre la producción de nuevas HSC (autorrenovación) y la diferenciación en algún tipo celular específico no son bien conocidas, aunque ya se han sugerido algunas moléculas candidatas¹³.

Las HSC pueden producir todos los tipos de células sanguíneas. El progenitor multipotente de las HSC puede encaminarse hacia dos líneas celulares muy características, la

línea linfoide y la línea mieloide¹⁴. Los progenitores oligopotentes de estas dos líneas celulares son conocidos como *progenitores linfoides comunes* (CLP) y *progenitores mieloides comunes* (CMP), respectivamente.

Los CLP pueden comprometerse hacia líneas celulares individuales que terminen dando lugar a células maduras como son los linfocitos T y B, o las células NK. Por otro lado, los CMP pueden comprometerse hacia dos líneas celulares principalmente, dando lugar a progenitores de granulocitos y monocitos (GMP), y a progenitores de megacariocitos y eritrocitos¹⁵.

Células madre mesenquimales

Las MSC son una pequeña población de células estromales que pueden dar lugar a los tres linajes celulares mesodérmicos como son el hueso, cartílago y grasa. No obstante, las MSC pueden ser obtenidas de otros tejidos avasculares como el fluido amniótico o el líquido sinovial. También se pueden aislar de aspirados de grasa y de la pulpa dentaria^{16,17}. Cuando son expandidas en cultivo, estos progenitores pueden generar una población de células madre trasplantables¹⁸.

Sin embargo, la denominación de MSC se encuentra basada en estudios *in vitro*, donde la manipulación de las mismas provoca un cambio en la expresión de marcadores y en su morfología¹⁸. De esta forma, la Sociedad Internacional para la Terapia Celular, en 2006, estableció una serie de requisitos para la correcta identificación de MSC:

- Deben poder adherirse al plástico en condiciones estándar de cultivo
- Han de ser positivas para los siguientes marcadores: CD73, CD90 y CD 105; y negativas para CD34, CD45, HLA-DR, CD14, y CD79.
- Deben poder diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condroblastos *in vitro*.

Propiedades de las BMSC relevantes en la terapia celular

Una de las propiedades más interesantes de las células madre es su plasticidad o capacidad para producir una célula de un linaje diferente al de origen, concepto al que denominaremos *transdiferenciación*. Esta pluripotencialidad se hace evidente cuando las BMSC se encuentran en el ambiente adecuado^{19,20}. En general, parece que estos casos de transdiferenciación son debidos a que cuando las BMSC son trasplantadas en un tejido diana diferente al suyo, son capaces de responder ante factores específicos del tejido o a señales de daño tisular, de forma que el nuevo microambiente provocaría la transdiferenciación.

En la actualidad puede encontrarse una variedad muy amplia de bibliografía sobre terapia celular en la cual se han empleado BMSC, quedando completamente demostrado que

estas células son capaces de transdiferenciarse^{4,21,22}. En la mayoría de estos trabajos se suele seguir una misma metodología consistente en la realización del trasplante de BMSC del donante previa eliminación de las BMSC del receptor. Para el seguimiento de las células del donante, éstas suelen ser marcadas mediante un transgén reportero, normalmente la proteína verde fluorescente (GFP) o la enzima β -galactosidasa.

Por otro lado, es importante resaltar que las células del donante no suelen ser manipuladas ni seleccionadas para la realización del trasplante, por lo que resultaría difícil establecer qué tipo celular es el que lleva a cabo el efecto beneficioso de la terapia. Así mismo, tampoco está claro si dicho efecto es provocado directamente por las células madre o por las derivadas de éstas.

Otra propiedad de especial relevancia es la fusión celular. Este mecanismo se presenta como una alternativa a la transdiferenciación, aunque ambos conceptos no son excluyentes. La fusión celular puede entenderse como un mecanismo de reparación celular y recuperación genética, donde las BMSC se fusionan con las células maduras del tejido diana, transfiriéndole el material genético y mezclando sus citoplasmas. De este modo se formaría un heterocarionte con un fenotipo diferente a sus dos células progenitoras que carecería de su restricción de linaje celular³.

No obstante, es necesario destacar que además de la transdiferenciación, pueden existir otros posibles mecanismos por los cuales las BMSC podrían intentar recuperar la homeostasis de los tejidos dañados cuando son empleadas en terapia celular. Entre ellos podríamos destacar la secreción de citoquinas y quimioquinas para la estimulación de la regeneración, o el incremento de la proliferación de células madre endógenas del tejido²³.

Ataxia de Friedreich

La FA es una enfermedad autosómica recesiva. Representa el tipo de ataxia hereditaria más común, con una frecuencia de portadores de 1:120, y una prevalencia de 1:50000. La FA afecta por igual a mujeres y hombres y suele empezar a manifestarse a los 10.52 ± 7.4 años²⁴. Esta enfermedad suele desarrollar disartria, debilidad muscular, espasticidad de las extremidades inferiores, escoliosis, disfunción de la vejiga, ausencia de reflejo en las extremidades inferiores, pérdida del sentido de la posición, cardiomiopatías, y en ocasiones diabetes mellitus²⁵.

En la gran mayoría de los casos, la enfermedad se desarrolla debido a una expansión en homocigosis de un triplete de nucleótidos de Guanina-Adenina-Adenina (GAA) en el intrón 1 de un gen llamado frataxina (*FXN*), localizado en el cromosoma 9q13^{26,27}. Estas repeticiones

en individuos normales se mantienen en un número aproximado de 38 tripletes, mientras que en individuos que padecen la enfermedad varían desde 70 a 1000, encontrándose más frecuentemente entre los 600 y 900 tripletes²⁵. Esta expansión del triplete GAA evita la correcta transcripción del gen y por lo tanto produce una considerable disminución de la expresión de frataxina²⁸.

La proteína frataxina

El gen *FXN* da lugar a un ARN mensajero de 1.3 Kb de 5 exones. La correcta traducción del mensajero produce un precursor de 210 aminoácidos con una señal de importación a la mitocondria en el extremo *N*-terminal, donde es procesada. Este procesamiento produce una proteína madura de 130 aminoácidos y 17 kDa²⁹.

Mediante estudios de resonancia magnética nuclear se ha podido determinar la estructura de la frataxina, la cual consiste en una proteína globular con dos hélices α paralelas enfrentadas a 7 láminas β ²⁹. Presenta una región *C*-terminal muy conservada, lo cual denota una gran importancia funcional. Tras diversos estudios, se ha establecido que la frataxina es una proteína de unión a hierro *in vitro*. Concretamente, los sitios de unión a hierro se encuentran en las regiones semiconservadas $\alpha 1/\beta 1$. No obstante, el hecho de que la frataxina se una al hierro mediante los aminoácidos glutamato y aspartato expuestos en su superficie hace pensar que es una proteína de unión a hierro muy poco común, dado que el resto de proteínas de unión a hierro lo suelen hacer mediante cisteínas e histidinas²⁹.

Aunque su función todavía es bastante discutida, parece ser que *in vivo* la frataxina participa en la homeostasis intracelular del hierro³⁰. Los grupos Fe-S tienen un papel esencial en una gran variedad de procesos celulares, como el transporte de electrones en la cadena respiratoria, el metabolismo, la reparación del ADN, etc. Para la formación de los mismos intervienen una serie de proteínas de andamiaje que permiten el correcto ensamblaje de los grupos Fe-S en las proteínas apropiadas. En ese sentido, parece que la frataxina interacciona directamente con una proteína desulfurasa que interviene como donadora de azufre en la formación de los grupos Fe-S³¹.

Al igual de los grupos Fe-S, los grupos hemo también son de gran importancia biológica, participando principalmente en la utilización del oxígeno molecular. La ruta biosintética de los grupos hemo finaliza con la inserción de un ion ferroso en el anillo porfirínico mediante la ferroquelatasa para dar lugar a un grupo hemo completamente funcional³². La obtención de este ion ferroso parece necesitar la ayuda de una chaperona, y dado que la eliminación de frataxina en levaduras provoca un descenso en la actividad de la

citocromo C oxidasa y de otras proteínas que contienen grupos hemo, se ha propuesto que la frataxina interviene en la biosíntesis de los mismos^{30,33}.

Otra función adicional de la frataxina es controlar el estrés oxidativo provocado por el hierro evitando la producción de especies reactivas de oxígeno. Varios estudios en diferentes especies han demostrado que la falta de frataxina conlleva un daño oxidativo considerable^{34,35}. De esta forma, la proteína podría evitar daños en el ADN uniéndose al ion ferroso y transformándolo en ion férrico, permitiendo que éste pueda ser posteriormente accesible para el organismo²⁹.

Aunque la frataxina presente una discutida funcionalidad, parece quedar claro que la falta de esta proteína o de su función da lugar a una serie de consecuencias fisiológicas que comprometen la correcta funcionalidad de diferentes tejidos.

Patología e histopatología

Uno de los principales tejidos más afectados por la falta de frataxina son los ganglios de la raíz dorsal (DRG), los cuales presentan un tamaño menor al compararlos con individuos sanos^{27,36,37}. El diámetro de la médula espinal se ve reducido en toda su longitud, pero esta disminución es especialmente evidente en la región torácica, donde el diámetro transversal de no llega a los 10 mm. Una diferencia a nivel torácico es que el fascículo gracilis y el cuneato se ven afectados por igual en comparación con la región cervical, en donde la degeneración es más evidente a nivel del fascículo gracilis. Además, es posible distinguir la falta de fibras en las regiones anterolaterales correspondientes al tracto corticoespinal y espinocerebelar²⁷.

Aunque los DRG se ven afectados en su totalidad, la mayor gravedad de las lesiones se suele observar en la región subcapsular, donde el tamaño de las células ganglionares se ve considerablemente reducido, y aparecen agrupaciones de núcleos conocidas como “nódulos residuales”^{27,36}. En los DRG de individuos sanos, las células satélite se encuentran recubriendo a las células nerviosas formando una fina capa a su alrededor, pero este recubrimiento se ve engrosado en individuos con FA.

Como ya se ha comentado, la falta de frataxina provoca una alteración de la homeostasis del hierro, por lo que no es de extrañar encontrar acúmulos del mismo en los DRG. Esto provoca un aumento de la producción de proteínas que reaccionan con hierro, lo cual puede confirmarse mediante el análisis inmunohistoquímico correspondiente para proteínas como la ferritina o la ferroportina³⁶.

Por otro lado, la densidad de los axones en la raíces dorsales no parece verse afectada, pero en cambio sí que lo hace el recubrimiento de mielina en los pacientes de FA. En éstos, se

puede observar que el grosor del recubrimiento de mielina es menor que en individuos sanos³⁶.

Otra estructura afectada en la AF es el núcleo dentado del cerebelo, cuyas neuronas y fibras aferentes se encuentran atrofiadas en estos pacientes³⁸. Esto implica que las conexiones cortico-nucleares se vean afectadas, aunque la pérdida de los terminales sinápticos no implica la degeneración de las células de Purkinje (PC), dado que la corteza cerebelar no se ve afectada en este tipo de ataxia^{27,38}. No obstante, el hecho de no existir la atrofia de las PC no conlleva que éstas puedan llevar a cabo correctamente su función.

Por último, el corazón es un órgano que también puede verse afectado en la FA. Los pacientes que padecen esta enfermedad pueden sufrir cardiomiopatías debido generalmente a la hipertrofia del ventrículo izquierdo³⁹. En un análisis histopatológico del corazón puede observarse una variación del tamaño de las fibras del septum interventricular, así como la rotura de las mismas. Además, es muy característico observar pequeñas acumulaciones de hierro en los cardiomiocitos^{27,39}.

Modelos de ratón de Ataxia de Friedreich

El uso de animales de experimentación para el estudio de diferentes enfermedades constituye una herramienta esencial en la investigación de nuevas aproximaciones terapéuticas. Dada la prevalencia de la FA, la obtención de un modelo de ratón para esta enfermedad es de gran importancia. No obstante, la mayoría de los modelos utilizados se han basado en la modificación del gen de frataxina homólogo de ratón (*Fxn*). Uno de los primeros modelos que se intentó obtener consistió en ratones knock-out para *Fxn*, demostrando que la eliminación en homocigosis de este gen provocaba la muerte de los embriones⁴⁰. Por lo tanto, se han generado ratones knock-out condicionales en los que se reproducen exclusivamente algunos aspectos patológicos de la FA, y que pueden resultar útiles para algunos estudios. Sin embargo, estos modelos de ratón no permiten el estudio exhaustivo de la enfermedad ni del dinamismo típico de la repetición de los tripletes GAA.

En 2006 Sahar Al-Mahdawi y colaboradores obtuvieron un modelo de ratón para la FA que carece de la expresión del gen *Fxn* de ratón y porta el gen *FXN* humano con la expansión de tripletes GAA^{37,41}. Este modelo ha sido el candidato elegido para la realización de este estudio.

