



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

Universidad de Valencia

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Biología Celular y Parasitología

Programa de Neurociencias Básicas y Aplicadas

ESTUDIO DE LA FUSIÓN CELULAR EN RESPUESTA A DIVERSAS CONDICIONES PATOLÓGICAS

-TESIS DOCTORAL-

MARINA PIQUER GIL

Valencia, Octubre 2015

Director: Dr. Manuel Álvarez Dolado

Tutor: Dr. José Manuel García Verdugo

MANUEL ALVAREZ DOLADO, Científico Titular del CSIC en el Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER)

CERTIFICA:

Que la presente tesis titulada “Estudio de la fusión celular en respuesta a diversas condiciones patológicas”, ha sido realizada bajo su supervisión en el laboratorio de Terapia Celular para Neuropatologías del departamento de Medicina Regenerativa y Terapia Celular del CABIMER, por MARINA PIQUER GIL, LICENCIADA EN Biología por la Universidad de Valencia y en el programa oficial de postgrado de Neurociencias Básicas y Aplicadas; y que habiendo revisado el trabajo, considera que reúne las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste a los efectos oportunos, se expide el presente escrito.

Valencia, 26 de Octubre de 2015

Dr. Manuel Álvarez Dolado

El presente trabajo ha sido realizado en las siguientes instituciones:

- Hospital General Universitario de Valencia
- Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF) de Valencia
- Universidad de Salamanca
- CABIMER de Sevilla

Marina Piquer ha disfrutado varias becas asociadas a proyectos de investigación financiados por la Fundación Mutua Madrileña del Automovilismo, CIPF (Instituto de Salud Carlos III) y la Fundación Alicia Koplowitz.

La presente investigación obtuvo de forma competitiva fondos para su financiación de las instituciones anteriormente mencionadas, además del Ministerio de Investigación y Ciencia.

A mi madre y Fran

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecerle a mi director de tesis, el *Dr. Manuel Álvarez Dolado*, por la oportunidad que me dio al elegirme y hacer mi sueño de dedicarme a la investigación realidad. Por todos los conocimientos que me aportó, pero sobre todo, por enseñarme a ser rigurosa y responsable de mi trabajo. Y por los muchos y muy buenos momentos que pasamos juntos, tanto en el laboratorio como fuera de él.

En segundo lugar quiero dar las gracias a mi tutor en la Universidad de Valencia, *Dr. José Manuel García Verdugo*, por su colaboración y apoyo a la hora de crear y desarrollar en este proyecto.

También quisiera agradecer a los *Drs. José Ramón Alonso Peña y Eduardo Weruaga Prieto* del Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCYL) por ofrecerse a colaborar con nosotros en el estudio de la fusión celular asociada a ataxia. Y como no, a los *Drs. Javier Sánchez y David Díaz* del INCYL por su profesionalidad, amabilidad y por facilitarme tanto el trabajar con ellos.

A continuación quisiera agradecer a todos mis compañeros de laboratorio por el tiempo que pasamos juntos, pero sobre todo por las risas, su apoyo en los malos momentos y por su ayuda cuando me hizo falta. En especial quiero agradecer a *Lourdes* por estar ahí para mí siempre, tanto en lo profesional como en lo personal, sin ti esta tesis no sería lo mismo, GRACIAS amiga. A *Maleles*, por hacerme sentir como en casa cuando estaba lejos de ella y por ser paciente conmigo en las largas horas de citometría. A *Inés* por sus divertidas clases de Portuñol y grandes aportes científicos. Y a *Dani*, por las risas que compartimos, porque aún me giro cuando me llaman Macarena y por hacerme fácil que se me olvidara que estaba lejos de casa.

Y aunque a las personas que voy a mencionar ahora no aportaron tanto científicamente en la realización de esta tesis sí que lo hicieron a nivel personal, lo cual es igual de importante para mí. A *Vir*, por llegar a ser una gran compañera de trabajo y manualidades, pero sobre todo, una gran amiga. A *Arancha, Esther, Bea y Neus* por esas comidas llenas de risas y chocolate que aún siguen con las chicas de oro. A *Mara*, por las clases de pádel y por siempre ser capaz de arrancarme una sonrisa. A *Irene*, por seguirme a Sevilla y luego a Valencia convirtiéndote en una buena amiga. A *Eva*, por hacerme reír como nadie en los aburridos días de escritura, que pena que no te conociera en el confocal, seguro que nos lo hubiésemos pasado genial. A todos, amigos y compañeros de laboratorio, muchas gracias por hacer mi vida estos años más fácil.

También quisiera agradecer a *Cristina y Maribel* por hacer que Sevilla y Huelva fueran un poco como mi hogar en los años que viví allí (y por ese maravilloso calendario).

Y por último pero no menos importante, a nivel personal quisiera darle las gracias a mi titi y primi por ser más que familia. A mi madre por siempre ser mi apoyo incondicional, por saber como estoy aunque no te lo diga y por entenderme y apoyarme sin presionarme nunca. Por animarme cuando estaba cansada y por nunca dejar que me rindiera. Muchas gracias mami. Y a Fran porque no podría tener un novio mejor, que me has aguantado cuando trabajaba los fines de semana, me has esperado los días que salía tarde y me apoyaste y ayudaste incondicionalmente cuando me fui fuera. Gracias a los cuatro por hacerme fácil saber donde esta mi hogar y mi corazón.

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

BSA: solución de albúmina bovina (del inglés Bobine Serum Albumine)

CABIMER: Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa

CIPF: Centro de Investigación Príncipe Felipe.

CM: Células madre

CMA: Células madre adultas

CME: Célula madre embrionaria

CMH: Células madre hematopoyéticas

CMM: Células madre mesenquimales

CMMO: Células madre derivadas de la médula ósea

DAB: tetracloruro de diaminobenzidina (del inglés 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride)

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol diclorhidrico (del inglés 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride)

DRAQ5: 1, 5– bis[[2-(di- methylamino) ethyl] amino]- 4, 8-dihydroxyanthracene-9, 10-dione

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético (del inglés Ethylene Diamine Tetraacetic Acid)

ESM: error estándar de la media

FACS: clasificador de células por su activación fluorescente (del inglés Fluorescence-Activated Cell Sorter)

GFP: proteína verde fluorescente (del inglés Green Fluorescent Protein)

IPSC: del inglés *induced pluripotent stem cell*

MO: Médula ósea

NGS: suero normal de cabra (del inglés Normal goat serum)

NSC: Células Madre Neurales (del inglés Neural Stem Cells)

PAMP: patrón molecular asociado a patógeno (del inglés pathogen associated molecular patterns)

PBS: tampón fosfato salino (del inglés phosphate buffer saline)

PCD: Degeneración de neuronas de Purkinje (del inglés Purkinje Cell Degeneration)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés Polymerase Chain Reaction)

PFA: paraformaldehído

Pm: marcador de peso molecular

RFP: proteína roja fluorescente (del inglés Red Fluorescent Protein)

Rpm: revoluciones por minuto

SDS: Dodecil sulfato sódico (del inglés Sodium Dodecyl Sulphate)

Sma: actina del músculo liso (del inglés smooth muscle α -actin)

SSR: microsatélites (del inglés Short Sequence Repeat)

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactósido

INDICE

AGRADECIMIENTOS	9
ABREVIATURAS	13
INDICE	17
INTRODUCCIÓN	25
1 Las células madre	27
1.1 Definición y propiedades	27
1.2 Tipos y origen	27
1.2.1 Las células madre embrionarias.....	28
1.2.2 Células madre de tejidos fetales	28
1.2.3 Células madre adultas y de cordón umbilical	28
1.2.4 Células Madre Pluripotentes inducidas	30
2 Las células madre de la médula ósea.....	30
2.1 Las células madre hematopoyéticas	31
2.2 Las células madre mesenquimales	32
2.3 Plasticidad y mecanismos de acción de las CMO	33
2.3.1 Transdiferenciación celular.....	38
2.3.2 Fusión celular	38
2.3.2.1 Fusión celular como mecanismo regenerativo	40
2.3.2.1.1 Implicaciones biológicas.....	40
2.3.2.1.2 Regeneración por fusión mediada por las CMO	41
2.3.2.1.2.1 En el hígado	41
2.3.2.1.2.2 En el músculo esquelético	42
2.3.2.1.2.3 En el músculo cardiaco	43
2.3.2.1.2.4 En el cerebro.....	44
3 Ataxia y fusión celular	45
3.1 Etiología.....	46
3.2 Modelo de ataxia del ratón PCD.....	46
4 Accidente cerebrovascular y fusión celular.....	47
4.1 Modelos animales	47
4.2 Estrategias terapéuticas.....	48
4.2.1 Terapias con células derivadas de la MO	49

5 Fusión celular y sistema hematopoyético.....	49
5.1 La Inflamación.....	50
5.1.1 Inflamación como proceso inductor de la fusión celular.....	51
OBJETIVOS.....	53
MATERIALES Y MÉTODOS.....	57
1 Animales de experimentación.....	59
1.1 Condiciones de estabulación y manejo de los animales.....	59
1.2 Animales de experimentación.....	59
1.2.1 Colonia R26R.....	59
1.2.1.1 Genotipado.....	60
1.2.1.1.1 Extracción de ADN.....	60
1.2.1.1.2 PCR.....	61
1.2.1.1.3 Electroforesis.....	62
1.2.2 Colonia CRE.....	63
1.2.2.1 Genotipado.....	63
1.2.2.1.1 PCR.....	63
1.2.2.1.2 Electroforesis.....	64
1.2.3 Colonia PCD-R26R.....	64
1.2.3.1 Genotipado.....	64
1.2.4 Colonia GFP.....	65
1.2.4.1 Identificación de los animales.....	65
1.2.5 Colonia RFP.....	66
1.2.5.1 Identificación de los animales.....	66
1.2.6 Colonia CRE-GFP.....	66
1.2.6.1 Identificación de los animales.....	66
2 Modelos Patológicos Murinos.....	67
2.1 Modelo de isquemia cerebral.....	67
2.2 Modelo de ataxia.....	69
2.2.1 Genotipado.....	71
2.2.1.1 PCR.....	72
2.2.1.2 Electroforesis.....	72
2.3 Modelo de inflamación.....	73
3 Sistemas de detección de la fusión celular.....	74
3.1 Detección por X-Gal.....	74

3.2	Detección por doble marca fluorescente	74
4	Trasplante de médula ósea	75
4.1	Ablación de la médula ósea de los animales receptores	75
4.1.1	Ablación química	76
4.1.2	Ablación por irradiación	76
4.2	Obtención de las muestras de MO	77
4.3	Trasplante de células de médula ósea	78
4.3.1	Trasplante tras ablación química.....	78
4.3.2	Trasplante tras ablación por irradiación	78
4.3.3	Comprobación de la viabilidad de las células trasplantadas.....	78
4.3.4	Seguimiento del trasplante	79
4.3.4.1	Cuidados especiales de las quimeras	79
4.3.4.2	Análisis y seguimiento de las células trasplantadas mediante citometría de flujo	79
4.3.4.2.1	La citometría de flujo	79
4.3.4.2.1.1	Análisis de la incorporación de las células trasplantadas	79
4.3.4.2.1.1.1	Análisis de células de médula ósea.....	81
4.3.4.2.1.1.2	Análisis de células de bazo.....	81
4.3.4.2.1.1.3	Análisis de células de timo.....	82
4.3.4.2.2	Discriminación de dobletes en la cuantificación de los eventos de fusión.	82
5	Pruebas de comportamiento y actividad motora	83
5.1	Campo abierto	83
5.2	Velocidad media de desplazamiento	84
5.3	Rotarod	85
6	Análisis histológico	85
6.1	Obtención y preparación del tejido	86
6.1.1	Sacrificio y disección	86
6.2	Seccionado del tejido	88
6.2.1	Corte en vibrátomo	88
6.2.2	Corte en micrótomo de congelación	88
6.2.3	Corte en criostato	88
6.3	Técnica de tinción histológica.....	89
6.3.1	Histoquímica del X-Gal	89

6.3.1.1	Controles de especificidad	90
6.3.2	Tinción de Nissl	90
6.3.3	Inmunohistoquímica indirecta	91
6.3.3.1	Técnica de inmunoperoxidasa	91
6.3.3.2	Técnica de inmunofluorescencia	93
6.3.4	Inmunocitoquímica.....	94
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		97
1	Ataxia cereberal	99
1.1	Efecto de los trasplantes de MO a nivel de comportamiento	101
1.1.1	Campo abierto	101
1.1.2	Velocidad media de desplazamiento	107
1.1.3	Rotarod	109
1.2	Distribución y caracterización de las células de médula ósea en el cerebelo de los animales receptores.....	111
1.2.1	Generación de elementos gliales derivados del trasplante de médula ósea en condiciones fisiológicas normales y neurodegenerativas.	111
1.2.2	Contribución de las células derivadas de médula ósea a elementos neuronales baja condiciones normales	114
1.2.3	Contribución de las células derivadas de médula ósea a elementos neuronales baja condiciones fisiológicas neurodegenerativas	117
2	Accidente cerebrovascular.....	120
2.1	Caracterización de las células fusionadas.....	121
2.2	Estudio de la fusión celular tras un proceso isquémico	123
2.2.1	Análisis de la fusión celular tras un proceso isquémico	123
3	Sistema hematopoyético e inflamación.....	127
3.1	Análisis de la fusión celular	128
3.1.1	Análisis de los órganos hematopoyéticos	128
3.1.2	Análisis de vasos sanguíneos, cerebelo e hígado	132
3.2	Fusión celular e inflamación	135
3.2.1	Análisis de los órganos hematopoyéticos	136
3.2.2	Análisis de cerebelo e hígado	137
CONCLUSIONES.....		141
1	Ataxia cereberal	143