Modelo de ratón transgénico humanizado (FXN)YG8

El modelo YG8 es un ratón transgénico que contiene el gen *FXN* humano, con 190+90 repeticiones del triplete GAA⁴¹. Cuando estos ratones (*FXN*⁺; *Fxn*^{+/+}) son cruzados con

ratones knock-out heterocigotos ($Fxn^{+/-}$) pueden obtenerse ratones transgénicos heterocigotos ($FXN^+; Fxn^{+/-}$) que pueden volver a cruzarse con ratones $Fxn^{+/-}$, dando lugar tres tipos de crías: silvestres ($FXN^+; Fxn^{+/+}$), heterocigotas ($FXN^+; Fxn^{+/-}$), y homocigotas que presentan la enfermedad ($FXN^+; Fxn^{-/-}$).

Las crías homocigotas ($FXN^+; Fxn^{-/-}$) son viables a pesar de carecer del gen Fxn , ya que poseen el homólogo humano, que produciría a bajo nivel la proteína frataxina funcional. No obstante, este ratón transgénico recapitula bastante fielmente la enfermedad de FA.

La cepa YG8 presenta un descenso en la cantidad de ARNm de FXN en comparación con la producción de ARNm de Fxn en ratones silvestres. Concretamente, el mayor descenso se observa en el cerebelo (57%) y en el músculo esquelético (57%). Por otro lado, los niveles de expresión de frataxina humana, como cabía esperar, se ven disminuidos hasta un 42% en el cerebelo, un 25% en el corazón, y un 9% en el músculo esquelético. No obstante, la expresión de frataxina puede no coincidir siempre con los niveles de ARNm debido a que pueden existir variaciones dependientes de tejido en relación a los efectos post-transcripcionales y post-traduccionales sobre la producción de la proteína transgénica³⁷.

Otros efectos fenotípicos observables en estos ratones es una disminución de la coordinación, evaluada mediante la prueba de rotorod, a partir de los 3 meses de edad; así como la actividad locomotora, evaluada mediante la prueba de campo abierto, a partir de los 6 meses de edad. A los 9 meses, se suele observar un aumento significativo del peso corporal, lo cual puede ser debido a la disminución de la actividad locomotora³⁷.

El estudio histológico de estos ratones a la edad de un año no demostró la neurodegeneración de las PC, pero encontró cambios patológicos en los DRG. Estos cambios consisten en la aparición de vacuolas de gran tamaño en las células neuronales sensoriales del DRG, así como en un desplazamiento periférico del núcleo en muchas de estas neuronas. En general, estas y otras características aportadas por S. Al-Mahdawi y colaboradores en 2006 hacen de este modelo animal de FA un candidato idóneo para el estudio de la terapia celular con BMSC.

Objetivos del trabajo

Como objetivos del trabajo se ha propuesto estudiar el efecto del trasplante de BMSC en el modelo de ratón de FA YG8. Dados los antecedentes descritos anteriormente, creemos que el tratamiento de los ratones YG8 (FXN^+ ; $Fxn^{-/-}$) a edades postnatales tempranas con BMSC de animales sanos podría mejorar significativamente las condiciones de vida de los mismos. Para ello se llevarán a cabo análisis histológicos, así como de comportamiento para la correcta determinación del efecto de la terapia.

A nivel comportamental se llevarán a cabo pruebas de rotorod y de campo abierto. A nivel histológico, en el cerebelo, se localizará mediante RFP a las células trasplantadas, y se realizarán análisis inmunohistoquímicos de marcadores neuronales para la cuantificación del número de PC; mientras que en los DRG se cuantificarán el número de neuronas y el grosor del recubrimiento de mielina de los axones. Se espera que con estos análisis se puedan confirmar los datos que se obtengan de los análisis de comportamiento si se cumple nuestra teoría.

Materiales y Métodos

En este trabajo se ha llevado a cabo el trasplante de MO de animales CRE-RFP en receptores YG8 (FXN^+ ; $Fxn^{-/-}$) para identificar las células del donante mediante fluorescencia (células RFP). Por lo tanto, para poner en marcha el experimento es necesario el establecimiento de las diferentes colonias necesarias. En primer lugar se establecieron dos colonias fundadoras, una de ellas de ratones YG8 (FXN^+ ; $Fxn^{-/-}$) y la otra de ratones CRE-RFP. La primera de estas dos se utilizó para la obtención de los grupos control y de los grupos problema, mientras que la segunda se utilizó para la obtención de la MO donante. Tras la ablación química con busulfan del sistema inmune de los ratones YG8 se procedió al trasplante de la MO procedente de los ratones CRE-RFP de forma intravenosa, obteniéndose un animal quimera, caracterizado por poseer una médula ósea cuyas células y las derivadas de éstas son fácilmente identificables frente al resto de células del receptor. Estos animales fueron sometidos a pruebas de comportamiento a diferentes tiempos para evaluar la capacidad motora tras el trasplante. Por último, tras su sacrificio a los 12 meses de edad se procedió al análisis histológico del cerebelo y de los DRG para confirmar los datos comportamentales. Los resultados obtenidos fueron comparados entre los diferentes grupos experimentales. En la figura 1 se representa un esquema general del diseño del estudio experimental.

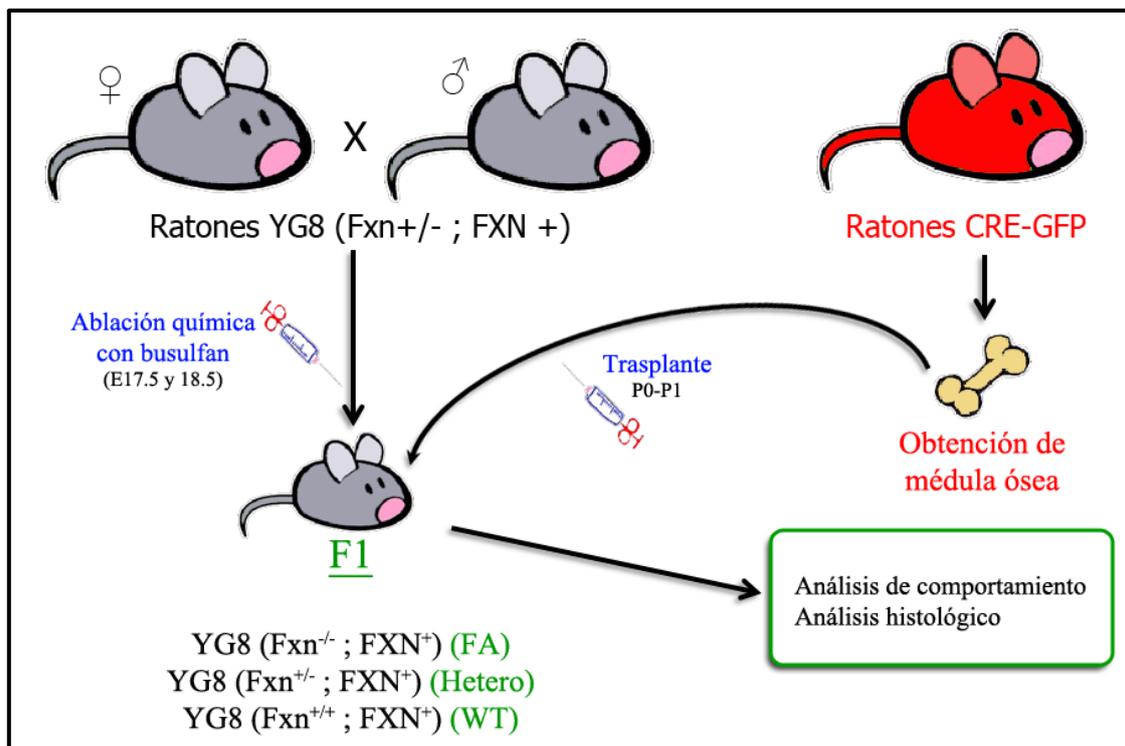


Figura 1. Esquema general de proceso experimental seguido en este trabajo

Experimentación animal

Condiciones de estabulación y manejo de los animales

Los animales se estabularon bajo barrera en condiciones libres de gérmenes patógenos específicos (SPF) en unas condiciones ambientales constantes de temperatura ($22\pm 1^\circ\text{C}$) y de humedad ($55\pm 10\%$) en jaulas de polieteramida de 435 cm^3 . Las jaulas presentaban un sistema de ventilación individual, con presión positiva y filtro HEPA, situadas en un rack con motores de impulsión y extracción del aire, con 15-20 ciclos de renovación de aire por hora. El ciclo de luz/oscuridad se estableció en 12h y los animales tenían libre acceso al agua y la comida. Con el fin de garantizar las condiciones sanitarias, el animalario del CABIMER disponía de un programa de centinela y control medio-ambiental.

El manejo de los animales y procedimientos quirúrgicos se realizó según los requisitos estipulados por el Real Decreto 1201/05 y Ley 32/07 sobre protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. En todo momento se siguieron las normas y recomendaciones del Comité de Ética para el Bienestar Animal (CEBA) del CABIMER.

La colonia RFP

Esta cepa de animales se utilizó para el seguimiento de las células tras realizar los trasplantes de MO. Gracias a la presencia de la RFP, estas células son diferenciadas con claridad de las células del animal receptor. Estos animales fueron adquiridos en los Laboratorios Jackson (<http://www.jax.org> código 05441) y mantenidos en homocigosis en la estirpe C57BL/6J.

Identificación de los animales

La identificación de los animales RFP se realizó mediante el análisis en un microscopio de fluorescencia de una biopsia de la cola del animal. La expresión de la proteína se encuentra presente a lo largo de todos los estadios embrionarios y adultos, y su máxima expresión se encuentra en el páncreas, músculo esquelético, corazón y vesícula seminal.

La colonia YG8

Los animales de esta estirpe son hemicigotos para gen *FXN* humano con una repetición de 90+190 tripletes GAA, además de ser heterocigotos para el gen *Fxn* de ratón. Estos animales fueron adquiridos en los Laboratorios Jackson (<http://www.jax.org> código 08398) y se mantuvieron en heterocigosis al cruzarlos entre si. De la descendencia obtenida, las crías heterocigotas ($Fxn^{+/-}$; FXN^+) podían ser utilizadas para el mantenimiento de la colonia,

mientras que las homocigotas sanas ($Fxn^{+/+}$; FXN^+) podían ser utilizadas como control y las homocigotas con FA ($Fxn^{-/-}$; FXN^+) podían ser utilizadas para la terapia.

Identificación de los animales

La identificación de la descendencia se hizo mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar los marcadores moleculares adecuados. Para ello se realizaban dos PCR diferentes, una para obtener el genotipo del gen Fxn y otra para la detección del transgén FXN . El ADN para la tipificación genética se obtuvo de una muestra de tejido procedente de la cola de los animales. Para ello, se homogeneizó el tejido mediante la lisis a 55° C durante 3 horas con un Tampón de lisis con la siguiente composición: 0.2% (p/v) de dodecil sulfato sódico (SDS), Tris 1.1 M a pH 8.0, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 5 mM a pH 8.0, NaCl 0.2 M y proteinasa K (30 U/ml, Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.) en agua destilada y desionizada (H_2O_{dd}).

Tras homogeneizar la muestra, estas se centrifugaban a 14000 rpm durante 2 minutos y el sobrenadante obtenido se transfería a un nuevo eppendorff con 450 μ l de 2-propanol. Tras agitar por inversión, se forma un precipitado de ADN visible. A continuación se volvió a centrifugar a 14000 rpm durante 10 minutos y se desechó el sobrenadante. El pellet se lavó con 400 μ l de alcohol al 70% (v/v) y se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones. De nuevo se reservó el pellet, el cual fue resuspendido en 100 μ l de H_2O_{dd} . Todo el proceso fue realizado a temperatura ambiente y la muestra se guardó a 20° C para su almacenamiento.

La PCR, que consiste en la amplificación de un fragmento concreto de ADN para obtener múltiples copias del fragmento de interés, se llevó a cabo con dos juegos de cebadores distintos. El primero nos permite identificar el genotipo para el gen Fxn endógeno, mientras que el segundo nos permite identificar la presencia del transgén FXN .

Para la realización de la PCR usamos un medio compuesto por: Kit comercial KOD Hot Start Master mix (71842-3, Novagen), cebadores (10 μ M cada uno), y ADN (entre 100 y 500 ng de muestra) en H_2O Braun. Como control positivo se utilizaron muestras de un animal homocigoto sano ($Fxn^{+/+}$; FXN^+), heterocigoto ($Fxn^{+/-}$; FXN^+) y homocigoto enfermo ($Fxn^{-/-}$; FXN^+), mientras que como control negativo se sustituyó la muestra de ADN por H_2O . En el caso de la PCR para la detección del transgén FXN se utilizó como control positivo un heterocigoto ($Fxn^{+/-}$; FXN^+) y como control negativo un ratón silvestre de la cepa C57BL/6J que carece del transgén FXN .