2 Accidente cerebrovascular.....	143
3 Sistema hematopoyético e inflamación.....	143
PUBLICACIONES	145
BIBLIOGRAFÍA.....	169
APENDICE	191
1 Soluciones.....	193
2 Anticuerpos	194

INTRODUCCIÓN

1 Las células madre

1.1 Definición y propiedades

Una célula madre (CM) es aquella célula capaz de formar clones, los cuales poseen las propiedades de auto-regenerarse y diferenciarse hacia múltiples tipos de tejidos. La primera propiedad supone la capacidad de dividirse de un modo continuo y prácticamente ilimitado, dando lugar a células hijas que mantienen las características de la CM. La segunda, la pluripotencialidad, indica la capacidad de diferenciarse a cualquier tipo o linaje celular del organismo (Berná G 2001).

Las CM se pueden clasificar basándonos en su grado de pluripotencialidad, como:

- CM totipotente: aquellas que presentan el máximo grado de pluripotencialidad, ya que son capaces de dar lugar a cualquier célula del embrión y del tejido extraembrionario. Estas células se producen tras la fusión del óvulo con el espermatozoide y mantienen sus propiedades durante las primeras divisiones del embrión.

- CM pluripotente: aquellas que son capaces de formar cualquier célula procedente de las tres capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo), pero que han perdido la totipotencia. Aunque son capaces de diferenciarse a cualquier célula del organismo, no son capaces de formar tejidos extraembrionarios. Son células descendientes de las CM totipotentes.

- CM multipotentes: aquellas células procedentes de las capas germinales que son capaces de dar lugar exclusivamente a los tipos de células derivadas de cada una de las capas.

- CM unipotente: son progenitores celulares que presentan la capacidad de autorrenovación pero que solo son capaces de dar lugar a un único tipo celular definido.

Según la definición de CM estricta solo podrían considerarse como tal las CM totipotentes y pluripotentes, pero debido al potencial clínico y las diversas características que presentan las CM multipotentes y unipotentes vamos a considerarlas como CM.

1.2 Tipos y origen

Las CM pueden ser clasificadas, además de por su potencialidad, por su origen. Siguiendo esta clasificación podemos diferenciar CM embrionarias, fetales, de cordón umbilical, adultas e iPSC (del inglés *induced pluripotent stem cell*). A

continuación detallaremos las características principales de cada tipo.

1.2.1 Las células madre embrionarias

Las CM embrionarias (CME) son CM pluripotentes derivadas de la masa celular interna del embrión durante su estadio de blastocisto. Estas células se caracterizan por su pluripotencia y su capacidad de replicación indefinida. Su identificación y aislamiento en ratón fue uno de los grandes pasos en la biología (Evans *et al.* 1981; Martin 1981). Su aislamiento en primates (Thomson *et al.* 1998) y después en blastocistos humanos (Thomson *et al.* 1998) las puso al frente de los estudios de medicina regenerativa (Mimeault *et al.* 2006; Trounson 2006). Sin embargo, el hecho de que se deba destruir el blastocisto para su obtención implica una gran controversia a nivel ético.

1.2.2 Células madre de tejidos fetales

Es bien conocida la presencia de un gran número de CM en los diferentes tejidos que componen el feto, la placenta y el líquido amniótico, durante el desarrollo. Normalmente son consideradas como multipotenciales: pueden dar lugar a los tipos celulares presentes solamente en el propio tejido al que pertenecen. Estas células generan los llamados precursores o progenitores, que están a su vez mucho más restringidos. Su potencial clínico no ha sido muy estudiado debido a la controversia para su obtención y las complicaciones asociadas al embarazo que los procedimientos intrauterinos conllevan. Destacar que existen CM fetales en la sangre circulante durante el primer trimestre de gestación (Campagnoli *et al.* 2001) las cuales, además de en el sistema hematopoyético, pueden diferenciarse dentro del linaje mesenquimal, incluyendo hueso y cartílago (Campagnoli *et al.* 2001). Por otra parte, dentro del líquido amniótico existen CM multipotentes que pueden diferenciarse en células adipogénicas, osteogénicas, miogénicas, endoteliales, hepáticas e incluso en líneas neurales (De Coppi *et al.* 2007). La obtención de este tipo celular no conlleva restricciones éticas y ya existen bancos de almacenamiento para este tipo celular. En el cerebro, las células multipotenciales son las denominadas células madre neurales (NSC, del inglés Neural Stem Cell). Las NSCs pueden aislarse del cerebro en desarrollo o en el adulto. Pueden expandirse en cultivo, lo que se conoce como neuroesferas, y son capaces de diferenciarse hacia los tres subtipos de células del linaje neural: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Gage 2000; Temple 2001).

1.2.3 Células madre adultas y de cordón umbilical

Dentro de las CM de **cordón umbilical** se pueden encontrar CM en sus restos de sangre y en su tejido conectivo (Forraz *et al.* 2011). Las CM procedentes de la sangre han sido caracterizadas como CM Hematopoyéticas (véase sección 2.1 de la

introducción) (Broxmeyer et al. 1989; McElreavey et al. 1991), mientras que las células procedentes del tejido conectivo son descritas como CM Mesenquimales (Véase sección 2.2 de la introducción) (McElreavey et al. 1991). En la actualidad estas células se usan para el tratamiento de diversas enfermedades como la anemia falciforme (Grewal et al. 2004) o la *diabetes mellitus* Tipo I (Zhao et al. 2010).

En 1991 se describió una población celular en la gelatina de Wharton del cordón umbilical similar a fibroblastos con capacidad de crecimiento (McElreavey *et al.* 1991), lo que actualmente se conocen como CM mesenquimales. Diversos estudios han demostrado que las CM mesenquimales derivadas del cordón umbilical son capaces de diferenciarse en hueso (Caballero *et al.* 2010; Xu *et al.* 2010), piel (Schneider *et al.* 2010), endotelio (Alaminos *et al.*), hepatocitos (Zhang *et al.* 2009; Anzalone *et al.* 2010) y, en menor, proporción en líneas neurales (Zhang *et al.* 2010). De esta forma las CM de cordón umbilical presentan una amplia gama de posibles utilizaciones en el campo de la medicina regenerativa, pero aunque presentan menos complicaciones éticas, sí que presentan una elevada gama de problemas de manipulación, ya que se ha visto que el modo de extracción afecta a su futura funcionalidad (Forraz et al. 2011).