Una vez realizada la PCR se comprobó el genotipo de los ratones mediante una electroforesis en un gel de agarosa (D-1 low EEO, Pronadisa, Madrid, España) al 0.8% en Tampón Tris-borato-EDTA (TBE) 1X con 0.5 μ g/ml de Bromuro de Etidio (Appllichem,

Gatersleben, Alemania). Para la visualización de los diferentes fragmentos amplificados por PCR se usó una lámpara de luz ultravioleta (Gel Doc XR, Bio Rad Laboratories, Barcelona, España).

Comparando las bandas en las dos PCR se pudieron identificar los tres posibles genotipos. Los ratones ($Fxn^{+/+}$; FXN^+) presentan una banda de unos 112 pares de bases (pb) en la PCR del transgén FXN , y una banda de unos 70 pb en la PCR del gen Fxn de ratón. Los ratones ($Fxn^{+/-}$; FXN^+) presentan dos bandas en la PCR del gen Fxn de ratón (datos no mostrados) y una banda de unos 112 pb en la PCR del transgén FXN . Los ratones enfermo ($Fxn^{-/-}$; FXN^+) presentan una banda de mayor tamaño en la PCR del gen Fxn de ratón, mientras que en la PCR del transgén FXN presentan la banda característica de 112 pb (figura 2).

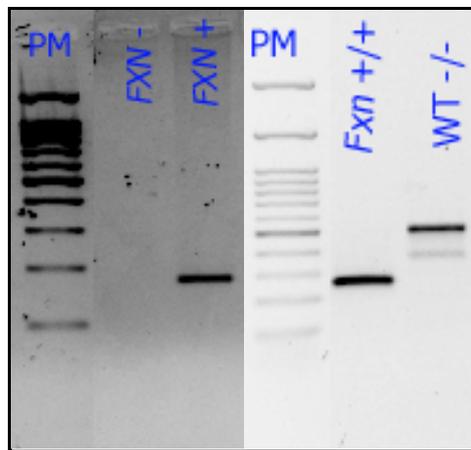


Figura 2. Fotografía del producto de la PCR obtenido para el genotipado de los ratones YG8. Izquierda: El carril central corresponde a un ratón que carece del transgén FXN y por lo tanto no muestra ninguna banda. El carril de la derecha corresponde a un ratón que posee el transgén FXN y por lo tanto muestra una banda de unos 112 pb. Derecha: El carril central corresponde a un ratón que posee el gen endógeno Fxn y por lo tanto presenta una banda de unos 70 pb correspondiente a dicho gen. El carril de la derecha corresponde a un ratón que carece del gen Fxn de ratón. El primer carril ambas imágenes (izquierda y derecha) corresponde al peso molecular (PM).

Trasplante de médula ósea

Ablación de la médula ósea de los animales receptores

Para efectuar los trasplantes de una nueva médula ósea, previamente han de ser eliminadas de su nicho las células del receptor. Esto se consiguió mediante la ablación química con busulfan, un agente alquilante bifuncional que provoca daños en el ADN⁴². La finalidad de este procedimiento es realizar los trasplantes con las nuevas células de la MO tras el nacimiento del animal. Para ello se administraron dos dosis de 15.5 mg/kg mediante inyección intraperitoneal a la madre gestante cuando los individuos receptores se encontraban

en los estadios embrionarios 17.5 y 18.5. El trasplante de MO se realizó durante las primeras 24 horas tras el nacimiento.

Obtención de las muestras de la médula ósea

Animales de más de 6 semanas de edad fueron sacrificados por dislocación cervical, y a continuación se procedió a limpiar la zona con Etanol 70% (v/v). Mediante una incisión en la piel se pone al descubierto las patas traseras. A continuación, se procedió a la extracción de la cadera, fémur y tibia y a su separación del resto de los tejidos musculares.

Una vez aislados los huesos se procede a la extracción de la MO mediante inyección de tampón fosfato salino (PBS) con jeringas de insulina (BD Falcon, Bedford, Massachusetts, EE.UU.) por las extremidades de los huesos. Estas muestras son recogidas en un Falcon de 50 ml en el que se ha colocado un filtro de 70 μm de diámetro de poro para evitar que restos de tejido y hueso puedan contaminar la muestra recogida. El volumen final es centrifugado durante 5 minutos a 300G y a 4° C.

A continuación se elimina el sobrenadante y el sedimento, rojo por los eritrocitos, es resuspendido en 4 ml de buffer de lisis para eritrocitos. Tras 5 minutos se rellena con PBS hasta un volumen final de 30 ml. La muestra vuelve a ser centrifugada en las mismas condiciones anteriores y este sedimento, ya blanquecino sin los eritrocitos, pasa a ser resuspendido nuevamente en 30 ml de PBS. De aquí se tomaron muestras para el recuento de células MO y se volvió a centrifugar. El nuevo pellet es resuspendido ya en un volumen adecuado de PBS para proceder a su inyección.

Trasplante de células de la médula ósea

Una vez realizada la ablación de las células de médula ósea del animal receptor y habiendo obtenido la nueva médula ósea del animal donante, se procedió al trasplante de las mismas. Este se realizó mediante una inyección a través de la vena facial en neonatos para facilitar la llegada al torrente sanguíneo. El procedimiento se realizó en las primeras 24 horas tras el nacimiento. Los animales son inmovilizados entre los dedos índice, anular y el pulgar, y con una jeringa de insulina de 0.5 ml (BD Falcon, Bedford, Massachusetts, EE.UU.) se inyectaron 7.5 millones de células por animal en un volumen comprendido entre 50-100 μl . Se formaron 4 grupos experimentales:

- Grupo 1: Animales atáxicos + trasplante de MO
- Grupo 2: Animales sanos + trasplante de MO
- Grupo 3: Animales atáxicos
- Grupo 4: Animales sanos

Análisis y seguimiento de las células trasplantadas mediante FACS

La citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular que implica medir las características de dispersión de luz y fluorescencia que poseen las células conforme se las hace pasar a través de un rayo de luz laser, con longitudes de onda definidas. Para su análisis por citometría de flujo, las células deben encontrarse individualmente en suspensión en un fluido. Las células sanguíneas pueden analizarse prácticamente de manera directa sin necesidad de disgregarlas, mientras que hay otros tejidos que requieren una disgregación mecánica o química.

Al atravesar el rayo de luz, las células interactúan con este causando su dispersión. Basándose en la difracción de la luz en sentido frontal, se puede evaluar el tamaño de las células que pasan, y al medir la reflexión de la luz de manera lateral se evalúa la granularidad o complejidad de las mismas. Además de la dispersión de la luz, si las células portan moléculas fluorescentes podemos detectar el nivel de intensidad de la fluorescencia y el porcentaje de células que presentan estas moléculas marcadas. El uso de moléculas fluorescentes distintas (distintos colores de fluorescencia) permite analizar la presencia de varios marcadores de manera simultánea.

Asimismo, a la vez que las células son analizadas a su paso por el láser, estas pueden ser separadas y recogidas en función de sus características. En este caso las células son analizadas por un separador o “sorter” que permite recoger células de la muestra que presenten una o varias características fijadas por el investigador.

Análisis de la incorporación de las células trasplantadas

El análisis de la incorporación de las células trasplantadas en los animales receptores es fundamental para cuantificar el grado de quimerismo conseguido tras el trasplante de médula ósea. Debido a la dificultad del estudio directo de la médula ósea del animal in vivo, realizamos una aproximación mediante el estudio de las células marcadas procedentes del donante en el torrente sanguíneo del receptor, ya que cuanto mayor sea la incorporación en la médula ósea, mayor será su capacidad para producir derivados sanguíneos fluorescentes.

Este análisis se realizó mediante citometría de flujo de la sangre periférica, ya que la marca propia de fluorescencia de las células procedentes del donante permite realizar este estudio sin la necesidad de un marcaje adicional.

No todos los animales trasplantados presentan el mismo grado de quimerismo, y este estudio nos permite realizar grupos lo más homogéneos posibles. Para ello se usaron animales

que no difirieran en más de un 10% en el grado de incorporación, y se eliminaron aquellos animales que no presentaban un mínimo del 50% de incorporación con células del donante con la marca fluorescente.

Para el análisis de incorporación las muestras sanguíneas fueron tomadas 4 semanas tras el trasplante. La toma de la muestra se realizó mediante un pinchazo en la vena facial tras inmovilizar al animal. La muestra fue recogida en un tubo de plástico de 1,5 ml (Eppendorff) impregnado con heparina (1.000U/ml de solución salina) para evitar su coagulación. A continuación se resuspendieron 50 µl de sangre en 800 µl de PBS 0.1M en un tubo de 5ml de plástico (Citometría). Se añadió 4 ml de solución de lisis de eritrocitos durante 5 minutos y a continuación se centrifugó a 300G durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante, las células se lavaron 2 veces resuspendiéndolas en 2 ml de PBS 0.1M y a continuación se centrifugó 5 minutos a 300G. El sobrenadante se eliminó nuevamente y esta vez fue resuspendido en 400 µl de PBS 0.1M, quedando así listo para su paso en el citómetro de flujo. Todos estos pasos se realizan en hielo para evitar la lisis de las células sanguíneas.

Pruebas de comportamiento

La prueba de rotorod nos permite estudiar el equilibrio y coordinación de los sujetos de estudio. En esta prueba se registra el tiempo que cada animal es capaz de mantenerse sobre el cilindro giratorio. A los 12 meses de haberse realizado el trasplante, los animales objeto de estudio se sometieron a la prueba de rotorod para tener una aproximación al efecto funcional del trasplante de una MO “sana”.

La prueba de rotorod nos permitió evaluar el estado motor de nuestros animales de estudio⁴³. En concreto, se evaluó el tiempo de latencia del animal sobre el aparato para los grupos 3 y 4, analizando 3 intentos diarios durante 3 días; y el porcentaje de mejora en latencia de caída para los 4 grupos analizando tres intentos diarios durante 4 días consecutivos a diferentes edades (6, 8 y 10 meses).

Análisis histológico

Obtención y preparación del tejido

Los animales fueron sacrificados a edades de 12 meses previa anestesia cumpliendo en todo momento las normas del comité de ética del animalario del CABIMER. A continuación se procedió a la perfusión del fijador. Este procedimiento tiene como principal objetivo la interrupción de los procesos de degradación que aparecen tras la muerte celular, asegurando la máxima conservación de las estructuras tisulares y celulares y de las características químicas

del tejido. La perfusión se llevó a cabo mediante inyección transcardiaca con solución fijadora, ya que proporciona una fijación uniforme de alta calidad. La solución fijadora se compone de Paraformaldehído⁴⁴ al 4% que conserva la estructura celular y tisular a gran escala en el sistema nervioso central (CNS).

Todo el proceso de perfusión, por la alta toxicidad del PFA se llevó a cabo en una cabina de extracción de gases. Una vez anestesiado el animal, se procedió a realizar una incisión en la piel del abdomen que dejó al descubierto el esternón. Con cuidado se abrió la cavidad abdominal y a continuación la cavidad torácica cortando las costillas de forma paralela a los pulmones. Con ayuda de unas pinzas sujetas al esternón se desplazaron las costillas, dejando expuesto el corazón. A partir de este momento el animal es incapaz de respirar, pero el corazón sigue funcionando por un corto periodo de tiempo. Es importante empezar el proceso de fijación antes de la abolición del batido cardíaco, a raíz del cual empezaría el proceso de coagulación.

Con ayuda de unas pinzas se sujetó el corazón y una cánula fue introducida en el ventrículo izquierdo hacia la ahora ascendente. Con unas tijeras de microdissección se realizó una pequeña abertura en la aurícula derecha para evitar el exceso de volumen cuando se introdujese la solución fijadora, permitiendo de este modo la salida de la circulación del retorno y evitando que se produzcan roturas inespecíficas en el circuito sanguíneo. La solución fijadora se hizo fluir con una bomba de perfusión (Masterflex, Cole-Parmer, EE.UU), de forma que tengamos un flujo constante e ininterrumpido. La velocidad de flujo del líquido fijador influye en la correcta fijación de los órganos, por lo que se usó un flujo constante durante un periodo mínimo de 10 minutos, pasando un volumen de 40 ml de solución fijadora por ratón. Una vigorosa contracción muscular es indicativa de la correcta fijación del animal.

A continuación se procedió a la extracción de los órganos de interés, cerebelo y DRG. Los cerebelos fueron depositados en solución fijadora durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, fueron depositados en tampón fosfato (PB 0.1M, pH 7.4) con azida sódica al 0.05% hasta que fueron analizados. Los DRG sufrieron el mismo proceso que los cerebelos pero solo estuvieron depositados en solución fijadora durante 20 minutos.