En el pasado se pensaba que la mayoría de tejidos carecían de capacidad de autorrenovación o reparación debido a que no poseían CM endógenas. Sin embargo, en la última década se ha demostrado la presencia de una gran variedad de **células madre adultas** (CMA) en casi la totalidad de los tejidos. Actualmente parece ser que este tipo celular se produce durante la ontogenia y permanecen quiescentes en nichos especializados durante la etapa adulta. Este tipo celular presenta una menor capacidad de diferenciación y dan lugar a un número más limitado de progenitores celulares, normalmente aquellos que constituyen exclusivamente el tejido en donde se encuentran.

Se pueden encontrar CMA en el tracto gastrointestinal (Brittan et al. 2002; Modlin et al. 2003), el cerebro (Doetsch 2003), los ojos (Sun et al. 2004), la piel (Tumbar et al. 2004), las mamas (Clayton et al. 2004), el páncreas (Seaberg et al. 2004), el corazón (Leri et al. 2005), el hígado (Guettier 2005), los pulmones (Griffiths et al. 2005), los ovarios y los testículos (von Schalburg et al. 2006), la próstata (Burger et al. 2005) y la médula ósea (Wilson et al. 2006).

Este último tipo resulta de especial interés. Recientemente se ha descubierto que es capaz de originar, bajo determinadas condiciones, células con características diferentes a los de su tejido de origen, lo que es conocido con el término de plasticidad (Wagers *et al.* 2004). Esta característica ha abierto muchas ramas de estudio en el

campo de la medicina regenerativa. Dado que estas células han sido las elegidas para la realización de la presente Tesis doctoral, las describiremos más detalladamente en la sección 2.2 de la introducción.

1.2.4 Células Madre Pluripotentes inducidas

Las iPSC son un tipo de CM pluripotente artificialmente derivada de una célula somática terminalmente diferenciada y no pluripotente. Las primeras iPSC fueron generadas en 2006 por el equipo del Doctor Shinya Yamanaka (Takahashi *et al.* 2006). Para ello, usó genes que habían sido identificados como importantes en el mantenimiento de la pluripotencialidad de las ESC y forzó su expresión en fibroblastos murinos mediante vectores virales. Estos genes eran Oct-3/4, SOX 2, c-Myc y Klf4. Sin embargo estas células no fueron capaces de formar quimeras cuando eran trasplantadas en embriones en desarrollo y presentaron errores en la metilación del ADN. Posteriormente, en 2007 otros grupos fueron capaces de generar iPSC estables (Wernig *et al.* 2007) al sustituir Nanog por Fbx15 durante la reprogramación.

Gracias a la obtención de cualquier tipo celular a partir de iPSCs de cualquier individuo adulto o paciente se facilita enormemente su uso en medicina regenerativa, ya que este tipo celular carece de objeciones éticas en cuanto a su obtención y manipulación y a la vez elimina el problema del rechazo inmunológico. A la vez ha abierto un nuevo campo en su uso para la terapia génica, ya que permite corregir los fallos genéticos del individuo y su posterior trasplante sin problemas de rechazo inmunológico. Además, permite la generación de modelos celulares de enfermedades de las que hasta ahora no se disponían, con los que estudiar su fisiopatología y realizar cribados a gran escala de nuevos fármacos con potencial terapéutico.

2 Las células madre de la médula ósea

La médula ósea (MO) es un tipo de tejido que se encuentra en el interior de los grandes huesos, sobre todo de los centrales del cuerpo como cráneo, vértebras, costillas, esternón, cintura escapular y pelvis. La función principal de la médula ósea es promover la formación de las células sanguíneas, lo que se conoce como hematopoyesis. La presencia de células madre hematopoyéticas (CMH) en la MO se conoce desde hace más de 40 años (Till *et al.* 1961; Becker *et al.* 1963). Posteriormente se describió las células estromales de la médula ósea constituidas por una mezcla de células precursoras de hueso, cartílago, tejido adiposo, conectivo fibroso y la red reticular que soporta la formación de células sanguíneas (Friedenstein *et al.* 1966; Friedenstein *et al.* 1970; Owen 1988). Más recientemente se definió las células madre mesenquimales (CMM) como un grupo más homogéneo de células

aisladas de las células estromales y que presentan en su superficie marcadores específicos de CM. (Pittenger *et al.* 1999). En ocasiones se hace referencia a ellas como “células estromales” pero hay que subrayar que ambos términos no son equivalentes y que hacen referencia a dos entidades reconocidas cada vez más como diferentes. Dado que para la realización de este trabajo no hemos realizado una purificación tras la extracción de la MO, nos referiremos a estas células como “células madre derivadas de la médula ósea” (CMO).

En la actualidad se han descubierto dos tipos más de células circulantes en la sangre que presentan características de CM, pero que no se ha podido demostrar que sean generadas en la médula ósea. Una de ellas son los pericitos, que deben estar próximos en su origen a las células mesenquimales de la médula ósea, pero sin embargo su origen continua siendo desconocido (Bianco *et al.* 2001). Se sabe que los pericitos juegan un papel importante en la formación y mantenimiento del endotelio (Lindahl *et al.* 1997; Hellstrom *et al.* 1999; Rajantie *et al.* 2004; Kokovay *et al.* 2006) , sin embargo no comparten con ellos los mismos precursores mieloides (Bailey *et al.* 2004; Bailey *et al.* 2006).

2.1 Las células madre hematopoyéticas

Las CMH generan los diferentes linajes celulares que constituyen la sangre, los cuales son las responsables de la respuesta inmune y de la homeostasis tisular tras una lesión. Las células sanguíneas presentan una vida media muy corta, lo cual indica que deben tener precursores con una gran capacidad de autorrenovación. A principio de los años 60 se comenzó a estudiar la médula ósea para descubrir qué componentes eran responsables de esta regeneración sanguínea (Till *et al.* 1961). Se definió dos características importantes de las CMH: capacidad de regenerarse a sí mismas y de generar progenitores más diferenciados que dan lugar a los diferentes tipos celulares presentes en la sangre. De estos estudios también se dedujo que hay dos tipos de CMH, uno capaz de regenerar completamente el sistema hematopoyético y a ellas mismas durante años, consideradas como CM de largo plazo, y otro capaz de regenerar las diferentes poblaciones sanguíneas, pero incapaces de regenerarse a ellas mismas, por lo que se les conoce como progenitoras a corto plazo. Estudios posteriores describieron que los progenitores a corto plazo eran capaces de regenerar la hematopoyesis durante un periodo de solo tres a cuatro meses (Zhong *et al.* 1996), lo que deja a las CM de largo plazo como las verdaderas CMH.

La identificación de las CMH es compleja. Pese a que las CMH son las CM más entendidas del organismo, debido principalmente a su fácil accesibilidad, a la

disponibilidad de modelos de ratón que incluyen un amplio rango de marcadores de superficie y a su extensa utilización en aplicaciones clínicas, su selección y completa identificación es todavía objeto de debate, y aún hoy no se ha conseguido caracterizar un marcador único que permita identificar con seguridad este tipo de célula (Orlic et al. 1994; Togel et al. 2007). En la actualidad se identifican gracias a trabajos previos de Irving Weissman (1988) y sus colaboradores que identificaron una serie de marcadores de superficie en sangre de ratón que permiten aumentar la probabilidad de aislar CMH (Spangrude et al. 1988). Cuatro años más tarde presentaron otra serie de marcadores para humano (Baum et al. 1992). Pero estos marcadores seleccionan un grupo heterogéneo de células donde encontramos CMH, progenitores a corto plazo, y también células diferenciadas. Weissman también demostró que una única célula era capaz de producir células de todos los linajes durante al menos siete semanas, y treinta células purificadas eran suficientes para rescatar al ratón irradiado y repoblar completamente la médula ósea del ratón receptor, sin necesitar la ayuda de otra dosis de células (Smith et al. 1991).

2.2 Las células madre mesenquimales

Las CMM son una reducida población de células estromales no hematopoyéticas. Gracias a los trabajos de Friedenstein en los años 70 se descubrió que tras poner las células de médula ósea en cultivo podíamos diferenciar la porción no adherente (células hematopoyéticas) de una porción que era capaz de adherirse a la superficie de cultivo. Estas últimas eran capaces en cultivo de formar colonias a partir de una única célula (Friedenstein et al. 1970). Tras mantener estos cultivos unos días, observó que las colonias heterogéneas comenzaban a proliferar y diferenciarse en células maduras de linajes mesenquimales como los osteoblastos (Friedenstein et al. 1970; Friedenstein 1976). Posteriormente se caracterizaron estas colonias y se comprobó que sus células eran multipotentes y se diferenciaban en osteoblastos, condrocitos, adipocitos e incluso en mioblastos (Castro-Malaspina et al. 1980; Prockop 1997; Caplan et al. 2001). La denominación de estas células como CMM fue propuesta por Caplan (Caplan 1991). Sin embargo, esta definición solo se basa en estudios *in vitro*, y se sabe que debido a esta manipulación sus marcadores y morfología cambia (Jones et al. 2002). En 2006, la Sociedad Internacional para la Terapia Celular propuso el siguiente criterio para la mínima identificación de CMM humanas: se deben adherir al plástico en condiciones estándares de cultivo, deben ser positivas para los marcadores CD73, CD90, CD105 y negativas para CD34, CD45, HLA-DR, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 tras su análisis con citometría de flujo, e *in vitro* han de ser capaces de diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condroblastos (demostrado

mediante tinción).

Además de la MO, podemos aislarlas de diferentes tejidos, como son la gelatina de Wharton (Sarugaser et al. 2005), el tejido adiposo (Zuk et al. 2002), el fluido amniótico (In 't Anker et al. 2003), el hueso compacto (Guo et al. 2006) y el líquido sinovial (Jones et al. 2004) entre otros. Estas células son capaces de diferenciarse *in vitro* en los tres linajes mesodérmicos como son el hueso, cartílago y grasa. Pero bajo condiciones apropiadas las CMM también pueden diferenciarse en otros linajes mesodérmicos como miocitos esqueléticos y tenocitos (Wakitani et al. 1995; De Bari et al. 2003; Hoffmann et al. 2006). También podemos encontrar trabajos donde se diferencian en linajes no mesenquimales como las neuronas (Woodbury et al. 2000), sin embargo esto último ha sido cuestionado ya que las neuronas no fueron capaces de generar potenciales de acción (Hofstetter et al. 2002).

A continuación profundizaremos más en la capacidad de generar nuevas células propias de otros tejidos por parte de las CMO y los mecanismos que usan para llevarlo a cabo.

2.3 Plasticidad y mecanismos de acción de las CMO

La plasticidad celular se define como la capacidad de originar una célula de un linaje diferente al de su origen. Gracias a múltiples estudios sabemos que las CMO presentan esta característica, ya que es conocido que generan células propias de otros órganos como el corazón, pulmones, músculo, cerebro, riñones, intestino, retina, hígado, bazo y la piel (Grove et al. 2004) (Figura 1).

En la mayoría de estos trabajos se siguió una metodología similar, que consiste en un trasplante mediante una inyección intravenosa o intraperitoneal con células de la médula ósea en un animal que ha sido sometido a una irradiación letal previa al trasplante. Mediante esta irradiación se eliminan las CM de la médula ósea propias del receptor, de forma que si el animal no recibe un trasplante fallece. Para la identificación de las células del donante se usan varios métodos: estas células pueden ir marcadas mediante un transgén reportero como la proteína verde fluorescente (GFP, del inglés *Green Fluorescent Protein*) o la enzima β -galactosidasa. También es posible usar la diferencia de sexo entre las células del donante y receptor o la diferencia en el haplotipo.

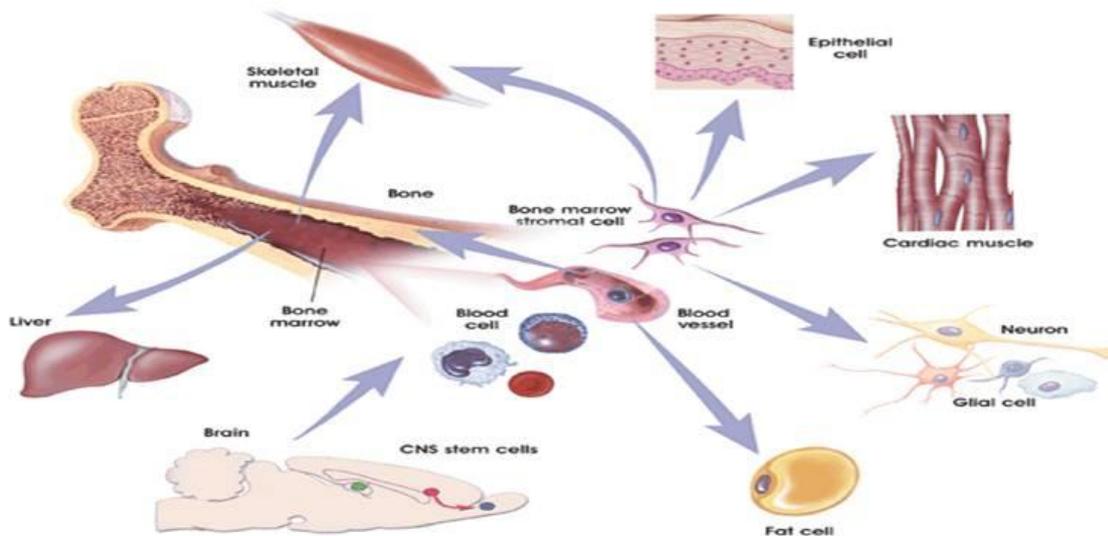


Figura 1.- Evidencia preliminar de la plasticidad de células madre adultas no humanas. (© 2001 Terese Winslow, Lydia Kibiuk, Caitlin Duckwall)