Seccionado del tejido

Para la visualización de los tejidos en un microscopio debemos obtener secciones muy finas, adecuadas a las características de estos aparatos. Para la obtención de rodajas de 60 μm del cerebelo se utilizó el vibratomo (VT1000S, Leica Microsystems, Alemania). Los

cerebelos fueron previamente lavados en PB (0.1 M, pH 7.4) para eliminar los restos del fijador. Las secciones se depositaron formando 3 series separadas entre ellas por 180 μm .

Para la obtención de secciones de 14-16 μm de los DRG se utilizó el criostato. Los DRG fueron sumergidos durante toda la noche en sacarosa al 30% en PB y posteriormente se congelaron. Las secciones, distribuidas en tres series, se obtuvieron a una temperatura de -20°C y fueron depositadas sobre un portaobjetos (76x26 mm, Normax, Portugal). Los portaobjetos se almacenaron a -30°C hasta su procesamiento.

Técnicas de tinción histológicas

El fundamento de cualquier método de tinción radica en la propiedad que poseen todos los tejidos para incorporar y fijar, de manera variable, diversas sustancias coloreadas llamadas colorantes. Gracias a la fluorescencia intrínseca de las células de los donantes, estas se han podido localizar en los tejidos de estudio. Además, usando diversos tipos de tinciones histológicas, se han podido observar los diferentes tipos celulares presentes en los tejidos analizados.

Inmunohistoquímica indirecta

La tinción inmunohistoquímica indirecta es un procedimiento histopatológico que se basa en la utilización de dos anticuerpos, uno específico que se une al antígeno que queremos identificar, denominado anticuerpo primario; y uno denominado secundario, que reconoce y se une al anticuerpo primario. Este anticuerpo secundario ha sido previamente marcado mediante un enlace químico con una enzima que puede transformar un sustrato en visible o un producto fluorescente, sin afectar la capacidad del anticuerpo para formar un complejo con el anticuerpo primario. El complejo antígeno-anticuerpo 1^o-anticuerpo 2^o así formado permite ser localizado e identificado *in situ* en las muestras tisulares o citológicas. Los anticuerpos utilizados en estos ensayos se indican en la tabla 1.

Tipo de anticuerpo	Origen	Antígeno	Dilución de uso	Referencia	Casa comercial
Primarios	Conejo	Calbindina	1:2000	CB-38a	Swant, Switzerland
	Ratón	RFP	1:100	ab65856	Abcam Ltd, Cambirdge, UK
Secundarios	Cabra	Biotinilado-anti ratón	1:500	115-065-146	Jackson ImmunoResearch, USA
	Cabra	FTTC-anti conejo	1:400	F9887	Sigma-Aldrich, USA

Tabla 1. Lista de anticuerpos utilizados. Se detallan su origen, el antígeno al que reconocen, la dilución a la que se usaron, su referencia del catálogo y la casa comercial a la que pertenecen.

Durante la realización de este trabajo se ha realizado inmunofluorescencia doble para el marcaje de las CP del cerebelo y la localización en el tejido de las células RFP procedentes del trasplante siguiendo el protocolo que se explica a continuación.

La tinción comenzó con el restablecimiento de la inmunoreactividad tisular, para lo cual se realizaron tres lavados de 5 minutos en PB a temperatura ambiente y con agitación. De esta forma se eliminaron los restos de azida sódica. Antes de la realización del bloqueo de la reacción de fondo inespecífico, se realizó un lavado de 15 minutos en agua oxigenada al 3% y 10% en metanol para la inhibición de las peroxidases endógenas, fundamental para evitar la posterior aparición de falsos positivos. La técnica continuó con un lavado en PB de 5 minutos y con el posterior bloqueo de la reacción de fondo inespecífico. Durante 60 minutos las muestras permanecieron en la solución de tampón de bloqueo compuesta por PB suplementado con un 10% del suero normal de cabra (NGS) (Gibco-Invitrogen, EE.UU) y un 0.01% Tritón X-100 (Panreac, España). El siguiente paso fue el marcaje del antígeno con los anticuerpos primarios. Las muestras permanecieron toda la noche a 4° C en tampón bloqueo al que se le ha añadido el anticuerpo a la disolución correspondiente.

A la mañana siguiente se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno en PB para eliminar todo el antisuero no unido al antígeno durante la incubación anterior. A continuación se hizo una incubación de 60 minutos a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios (tabla 1) diluido en tampón bloqueo. Pasado ese tiempo se realizaron tres lavados en PB de 5 minutos cada uno de ellos para eliminar el exceso de anticuerpo secundario que no se unió al anticuerpo primario. A continuación las muestras fueron incubadas con el complejo ABC durante una hora en oscuridad. Esta incubación conlleva la formación de agregados de avidina, biotina y peroxidasa en torno a la biotina con la que se encontraba conjugados los anticuerpos secundarios. Al cabo de ese tiempo, se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS para eliminar el exceso del complejo ABC no unido al tejido.

El siguiente paso consistió en la amplificación con tiramidas, el cual consiste en la unión covalente de moléculas de tiramida biotinilada a proteínas presentes en el tejido, sólo en torno a la peroxidasa del complejo ABC y, por ende, al antígeno buscado. En presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), la peroxidasa del complejo ABC cataliza la formación de tiramida biotinilada reactiva fluorescente, que se une covalentemente a residuos de triptófano y tirosina de proteínas próximas en el tejido, resultando en el depósito de tiramida fluorescente en la zona de reacción, puesto que la peroxidasa está presente únicamente en la zona de localización del antígeno⁴⁵. Para la realización de este paso esencial, los cortes se lavaron en tampón borato pH 8.5 durante 10 minutos, y a continuación fueron lavados de

nuevo con una solución de tampón borato, tiramidas (1:1000) y agua oxigenada (1:5000). Tras ello, se realizaron 3 lavados con PB 0.1 M durante 3 minutos.

Por último, se procedió al montaje de los porta, los cuales fueron posteriormente cubiertos con un medio de montaje acuoso, en nuestro caso Mowiol (Carlo Erba reagents, España).

Tinción de eosina y hematoxilina

Dado que las células suelen carecer de un color propio, su observación al microscopio óptico resulta de gran dificultad si éstas no han sido previamente teñidas. Esta tinción mediante colorantes más o menos específicos nos permite visualizar en cierto grado la estructura del tejido y del interior celular. En este estudio se llevó a cabo la tinción de eosina y hematoxilina de los DRG para el posterior análisis de los mismos.

Para esta tinción, se descongelaron las muestras de DRG que previamente se habían obtenido (ver el apartado de obtención y preparación del tejido) y se deshidrataron de forma progresiva para posteriormente sumergir los portas en Hematoxilina de Mayer durante 5 minutos. La hematoxilina es un colorante que tiñe los componentes ácidos de los tejidos de un color violeta, lo cual nos permitiría la observación del núcleo de las células de los DRG. Tras un lavado de 15 minutos se procedió a la tinción con eosina al 2% durante 2 minutos. La eosina es un colorante que tiñe los componentes de carácter básico de los tejidos de un color rosado, por lo que nos permitiría la visualización de los citoplasmas de las células de los DRG. Finalmente, tras un lavado de 15 minutos, se volvió a deshidratar el tejido de forma progresiva, y por último se llevó a cabo el montaje con DPX.

Análisis estadísticos

Para la obtención de los datos tanto de las imágenes obtenidas del cerebelo como de los DRG, se utilizó el programa para Windows ImageJ (ImageJ, Maryland, EE.UU.). El conteo de CP se llevó a cabo midiendo toda la longitud de la capa de CP en tres cortes representativos del cerebelo de cada ratón. Posteriormente, el número obtenido se normalizó para todos los ratones a un promedio de 1 mm. Para el conteo de neuronas en los DRG, se midió el área de cada uno de los cortes de los DRG para una serie (30 cortes por serie), se cuantificó el número de neuronas, y se estandarizó a un promedio de $100 \mu\text{m}^2$. Para la cuantificación del recubrimiento de mielina en los DRG, se midió el área total de 25 axones por cada corte (en total 750 axones por cada ratón) y se le restó el área de cada axón sin recubrimiento de mielina, obteniéndose por tanto el área correspondiente al recubrimiento de mielina.

Las diferencias cuantitativas entre los diferentes grupos se analizaron utilizando un test de *ANOVA*. En el caso de que existiesen diferencias significativas, se llevó a cabo la comparación entre pares de grupos con el test de comparación múltiple de Tukey. El nivel de significación se estableció en $p < 0.05$ – diferencias significativas (*) – $p < 0.01$ – diferencias muy significativas (**) – $p < 0.001$ – diferencias altamente significativas (***). El programa estadístico utilizado fue el GraphPad Prism para Windows (GraphPad Prism, San Diego, California, EE.UU.).

Resultados

Efecto de los trasplantes de MO a nivel de comportamiento

En este apartado se recogen los resultados de las pruebas de comportamiento a las que se sometieron los grupos experimentales. Un análisis de rotorod realizado en el laboratorio previamente al inicio de este trabajo, reveló que los animales control sanos eran capaces de mejorar su tiempo de latencia durante los tres días de entrenamiento, mientras que los animales atáxicos apenas mejoraban su puntuación (figura 3).

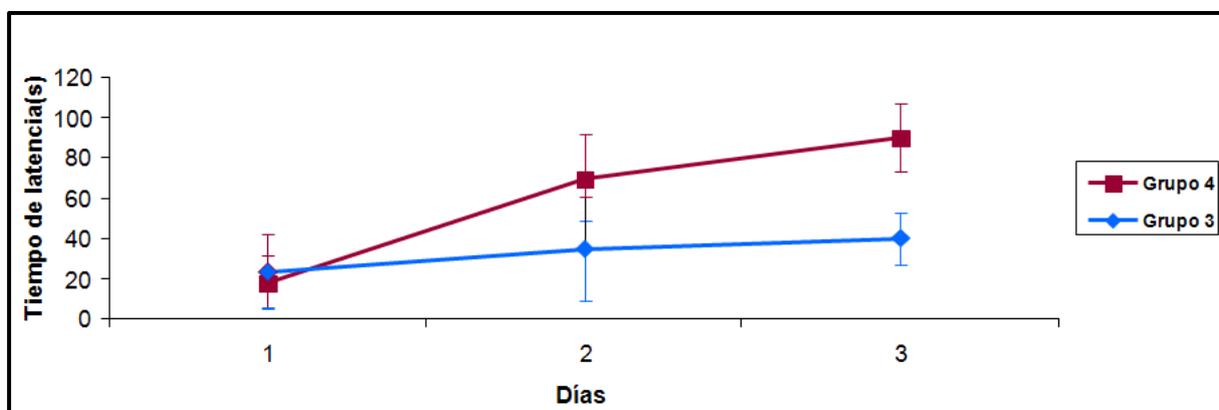


Figura 3. Representación de los datos relacionados con la actividad motora obtenidos en la prueba de rotorod. En la gráfica se muestra la capacidad de aprendizaje motor de los ratones control al aumentar su tiempo de latencia en la prueba de rotorod. Los ratones atáxicos, por el contrario, no presentaron una mejoría significativa tras los 3 días de entrenamiento. n = 5.

Posteriormente se realizó un segundo test de rotorod con una segunda cohorte de animales, esta vez trasplantados con MO y sus correspondientes controles. Los datos obtenidos, expresados en porcentaje de mejora a lo largo de los 3 días de entrenamiento, en los 4 grupos experimentales pueden observarse en la figura 4. Tras la normalización de dicho porcentaje, se observó que a tiempos tempranos (6 meses) no existen, bajo nuestras condiciones de experimentación, diferencias significativas entre los diferentes grupos. Sin embargo, según se avanza en la edad se puede comprobar que los animales atáxicos que han recibido el trasplante (grupo 1) presentan una leve mejoría en su condición motora, gracias a la cual son capaces de mejorar su tiempo de latencia de caída frente a sus compañeros atáxicos sin trasplante (grupo 3) que progresivamente van reduciendo su capacidad motora.