Hay que señalar que en la mayoría de estos trabajos se realizaron trasplantes de médula ósea en los que no se manipuló ni seleccionó las células trasplantadas, por lo que no podemos concluir si son las CMH o las CMM las que presentan esta particularidad. Tampoco se ha podido identificar en todos los casos que describiremos si son las CM o las derivadas de estas las que están implicadas en este proceso, por lo cual a partir de ahora nos referiremos a ellas como células derivadas de la médula ósea (CMO). A continuación, explicaremos con más detenimiento la capacidad de estas células para integrarse en algunos de los tejidos previamente mencionados: el músculo esquelético, corazón, hígado y el sistema nervioso central.

Musculo esquelético: en principio, la regeneración del músculo esquelético es producido por un tipo específico de CM del músculo denominado células satélite (Campion 1984). Sin embargo, se reportó la formación de células esqueléticas por parte de las CMO tras producirse una lesión o en modelos de enfermedades degenerativas.

La primera evidencia se obtuvo en 1998 tras un trasplante de CMO marcadas con la enzima β -galactosidasa bajo un promotor específico de células musculares (Ferrari et al. 1998). Se realizaron diversos trasplantes usando CMO sin fraccionar o bien la porción adherente o la no adherente tras su cultivo *in vitro* en un animal lesionado químicamente. Tras unas semanas se identificaron células positivas para el marcador en los músculos de animales trasplantados con CMO sin fraccionar, sugiriendo que tanto las fibras maduras como inmaduras se desarrollan a partir de CMH del donante.

En el caso de enfermedades degenerativas se han realizado numerosos estudios en modelos animales de distrofia muscular de Duchenne (Bittner et al. 1999; Gussoni et al. 1999; Ferrari et al. 2001). Estos ratones expresan la proteína distrofia no funcional, lo que genera la fibrosis y distrofia. Se observó que diez semanas tras un trasplante con CMO se encuentran células del donante sano que presentan marcadores específicos de músculo y algunas de ellas expresan distrofina (Bittner et al. 1999). En un estudio posterior se comprobó que esta mejora era producida por una repoblación por parte de la CMO de las CM del músculo, las células satélite (LaBarge et al. 2002). Aunque no se sabe que subpoblación de las CMO está implicada en la habilidad de desarrollar músculo, los datos parecen indicar que una población enriquecida en CMH es la responsable (Gussoni et al. 1999).

Músculo cardíaco: Las CMO pueden formar miocitos tanto in vitro (Makino et al. 1999) como in vivo (Tomita et al. 1999), lo que sugiere que pueden ser usadas como terapia celular en desordenes cardiacos como el infarto de miocardio (Orlic et al. 2001), la isquemia crónica (Fuchs et al. 2003; Perin et al. 2003) y rechazo del trasplante cardiaco (Petersen et al. 1999). En el caso del infarto de miocardio se ha comprobado que tras implantar progenitores hematopoyéticos positivos para el marcador c-Kit+ derivados de CMO en la zona no lesionada adyacente al infarto, éstas son capaces de migrar y regenerar miocitos y estructuras vasculares. Aunque la recuperación es parcial, los miocitos formados parecen ser capaces de restaurar las conexiones eléctricas (Orlic et al. 2001).

En trabajos realizados con células estromales se ha observado que se integran en el tejido dañado y expresan troponina 1 y la cadena pesada de la miosina, a la vez que producen una mejora en la función cardiaca (Tomita et al. 1999). En estudios similares observaron que los miocitos derivados de las CMO eran capaces de expresar proteínas contráctiles y conexina 43 (Wang et al. 2000). Estas proteínas de unión gap se observaban entre los nuevos miocitos formados y los del huésped, sugiriendo su integración en la red de miocitos, lo cual es un requisito necesario para su activación electrofisiológica (Wang et al. 2000).

En los pacientes con enfermedades cardiacas crónicas se ha visto que la inyección directa de CMO mononucleares en la zona adyacente a la lesión produce una mejora en la contracción y la perfusión cardiaca (Perin et al. 2003). Todos estos trabajos demuestran la llegada de CMO al corazón, aunque la frecuencia de este proceso es muy baja (Vieyra et al. 2005). Este bajo aporte de células al tejido hace pensar que no sea la principal causa de la mejora en la función cardiaca y que, más bien, existen efectos paracrinicos mediados por la secreción de factores por parte de las

CMO, que favorecen la recuperación del órgano. No obstante muchos de los avances científicos en el campo de la regeneración cardíaca, tanto en humanos como en animales, se están llevando a cabo mediante el uso de CMO (Liao et al. 2007).

Hígado: se han realizado múltiples estudios de enfermedad hepática en la que tras el trasplante de médula ósea se han encontrado hepatocitos que presentaban el marcaje específico de las células del donante (Lagasse et al. 2000; Kanazawa et al. 2003; Vassilopoulos et al. 2003; Wang et al. 2003). En uno de los primeros estudios en ratones con lesión hepática a los que se les realizó un trasplante de CMO se observó un porcentaje de hepatocitos derivados de las células trasplantadas que oscilaba entre un 0.7% y un 2.2%. También se observaron células ovas procedentes del donante, las cuales actúan como CM o progenitores residentes en el hígado (Petersen et al. 1999). Lagasse demostró en el 2000 que trasplantando CMH se revertía la patología y recuperaba la capacidad metabólica del hígado en un modelo murino de tirosinemia tipo I.

Por último, en humanos que recibieron un trasplante de médula ósea de un donante de sexo diferente al suyo, se encontraron hepatocitos y colangiocitos con cromosomas del donante, sugiriendo que las células derivadas de la médula ósea del donante se integran como células ovas (Alison et al. 2000; Theise et al. 2000). También se observó que al realizar un xenotrasplante de médula ósea de humano sobre un ratón, en el cual la médula ósea estaba enriquecida en CMH (usan los marcadores $\text{Lin}^- \text{CD38}^- \text{CD34}^+ \text{ClqRp}^+$), estas células se integraron como hepatocitos (Danet et al. 2002).

El sistema nervioso central: los estudios *in vitro* muestran que las células mesenquimales de la médula ósea de ratón y humanas son capaces de expresar marcadores específicos de los diferentes fenotipos neurales: astrocitos, oligodendrocitos y neuronas (Sanchez-Ramos et al. 2000; Deng et al. 2001; Jiang et al. 2002). Además muestran que al introducir CMM estimuladas con citoquinas en blastocistos tempranos contribuyen a la formación de astrocitos y neuronas en la corteza, hipocampo, tálamo y cerebelo, así como diversos tipos celulares de origen mesodérmico y endodérmico (Jiang et al. 2002). También podemos encontrar trabajos con poblaciones de CMH o enriquecidas con progenitores hematopoyéticos que pueden mostrar marcadores neuronales (Hao et al. 2003).

En estudios *in vivo* se encontró que un paciente que había recibido un trasplante de CMO de niño presentaba, un año después, células de tipo neuronal derivadas del donante. Para comprobar qué subpoblación de la médula ósea genera estas células neurales se realizaron múltiples trabajos en los que células positivas

para c-kit (marcador típico de CMH) se trasplantaban en el cerebro de ratones neonatos. Tras una semana se encontraron células positivas para el marcador de oligodendrocitos (O4) en la capa ependimaria y células positivas para el marcador neuronal β -tubulina III en la zona subventricular, estriado y corteza (Bonilla et al. 2002). Sin embargo las células negativas para c-kit trasplantadas no produjeron fenotipos neurales. En otros estudios, tanto con CMM como con progenitores hematopoyéticos, también se observó la presencia de neuronas de Purkinje positivas para el marcaje (expresión de GFP mediante infección viral previa al trasplante) (Priller et al. 2001; Wagers et al. 2002). Gracias a estudios posteriores sabemos que estas neuronas de Purkinje se forman por la fusión de una célula derivada de médula ósea con una Purkinje madura, de forma que el núcleo de la CMO se reprograma para expresar genes específicos de la neurona de Purkinje (Alvarez-Dolado et al. 2003; Weimann et al. 2003). Abordaremos con detalle este proceso de fusión más adelante.

La incorporación de CMO al cerebro también se produce bajo condiciones patológicas. Cuando se inyectan CMM intravenosamente, así como en el estriado y la corteza, tras un ictus producido por la ligación de la arteria cerebral media, podemos observar como las células del donante migran a la zona de la lesión y expresan marcadores neuronales y de astrocitos (Li et al. 2000; Mahmood et al. 2001). Los ratones trasplantados muestran una mejora neurológica y motora, aunque no se aprecia una mejora en la citoestructura del tejido. Esto también ocurre cuando se trasplantan células humanas (Zhao et al. 2002).

También se ha visto que las células trasplantadas previamente a la oclusión pueden migrar al cerebro y participar activamente en la renovación del tejido. En los primeros días tras la oclusión aparecen células derivadas de la médula ósea positivas para marcadores endoteliales como VonWillebrand, CD31 y lectina IB4, sugiriendo que esta mejora tisular se produce mediante su contribución en la formación de la nueva vasculatura (Hess et al. 2002).

Como demuestran una gran cantidad de estudios, las CMO han resultado ser más plásticas de lo que se había imaginado. Y pese a que no se conoce exactamente qué células están implicadas, ya ha quedado claro su alto potencial terapéutico. Todo esto ha abierto un amplio campo de estudio, no solo en la caracterización de las células implicadas en la mejora, sino en los mecanismos por los cuales se produce y como controlar el destino de estas células. En la actualidad se han propuesto dos mecanismos de acción para explicar esta plasticidad celular: transdiferenciación y fusión celular.

2.3.1 Transdiferenciación celular

En la actualidad la transdiferenciación se describe como la conversión de una célula de un linaje tisular en otra célula de un linaje completamente distinto, con la consecuente pérdida de marcadores específicos de tejido y funciones de la célula original y ganancia de marcadores y funciones del nuevo tipo celular transdiferenciado (Wagers et al. 2004).

Como ya hemos explicado con anterioridad las CMO son capaces de diferenciarse *in vitro* en células de las tres capas germinales (Jiang et al. 2002), pero su mayor plasticidad se ha demostrado en estudios *in vivo*. Algunos de estos postulan la integración celular mediante transdiferenciación celular, como es el caso Okamoto en 2002, que observó que tras trasplantar células de médula ósea de donantes hombre en cuatro mujeres pacientes de cáncer se encontraban células epiteliales procedentes del donante en el tracto intestinal de todas ellas, incluido el esófago, estómago, intestino delgado y colon (Okamoto et al. 2002). El estudio cariotípico de los cromosomas demostró que estas células no provenían de una fusión celular. Otros ejemplos de posible transdiferenciación los hemos descrito en los apartados anteriores. En general, se piensa que estos casos de transdiferenciación se deben a que cuando las CMO penetran en un tejido diana diferente del suyo responden ante factores específicos del tejido o a señales de daño tisular, de forma que el nuevo microambiente permitiría y/o impulsaría la transdiferenciación hacia otros tipos celulares específicos de ese tejido. Sin embargo, estudios recientes demuestran que también existen otros mecanismos implicados en esta plasticidad celular de las CMO.

2.3.2 Fusión celular

La fusión celular es un mecanismo natural en nuestras vidas, de hecho ésta comienza con la fusión de un óvulo y un espermatozoide. Durante el desarrollo, la fusión celular está implicada en la formación de órganos, infecciones víricas y respuesta inmune (Potgens et al. 2002; Vignery 2008). Sin embargo, el descubrimiento de que las CMO eran capaces de fusionar con una gran variedad de células como mecanismo de reparación tisular y recuperación genética (Alvarez-Dolado 2007) le dio un concepto más dinámico a la fusión celular.

Esta hipótesis alternativa para la plasticidad celular de las CMO postula que las CMO fusionan con un precursor local o una célula madura transfiriéndole el material genético y mezclando sus citoplasmas. El programa genético de este nuevo heterocarion formado sería modificado, y por lo tanto daría lugar a la adquisición de un nuevo fenotipo, y la rotura de la restricción del linaje (Alvarez-Dolado et al.).

Los primeros estudios sobre fusión celular *in vitro* como una alternativa para la

transdiferenciación fueron publicados por dos grupos independientes, uno de ellos con CM neurales adultas (Ying et al. 2002) y el otro con CMO (Terada et al. 2002). Aunque existían estudios previos en músculo que indirectamente sugerían que la fusión celular contribuye a la reparación del tejido dañado (Ferrari et al. 1998; Gussoni et al. 2002).

El hígado fue el órgano en el que más rápido se demostró la fusión celular (Wagers et al. 2002; Wang et al. 2003), ya que tras un trasplante de CMO se observaron hepatocitos que presentaban marcadores del donante, y tras un análisis citogenético posterior se demostró que presentaban un cariotipo que indicaba fusión celular entre las células del donante y del receptor. Siguiendo estos estudios otro grupo estudió biopsias de cerebros de mujeres que habían recibido un trasplante de CMO de hombre, encontrando neuronas de Purkinje poliploides (XXXY), lo que sugería que las neuronas de Purkinje habían fusionado con células hematopoyéticas de la médula ósea del donante (Weimann et al. 2003).