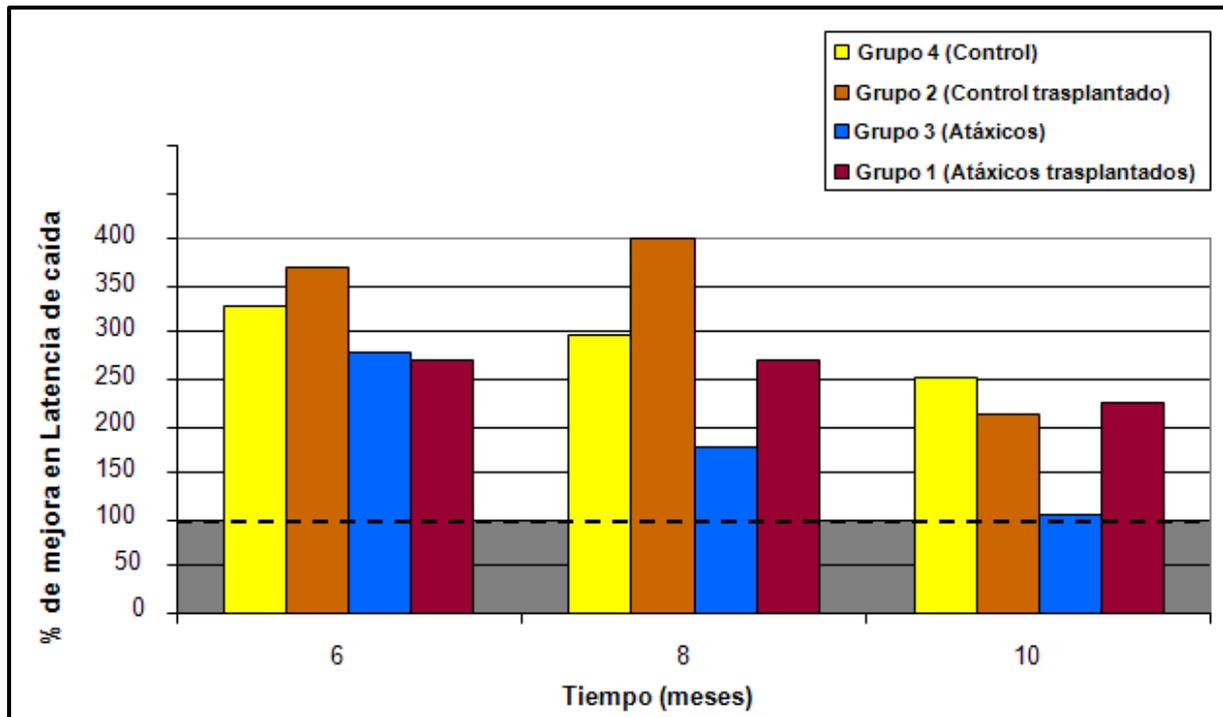


Figura 4. Representación de los datos obtenidos para los cuatro grupos experimentales en la mejora del tiempo de latencia de caída. En la gráfica se muestran el porcentaje de mejora en la latencia de los ratones tras el entrenamiento en rotorod. Datos normalizados frente al grupo 3. n = 5.

Efecto de los trasplantes de MO a nivel histológico

Cuantificación del número de células de Purkinje en el cerebelo

Una vez completadas las diferentes pruebas de comportamiento, se pasó a estudiar la posible relación de estos efectos con la llegada de células derivadas del trasplante de MO al cerebelo de los animales trasplantados. En primer lugar se comprobó la llegada de células RFP positivas al tejido huésped mediante una tinción inmunohistoquímica indirecta (ver materiales y métodos) (figuras 5 y 6). No se apreció diferencia en el número de células RFP positivas entre los grupos ni en su distribución. Para estudiar un posible efecto del trasplante sobre los órganos diana de la FA se cuantificaron en el cerebelo las PC de los cuatro grupos experimentales y se compararon entre ellas (ver materiales y métodos). El conteo se llevó a cabo en al menos 3 diferentes cortes correspondientes a la zona central, medial y lateral representativos del cerebelo y a lo largo de la capa de las CP en cada uno de los ratones pertenecientes a los grupos de experimentación (figura 6). Para normalizar los datos, el número obtenido de CP se dividió por la longitud total analizada en cada corte. Tras ello, se observó que los animales atáxicos (grupo 3) presentan una reducción aproximada del 30% en el número de CP respecto al grupo control. Interesantemente, se observó una clara recuperación del número de CP en los animales atáxicos trasplantados (grupo 1) de forma

altamente significativa ($p < 0.001$) cuando se comparó con el grupo de animales atáxicos sin trasplante (figura 7).



Figura 5. Imagen de microscopía de epifluorescencia convencional de una sección de cerebelo de un animal representativo en el que se muestra la llegada de células RFP positivas al SNC. En la imagen se pueden apreciar algunos puntos rojos en las diferentes capas del cerebelo correspondientes a células RFP positivas procedentes del trasplante con MO. Barra de escala: 500 μm .

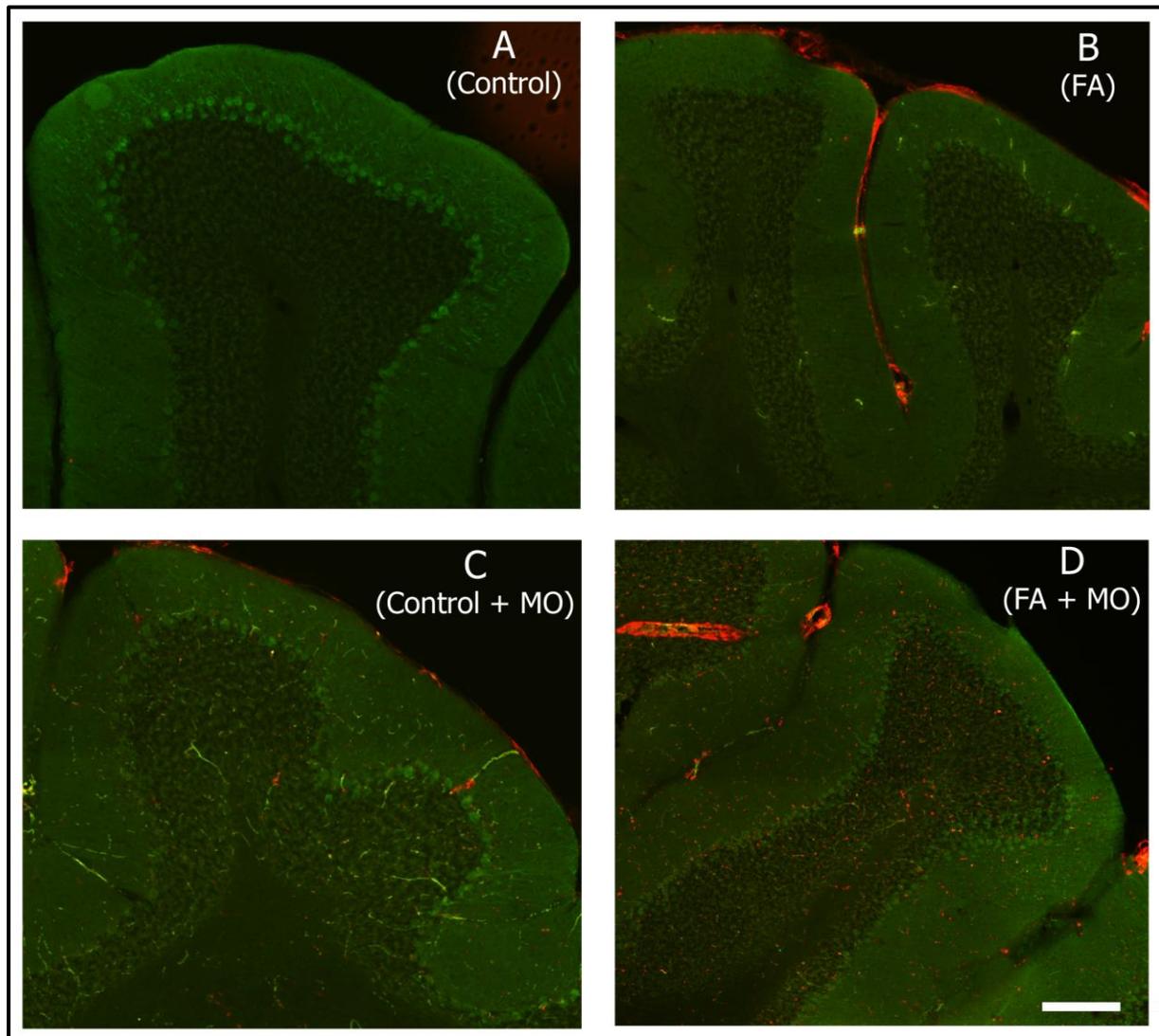


Figura 6. Imágenes de microscopía de epifluorescencia convencional en secciones de cerebelo de un animal representativo de cada grupo experimental en las que se muestran las CP y las células RFP positivas. A muestra un lóbulo obtenido de una imagen panorámica de un corte completo de un cerebelo de un ratón del grupo 4 (controles sin trasplante). En ella se puede observar una capa continua de CP y ninguna célula RFP positiva. **B** muestra un lóbulo obtenido de una imagen panorámica de un corte completo de un cerebelo de un ratón del grupo 3 (atáxicos sin trasplante). En ella se puede observar una capa discontinua de CP, así como ninguna célula RFP positiva. **C** muestra un lóbulo obtenido de una imagen panorámica de un corte completo del cerebelo de un ratón del grupo 2 (controles trasplantados). En ella se puede observar la corteza de CP y la existencia de células RFP positivas procedentes de la médula ósea trasplantada. **D** muestra un lóbulo obtenido de una imagen panorámica de un corte completo de un ratón del grupo 1 (atáxicos trasplantados). En ella se muestra la corteza de CP y la existencia de células RFP positivas procedentes de la médula ósea trasplantada. Barra de escala: 200 μ m.

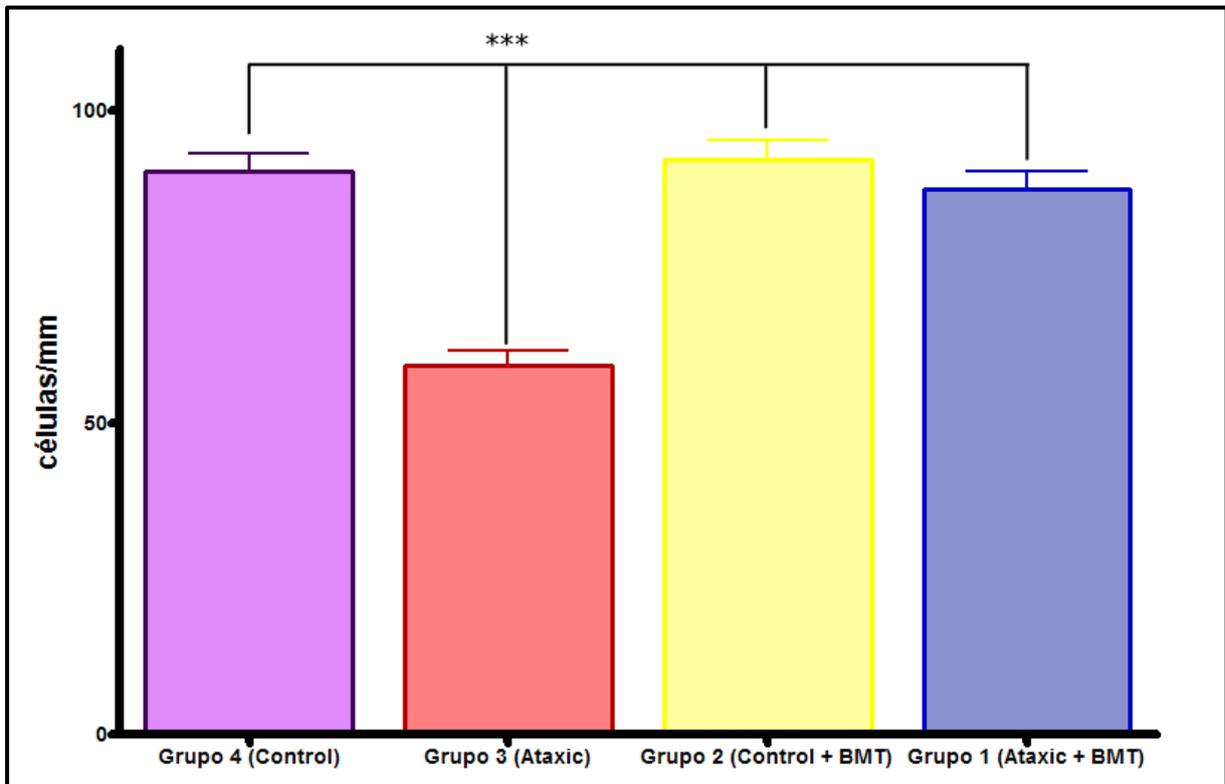


Figura 7. Representación de los datos obtenidos en la cuantificación del número de CP en los 4 grupos experimentales. La cuantificación de las CP se estandarizó para una distancia de 1 mm en los cuatro grupos. Se puede observar una clara recuperación del número de CP de los animales del grupo 1 en comparación con el grupo 3, el cual fue significativamente diferente al resto de grupos ($p < 0.001$) tras la realización de los test estadísticos adecuados (ver materiales y métodos). **Grupo 1:** Media = 87.57; SEM = ± 2.845 ; n = 4. **Grupo 2:** Media 92.30; SEM = ± 3.100 ; n = 4. **Grupo 3:** Media = 59.27; SEM = ± 2.275 ; n = 5; **Grupo 4:** Media = 90.42; SEM = ± 2.767 ; n = 8.

Cuantificación del número de neuronas en los DRG

Tras los resultados obtenidos en las pruebas de comportamiento, el hecho de observar una leve mejoría motora hizo necesaria la cuantificación del número de neuronas en los DRG, el tejido diana principal en la FA. Para ello se cuantificó el área completa de cada uno de los cortes de los DRG obtenidos en cada grupo, donde a simple vista podrían observarse algunas diferencias morfológicas entre los diferentes grupos experimentales (figura 8), a la vez que se contó el número de neuronas observadas en cada uno de estos cortes. Tras el análisis estadístico, donde se normalizaron los resultados de los 4 grupos sobre $100 \mu\text{m}^2$, se observaron diferencias altamente significativas ($p < 0.001$) entre el grupo 3 (atáxicos sin trasplante) y el resto de grupos experimentales. Como estaba descrito en la literatura, este grupo mostró una reducción del 20-25% en el número de neuronas de los DRG (figura 9). Además se observó que estas células presentaban vacuolización. Por el contrario, los ratones

atáxicos que fueron trasplantados (grupo 1) mostraron un número de neuronas similar al de los grupos control y un menor nivel de vacuolización (figuras 8 y 9).

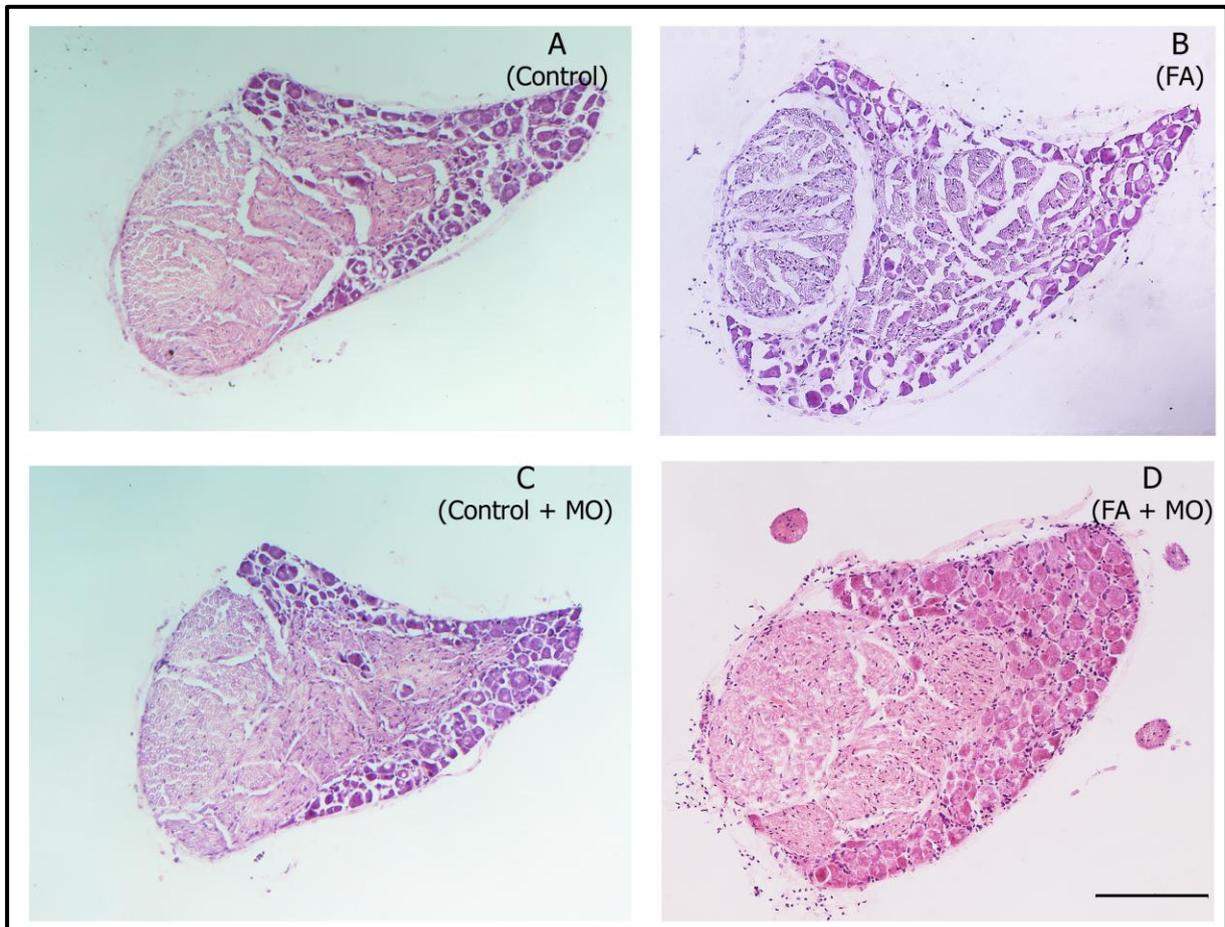


Figura 8. Imágenes de microscopía óptica de los DRG teñidos con eosina y hematoxilina. A muestra el corte de un DRG de un animal del grupo 4 (controles sin trasplante). **B** muestra el corte de un DRG de un animal del grupo 3 (atáxicos sin trasplante). **C** muestra el corte de un DRG de un animal del grupo 2 (controles trasplantados). **D** muestra el corte de un DRG de un animal del grupo 1 (atáxicos trasplantados). En todos los casos se puede observar una agrupación de neuronas teñidas en color morado oscuro/violeta, así como una zona redondeada más clara teñida de color rosa que corresponde a los paquetes de axones del DRG. Barra de escala: 200 μ m.

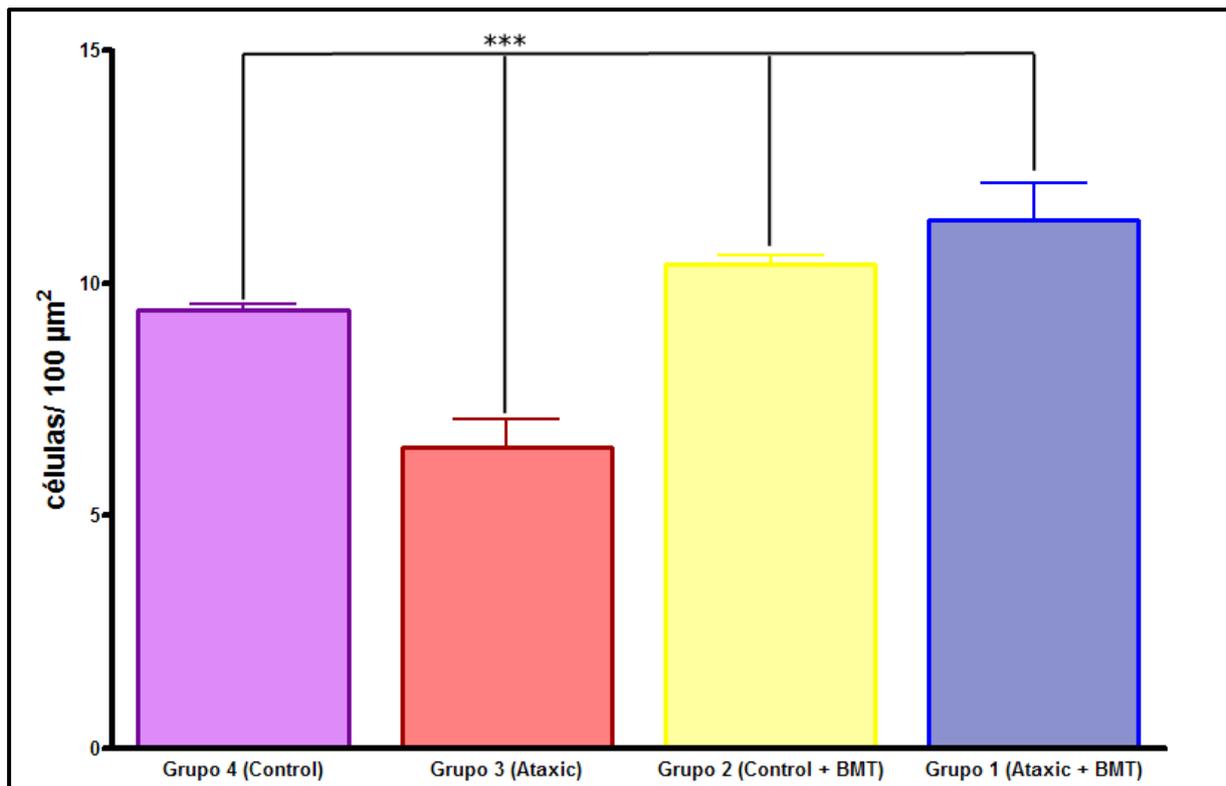


Figura 9. Representación de los datos obtenidos tras la cuantificación del número de neuronas en los DRG de los diferentes grupos experimentales. La cuantificación de las neuronas se estandarizó a un área de 100 μm^2 para los cuatro grupos. Se puede observar un aumento significativo del número de neuronas en el grupo 1 (atáxicos trasplantados) cuando se compara con el grupo 3 (atáxicos sin trasplante), el cual presenta un número significativamente menor al ser comparado con el resto de grupos. **Grupo 1:** Media = 11.35; SEM = ± 0.8132 ; n = 5. **Grupo 2:** Media = 10.41; SEM = ± 0.1762 ; n = 4. **Grupo 3:** Media = 6.455; SEM = ± 0.6311 ; n = 6. **Grupo 4:** Media = 9.430; SEM = ± 0.1058 ; n = 5.

Cuantificación del recubrimiento de mielina de los axones de los DRG

Como ya se ha comentado en la introducción, una de las características de los pacientes de FA es que presentan una disminución en el recubrimiento de mielina de los axones de los DRG. Por lo tanto, sería importante correlacionar los datos obtenidos hasta ahora con la cuantificación de dicho grosor en nuestros 4 grupos problema. Para ello se llevó a cabo la cuantificación del área completa de los axones, incluyendo la totalidad del recubrimiento de mielina, y se le restó el área completa del axón sin incluir el recubrimiento de mielina a partir de las imágenes obtenidas al microscopio óptico en cada uno de los grupos (figura 10). De esta forma (área mayor menos área menor) se puede obtener el área concreta del recubrimiento de mielina en cada uno de los axones. En concreto se contaron 25 axones por corte, y 30 cortes por ratón. Tras los análisis estadísticos correspondientes, se encontraron diferencias altamente significativas ($p < 0.001$) entre el grupo 3 (atáxicos trasplantados) y el

resto de grupos. Como se observa en la figura 11, el grupo 3 presenta un descenso de aproximadamente un 35% respecto al grupo control, mientras que el grupo 2 presentó un área aproximadamente igual al del grupo control. Aunque a priori el área observada para el grupo 1 resultó ser mayor al resto de grupos, esta diferencia no fue significativa cuando se comparó con los grupos 2 y 4, mientras que este claro aumento resultó ser altamente significativo ($p > 0.001$) cuando se comparó con el grupo 3 (figura 11).

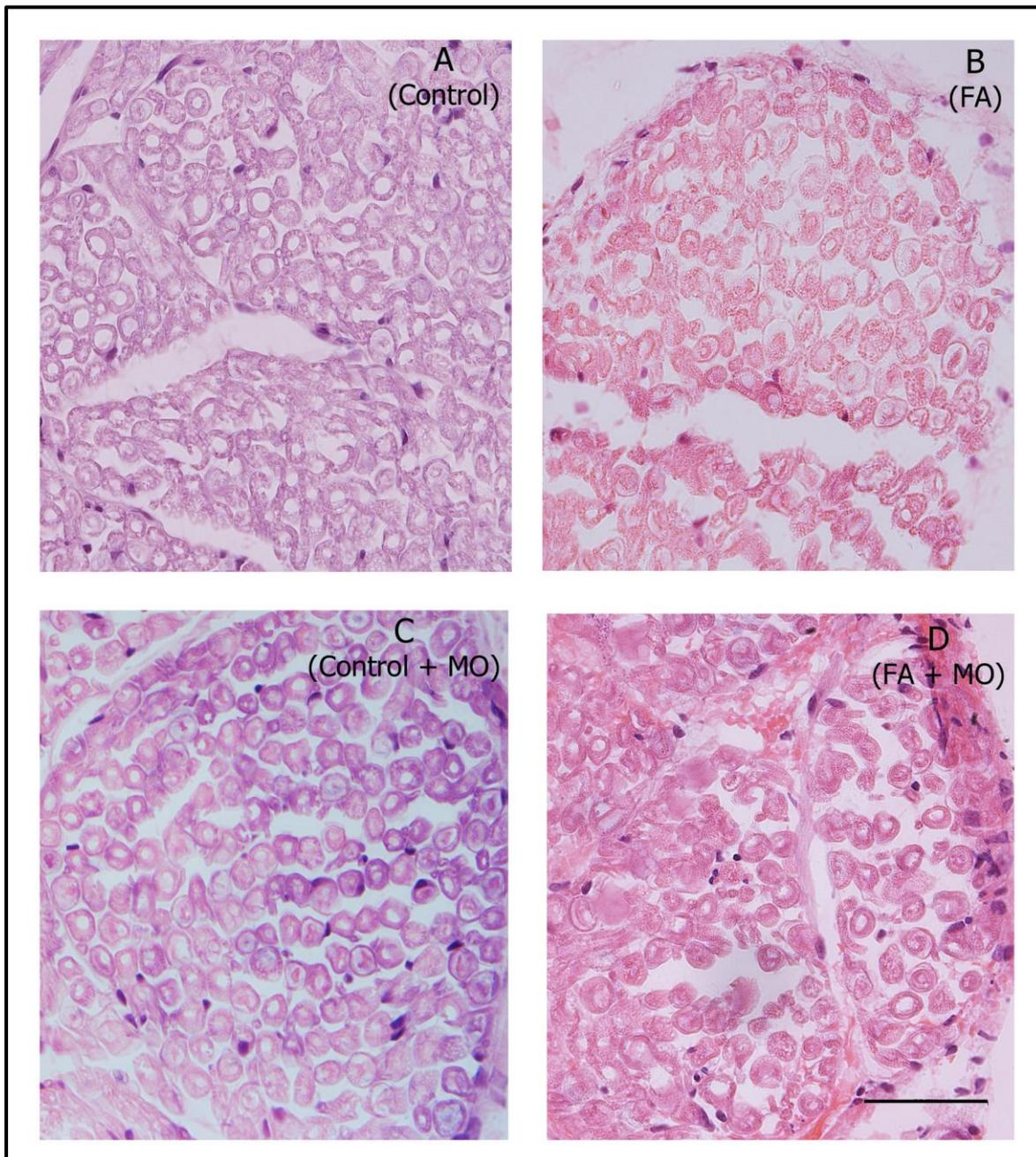


Figura 10. Imágenes de microscopía óptica de los paquetes de axones de los DRG en los cuatro grupos problema teñidas con eosina y hematoxilina. **A** muestra el paquete de axones de un corte de los DRG del grupo 1 (atáxicos trasplantados). **B** muestra el paquete de axones de un

corte de los DRG del grupo 2 (controles trasplantados). **C** muestra el paquete de axones de un corte de los DRG del grupo 3 (atáxicos sin trasplante). **D** muestra el paquete de axones de un corte de los DRG del grupo 4 (control sin trasplante). En todos los casos se puede observar un área blanquecina rodeada por un área de color rosado/violeta que representa el recubrimiento de mielina. Barra de escala: 50 μm .

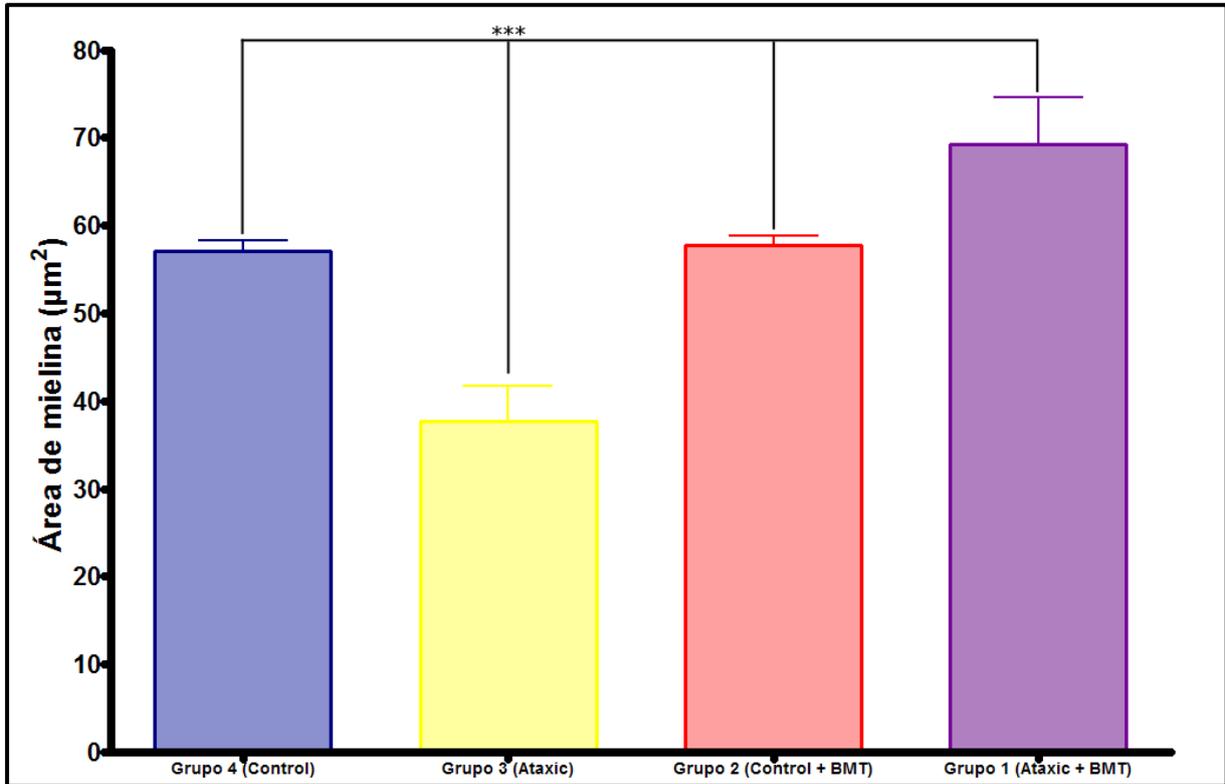


Figura 11. Representación de los datos obtenidos tras la cuantificación del área del recubrimiento de mielina de los axones en los DRG de los cuatro grupos problema. Se puede observar un aumento significativo del área de mielina en los animales del grupo 1 (atáxicos trasplantados) cuando son comparados con el grupo 3 (atáxicos sin trasplante). **Grupo 1:** Media = 69.30; SEM = ± 5.351 ; n = 5. **Grupo 2:** Media = 57.74; SEM = ± 1.148 ; n = 4. **Grupo 3:** Media = 37.66; SEM = ± 4.025 ; n = 6. **Grupo 4:** Media = 57.15; SEM = ± 1.138 ; n = 5.

Discusión

En ese apartado se analizan los resultados expuestos en la sección anterior mediante la explicación de las posibles causas, así como nuevas hipótesis de trabajo para futuros estudios.

Ablación de la médula ósea mediante busulfan

Como se ha comentado en apartados anteriores, para la realización del trasplante de MO es necesario eliminar la MO del animal receptor mediante el tratamiento con sustancias químicas. En la mayoría de los trabajos previos, este tipo de ablaciones se ha realizado normalmente mediante irradiación³, pero el hecho de que los trasplantes de MO se realizasen en las primeras 24 horas tras el nacimiento de los ratones implicaba la utilización de otro tratamiento, ya que la irradiación interferiría en el proceso normal del desarrollo cerebral.

Pruebas de comportamiento

Las pruebas de comportamiento se llevaron a cabo con el objetivo de evaluar una mejora en la actividad motora de los ratones atáxicos tras el trasplante con MO de animales sanos. Los resultados obtenidos indican que a tiempos tempranos (6 meses), bajo nuestras condiciones de experimentación, no se observan diferencias significativas en la actividad motora de los ratones atáxicos. Esto contradice lo publicado anteriormente, ya que se ha descrito que a partir de los 3-4 meses ya se observa una menor latencia en el test de rotarod en los animales afectados por la mutación. No obstante, una posible explicación es que existan diferencias en nuestra cepa en el número de repeticiones del triplete que constituye la mutación. A mayor longitud mayor defecto, por lo que es posible que nuestra cepa tenga una menor longitud de repeticiones y por ello tarde más en presentar los defectos motores. Otra explicación alternativa son diferencias en las condiciones de estabulación de los animales que pueden afectar a su salud y condición física.

El análisis de los videos de rotorod reveló que los animales atáxicos muestran un progresivo deterioro en la actividad motora, llegando a ser significativa a los 12 meses de edad respecto a los controles. Por el contrario, aquellos animales con FA y trasplante de MO fueron capaces de mejorar su tiempo de latencia sobre el cilindro rotatorio (figura 4). Estos resultados, aunque parecen evidentes en cuanto a la mejoría de los individuos, han de tomarse como datos preliminares debido al bajo número de ratones utilizados. No obstante, parece que con el paso del tiempo el trasplante permite evitar el deterioro y las células trasplantadas de la

MO han conseguido evitarlo o al menos retrasarlo, lo que favorece al correcto funcionamiento y desarrollo motor del individuo.

Como ya se ha comentado previamente, las BMSC tienen la capacidad de transdiferenciarse y de realizar la fusión celular, lo que podría dar lugar a un reemplazo o corrección de las neuronas implicadas en los defectos motores. Sin embargo, el análisis histológico, que vamos a comentar a continuación, descarta estas explicaciones y sugiere que los efectos a nivel de comportamiento pueden deberse a otros motivos. Independientemente del mecanismo empleado, parece ser que estas células han conseguido reducir los síntomas de los individuos atáxicos y que no han provocado efectos adversos en los controles trasplantados. No obstante, sería de gran interés la realización de otras pruebas de comportamiento adicionales como la de campo abierto, foot-printing, o el análisis de la velocidad media de desplazamiento para la confirmación de los datos obtenidos en el rotorod.

Análisis histológico

A continuación se discutirán los resultados obtenidos tras el análisis histológico del cerebelo y los DRG. Estos datos, de forma general, corroboran la mejoría motora observada en los análisis de comportamiento, aunque sería necesario el análisis de otros parámetros a nivel histológico que concedan mayor robustez al estudio.

Efecto del trasplante de médula ósea en el cerebelo

Mediante las técnicas inmunohistoquímicas ya mencionadas, se pudo confirmar la llegada de las células del trasplante al tejido (figuras 5 y 6), pero parece que éstas eran células de la microglía. Al no observarse la presencia de PC RFP positivas, salvo alguna esporádica, ni de neuronas RFP positivas en los DRG, se descartan los procesos de fusión y transdiferenciación de las BMSC.

El análisis del número de PC en los grupos experimentales nos sorprendió, ya que no se esperaba encontrar diferencias en el número de PC, dado que esto no se había descrito previamente en la bibliografía. Esta discrepancia con la bibliografía podrían ser debido a que los animales analizados en este estudio eran de una edad cercana al año de vida, mientras que en la bibliografía, los análisis histológicos del cerebelo en modelos animales de FA se han realizado siempre a edades tempranas. Por lo tanto, es posible que la neurodegeneración de las PC ocurra de forma tardía, algo que no sería de extrañar dado que la vía cortico-nuclear en el cerebelo se encuentra afectada^{27,38}. Esto provocaría que la falta de comunicación entre la corteza cerebelar y los núcleos profundos del cerebelo acabase por favorecer la neurodegeneración de las PC. De esta manera, podrían explicarse parcialmente las mejoras a

nivel motor de estos animales cuando fueron sometidos a la prueba del rotorod, donde el equilibrio, y por lo tanto la actividad del cerebelo, juegan un papel muy importante. No obstante, sería interesante estudiar este proceso de forma más detallada para confirmar dicha hipótesis, lo que abriría una nueva línea de investigación a tener en cuenta.

El hecho de observar la presencia de células RFP en los cortes de cerebelo indica que las células de la MO trasplantadas, o más bien las células producidas por éstas, han llegado al SNC. Esto concuerda con trabajos previos en los que se ha demostrado que las células de la MO son capaces de producir tipos celulares típicos del SNC como la microglía⁴⁶. Una explicación posible para los resultados obtenidos en este estudio es que las células de la MO trasplantadas hayan producido una población de microglía que favorezca el mantenimiento del DN y por ende, de la vía cortico-nuclear del cerebelo. Este “re-establecimiento” de la comunicación entre la corteza cerebelar y los núcleos profundos del cerebelo podría favorecer el desarrollo de una actividad motora “normal” y por tanto evitar la neurodegeneración de las PC a edades tardías. Hay que recordar que los defectos en frataxina conducen a alteraciones en el metabolismo mitocondrial y aumentos en estrés oxidativo. Las células derivadas del trasplante, además de secretar una serie de factores neurotróficos que permiten una mejor supervivencia neuronal, podrían ayudar a reducir el estrés oxidativo. Precisamente, la microglía juega un importante papel en la eliminación de radicales libres y la MO trasplantada podría presentar una mejor respuesta a estos defectos de los animales atáxicos.

No obstante, sería interesante realizar estudios precisos para caracterizar el tipo celular RFP positivo que encontramos en el SNC tras el trasplante con MO de animales normales. Posiblemente, un análisis de los niveles de estrés mediante la evaluación de la actividad superóxido dismutasa y otros marcadores nos podría dar una respuesta.

Efecto del trasplante de médula ósea en los DRG

Uno de los tejidos más afectados en FA son los DRG, los cuales juegan un papel esencial en la actividad motora de los mamíferos. Tras lo obtenido en los análisis comportamentales y en el análisis histológico del cerebelo, el siguiente punto a tratar sería el punto de conexión entre el SNC y el músculo esquelético, esto es, los DRG.

Tras el análisis bibliográfico de los DRG hecho en la introducción, cabía esperar que los animales atáxicos presenten claras diferencias en esta zona cuando son comparados con los individuos control. El aumento significativo del número de neuronas por cada 100 μm^2 observado en los animales atáxicos trasplantados al compararlos con los atáxicos sin trasplantar podría ser debido a un efecto protector o de favorecimiento de la supervivencia

neuronal más que a la diferenciación de las células trasplantadas de MO en nuevas neuronas, hipótesis que parece tomar fuerza tras la reciente publicación de J. Jones y colaboradores⁵.

Por último, el análisis del área de recubrimiento de mielina en los DRG terminó confirmando el hecho de que los trasplantes de MO presentan un efecto positivo en animales atáxicos, aunque resulten necesarios una gran variedad de estudios adicionales. En conjunto, un ambiente neuroprotector ofrecido en los DRG por las células trasplantadas, así como la eliminación de un ambiente oxidativo y probablemente un aumento en la expresión de frataxina⁵, terminen favoreciendo un desarrollo del SNC más cercano al de animales sanos, por lo que en este sentido, también se vería favorecido el aumento del recubrimiento de mielina de los axones. Esta hipótesis debe confirmarse en el futuro mediante el análisis por RT-PCR y/o Western blot de los niveles de frataxina y verificando los niveles de estrés oxidativo como se ha indicado anteriormente.

Conclusiones y perspectivas de futuro

De acuerdo con los objetivos planteados en este Trabajo de Fin de Máster y como consecuencia de los resultados obtenidos y la discusión llevada a cabo, podríamos decir que el trasplante de BMSC en animales con FA produce un efecto beneficioso parcial, que tras la realización de estudios más exhaustivos podría representar una alternativa para el tratamiento de esta enfermedad. Estos estudios consistirían en pruebas de comportamiento adicionales a las analizadas en este trabajo que sirviesen para confirmar una mejoría parcial de la actividad motora. También deberían realizarse estudios de identificación de las células trasplantadas que faciliten la explicación de los resultados del trasplante. A nivel molecular, resultaría de gran importancia un análisis de la expresión de frataxina en los cuatro grupos estudiados, ya que esto podría apoyar los resultados observados en los DRG, así como el estudio de la expresión de marcadores apoptóticos, de proliferación celular, o de proteínas implicadas en el estrés oxidativo. Adicionalmente, es necesario destacar que uno de los órganos principalmente afectados en esta enfermedad es el corazón, donde generalmente y como hemos descrito en la introducción, se suelen observar acúmulos de hierro en los miocitos. Las muestras de corazón ya han sido preparadas y teñidas, y solo faltaría el análisis detallado posterior de las mismas, pero a simple vista ya podemos decir que parece haber diferencias significativas en los acúmulos de hierro entre los diferentes grupos experimentales.

Finalmente, podríamos concluir afirmando que los estudios realizados arrojan cierta esperanza sobre este tratamiento y por lo tanto nos invitan a continuar con la realización de estos estudios adicionales para plantear en un futuro lejano una posible aplicación clínica.

Bibliografía

- 1 Jain, K. in *Applications of Biotechnology in Neurology* Ch. 11, 361-382 (Humana Press, 2013).
- 2 Schulz, J. B. *et al.* Diagnosis and treatment of Friedreich ataxia: a European perspective. *Nat Rev Neurol* **5**, 222-234, doi:10.1038/nrneurol.2009.26.
- 3 Alvarez-Dolado, M. *et al.* Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* **425**, 968-973, doi:10.1038/nature02069.
- 4 Sanchez-Ramos, J. R. Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. *J. Neurosci. Res.* **69**, 880-893, doi:10.1002/jnr.10337 (2002).
- 5 Jones, J. *et al.* Mesenchymal Stem Cells Improve Motor Functions and Decrease Neurodegeneration in Ataxic Mice. *Mol Ther*, doi:10.1038/mt.2014.143.
- 6 Bonilla, S. *et al.* Functional neural stem cells derived from adult bone marrow. *Neuroscience* **133**, 85-95, doi:S0306-4522(05)00187-9 [pii].
- 7 Jones, J., Estirado, A., Redondo, C. & Martinez, S. Stem cells from wildtype and Friedreich's ataxia mice present similar neuroprotective properties in dorsal root ganglia cells. *PLoS One* **8**, e62807, doi:10.1371/journal.pone.0062807.
- 8 Jones, J. *et al.* Mesenchymal stem cells rescue Purkinje cells and improve motor functions in a mouse model of cerebellar ataxia. *Neurobiol. Dis.* **40**, 415-423, doi:10.1016/j.nbd.2010.07.001.
- 9 Dantuma, E., Merchant, S. & Sugaya, K. Stem cells for the treatment of neurodegenerative diseases. *Stem Cell Res Ther* **1**, 37, doi:10.1186/scrt37.
- 10 Fortier, L. A. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Vet. Surg.* **34**, 415-423, doi:VSU00063 [pii].
- 11 Mimeault, M. & Batra, S. K. Concise review: recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. *Stem Cells* **24**, 2319-2345, doi:2006-0066 [pii].
- 12 Grove, J. E., Bruscia, E. & Krause, D. S. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells* **22**, 487-500, doi:22/4/487 [pii].
- 13 Seita, J. & Weissman, I. L. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* **2**, 640-653, doi:10.1002/wsbm.86 (2010).

- 14 Kondo, M. *et al.* Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 759-806, doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141007.
- 15 Dautremepuits, C., Fortier, M., Croisetièrè, S., Belhumeur, P. & Fournier, M. Modulation of juvenile brook trout (*Salvelinus fontinalis*) cellular immune system after *Aeromonas salmonicida* challenge. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **110**, 27-36, doi:S0165-2427(05)00290-4 [pii].
- 16 Huang, G. T., Gronthos, S. & Shi, S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J. Dent. Res.* **88**, 792-806, doi:10.1177/0022034509340867.
- 17 Lin, F. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: a fat chance of curing kidney disease? *Kidney Int.* **82**, 731-733, doi:10.1038/ki.2012.158.
- 18 Bianco, P. "Mesenchymal" Stem Cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, doi:10.1146/annurev-cellbio-100913-013132 (2014).
- 19 Catacchio, I. *et al.* Evidence for bone marrow adult stem cell plasticity: properties, molecular mechanisms, negative aspects, and clinical applications of hematopoietic and mesenchymal stem cells transdifferentiation. *Stem Cells Int* **2013**, 589139, doi:10.1155/2013/589139 (2013).
- 20 Krause, D. S. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Gene Ther.* **9**, 754-758, doi:10.1038/sj.gt.3301760 (2002).
- 21 Chen, Y., Teng, F. Y. & Tang, B. L. Coaxing bone marrow stromal mesenchymal stem cells towards neuronal differentiation: progress and uncertainties. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 1649-1657, doi:10.1007/s00018-006-6019-5 (2006).
- 22 Jackson, K. A. *et al.* Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J. Clin. Invest.* **107**, 1395-1402, doi:10.1172/JCI12150 (2001).
- 23 Prockop, D. J. & Olson, S. D. Clinical trials with adult stem/progenitor cells for tissue repair: let's not overlook some essential precautions. *Blood* **109**, 3147-3151, doi:blood-2006-03-013433 [pii].
- 24 Harding, A. E. Friedreich's ataxia: a clinical and genetic study of 90 families with an analysis of early diagnostic criteria and intrafamilial clustering of clinical features. *Brain* **104**, 589-620 (1981).
- 25 Pandolfo, M. Friedreich ataxia. *Arch. Neurol.* **65**, 1296-1303, doi:10.1001/archneur.65.10.1296.

- 26 Campuzano, V. *et al.* Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* **271**, 1423-1427 (1996).
- 27 Koeppen, A. H. Friedreich's ataxia: pathology, pathogenesis, and molecular genetics. *J. Neurol. Sci.* **303**, 1-12, doi:10.1016/j.jns.2011.01.010.
- 28 Baralle, M., Pastor, T., Bussani, E. & Pagani, F. Influence of Friedreich ataxia GAA noncoding repeat expansions on pre-mRNA processing. *Am J Hum Genet* **83**, 77-88, doi:10.1016/j.ajhg.2008.06.018.
- 29 Pandolfo, M. & Pastore, A. The pathogenesis of Friedreich ataxia and the structure and function of frataxin. *J. Neurol.* **256 Suppl 1**, 9-17, doi:10.1007/s00415-009-1003-2 (2009).
- 30 Bencze, K. Z. *et al.* The structure and function of frataxin. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **41**, 269-291, doi:P67550260KGG21V5 [pii].
- 31 Gerber, J., Muhlenhoff, U. & Lill, R. An interaction between frataxin and Isu1/Nfs1 that is crucial for Fe/S cluster synthesis on Isu1. *EMBO Rep* **4**, 906-911, doi:10.1038/sj.embor.embor918.
- 32 Taketani, S. Acquisition, mobilization and utilization of cellular iron and heme: endless findings and growing evidence of tight regulation. *Tohoku J. Exp. Med.* **205**, 297-318, doi:JST.JSTAGE/tjem/205.297 [pii] (2005).
- 33 Foury, F. & Cazzalini, O. Deletion of the yeast homologue of the human gene associated with Friedreich's ataxia elicits iron accumulation in mitochondria. *FEBS Lett.* **411**, 373-377, doi:S0014-5793(97)00734-5 [pii] (1997).
- 34 Irazusta, V. *et al.* Yeast frataxin mutants display decreased superoxide dismutase activity crucial to promote protein oxidative damage. *Free Radic. Biol. Med.* **48**, 411-420, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.11.010.
- 35 Koutnikova, H. *et al.* Studies of human, mouse and yeast homologues indicate a mitochondrial function for frataxin. *Nat. Genet.* **16**, 345-351, doi:10.1038/ng0897-345 (1997).
- 36 Koeppen, A. H. *et al.* The dorsal root ganglion in Friedreich's ataxia. *Acta Neuropathol* **118**, 763-776, doi:10.1007/s00401-009-0589-x (2009).
- 37 Al-Mahdawi, S. *et al.* GAA repeat expansion mutation mouse models of Friedreich ataxia exhibit oxidative stress leading to progressive neuronal and cardiac pathology. *Genomics* **88**, 580-590, doi:S0888-7543(06)00197-2 [pii].

- 38 Koeppen, A. H. *et al.* The dentate nucleus in Friedreich's ataxia: the role of iron-responsive proteins. *Acta Neuropathol* **114**, 163-173, doi:10.1007/s00401-007-0220-y (2007).
- 39 Weidemann, F. *et al.* The heart in Friedreich ataxia: definition of cardiomyopathy, disease severity, and correlation with neurological symptoms. *Circulation* **125**, 1626-1634, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.059477.
- 40 Cossee, M. *et al.* Inactivation of the Friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 1219-1226, doi:ddd132 [pii] (2000).
- 41 Al-Mahdawi, S. *et al.* GAA repeat instability in Friedreich ataxia YAC transgenic mice. *Genomics* **84**, 301-310, doi:10.1016/j.ygeno.2004.04.003.
- 42 Locatelli, F. *et al.* Busulfan, cyclophosphamide and melphalan as conditioning regimen for bone marrow transplantation in children with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* **8**, 844-849 (1994).
- 43 Wishaw, I. Q., Li, K., Wishaw, P. A., Gorny, B. & Metz, G. A. Use of rotorod as a method for the qualitative analysis of walking in rat. *J Vis Exp*, doi:10.3791/1030.
- 44 Schedina, I. M. *et al.* Isolation and characterization of eight microsatellite loci in the brook lamprey *Lampetra planeri* (Petromyzontiformes) using 454 sequence data. *J Fish Biol* **85**, 960-964, doi:10.1111/jfb.12470 (2014).
- 45 Adams, J. C. Biotin amplification of biotin and horseradish peroxidase signals in histochemical stains. *J. Histochem. Cytochem.* **40**, 1457-1463 (1992).
- 46 Rodriguez, M. *et al.* Bone-marrow-derived cell differentiation into microglia: a study in a progressive mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* **28**, 316-325, doi:S0969-9961(07)00170-2 [pii].