Pero pese a estos descubrimientos, la comunidad científica era cauta respecto a la fusión celular. Parte de estos resultados en hígado se habían obtenido en modelos de lesión, lo que podía influir en estos resultados. Además, el uso de virus en algunos de estos estudios podría tener un efecto a la hora de inducir la fusión. Estudios posteriores, usando la tecnología cre-lox (Véase sección 6.1 de Materiales y Métodos), permitieron clarificar estos datos (Alvarez-Dolado et al. 2003), ya que se confirmó la fusión celular entre hepatocitos, cardiomiocitos y neuronas de Purkinje con células de linaje hematopoyético. Estos resultados fueron corroborados, al encontrar que las neuronas de Purkinje formaban heterocariones estables y que el núcleo de la CMO comenzaba a expresar genes específicos de la neurona de Purkinje (Weimann et al. 2003). En el caso de los cardiomiocitos también se observó que se generaban por fusión tras un infarto, aunque con una baja frecuencia (Nygren et al. 2004).

En el siguiente apartado de la introducción profundizaremos en los eventos de fusión celular como mecanismo regenerativo. Aunque hay que destacar, que aparte de por transdiferenciación o por fusión celular, hay otros mecanismos que intervienen en la mejora tisular tras una lesión, como son la secreción de diversos factores tróficos, quimioquinas y citoquinas que estimulan la regeneración inhibiendo la apoptosis, suprimiendo reacciones inmunes y aumentando la angiogénesis, o incrementando la proliferación de CM endógenas del propio tejido. No profundizaremos en estos mecanismos, de gran importancia, al no ser nuestro tema principal de trabajo en la presente tesis, pero para una mayor información se pueden consultar las siguientes revisiones (Wan et al.; Dawn et al. 2005).

2.3.2.1 Fusión celular como mecanismo regenerativo

2.3.2.1.1 Implicaciones biológicas

Como hemos comentado con anterioridad, el comienzo de la vida viene mediado por un mecanismo de fusión entre un óvulo y un espermatozoide, mostrándonos que la fusión celular es un mecanismo natural en nuestras vidas. Otros eventos de fusión ocurren durante el desarrollo embrionario y en el adulto, como la formación de las fibras musculares esqueléticas multinucleadas a partir de miocitos o bien la de osteoclastos a partir de células de linaje monocito/macrófago (Anderson 2000; Vignery 2000).

También se sabe que la fusión celular media en los procesos de infección viral para la formación del sincitio celular infectado, como en el caso de los linfocitos T infectados por el VIH-1 (McCune et al. 1988; Anderson 2000). De hecho, la demostración de la aparición de células multinucleadas en pacientes de neumonía por el virus Sendai llevó a la producción del primer estudio *in vitro* de fusión celular para el estudio de la regulación de genes específicos de tejidos neoplásicos y normales (Harris 1965; Harris et al. 1965) y proporcionó la idea de usar técnicas de fusión celular para formar hibridomas que produzcan anticuerpos monoclonales (Kohler et al. 1975).

Se postula que el aporte del nuevo material genético tras el evento de fusión puede recuperar a la célula dañada con la que se fusiona o suplir deficiencias genéticas. Esto ha sido demostrado en el caso del hígado, donde varios grupos han podido suplir la deficiencia por la mutación recesiva del gen de la fumariloacetato hidroxilasa (FAH) mediante la fusión generada en los hepatocitos del huésped tras el trasplante de CMH de un donante sano (Wagers et al. 2002; Wang et al. 2003). O en la pérdida de neuronas de Purkinje asociada a la enfermedad de Niemann Pick, causada por una deficiencia en el enzima esfingomielinasa, donde se han observado mejoras motoras y una menor pérdida de neuronas de Purkinje gracias a la fusión celular tras el trasplante intracerebral de CMM (Jin et al. 2003; Bae et al. 2005).

En las siguientes secciones desarrollaremos el papel de los eventos de fusión derivados de las CMO bajo condiciones patológicas y su potencial terapéutico reparador en diferentes tejidos. No obstante, no hay que olvidar los posibles riesgos (Duelli et al. 2003; Alvarez-Dolado 2007; Duelli et al. 2007; Lu et al. 2009). Un elemento preocupante sería la poliploidía resultante (Storchova et al. 2008). Sin embargo, destacar que es necesario una mutación en p53 o una aberrante aneuploidia después de la proliferación para generar una célula maligna (Fujiwara et al. 2005; Lu et al. 2009). Por otro lado, puede ocurrir una mitosis reductiva o las reducciones

poliploides, estabilizando de esta forma las células fusionadas resultantes (Martin et al. 1970; Duncan et al. 2009). A pesar de que la fusión celular no es un generador de cáncer directo, su papel en la progresión tumoral ha sido ampliamente documentado (Duelli et al. 2003; Duelli et al. 2007). La fusión celular también ha sido relacionada con la transferencia viral, ya que durante los xenotrasplantes se puede transmitir virus a los humanos lo que podría explicar la generación de nuevos agentes patógenos virales por recombinación de su ADN (Ogle et al. 2005). También hay un fuerte vínculo entre los virus y el cáncer a través de la fusión celular (Duelli et al. 2003; Duelli et al. 2007). Todo esto requeriría de la implantación de medidas de seguridad para la aplicación de células fusogénicas como terapia en humanos.

2.3.2.1.2 Regeneración por fusión mediada por las CMO

El hecho de que las células de médula ósea sean un tipo celular de sencilla obtención y que sean capaces de diferenciarse o fusionarse con diversos tipos celulares del organismo, ha hecho que sean ampliamente estudiadas en el ámbito de la medicina regenerativa. De hecho, la mayoría de los hospitales tienen una gran experiencia en su obtención, manipulación y trasplante, y ello, añadido a que gracias a su transporte por el torrente sanguíneo son capaces de llegar a todos los tejidos del organismo, les ha conferido un elevado potencial terapéutico.

A continuación detallaremos el papel de las CMO en diversos tejidos en los que se ha demostrado que median eventos de fusión y el beneficio terapéutico que se ha observado en los diferentes modelos de patologías. Indicar que también se han encontrado eventos de fusión en modelos o tejidos del tracto intestinal, el pulmón, los riñones y la piel, pero debido a que no serán empleados en el desarrollo de nuestro trabajo no vamos a detallarlos. Para una revisión leer (Alvarez-Dolado 2007).

2.3.2.1.2.1 En el hígado

La fusión celular como mecanismo regenerativo en el hígado está ampliamente aceptada y documentada (Vassilopoulos et al. 2003). En 2003 dos grupos independientes demostraron que tras un trasplante de CMH se podía rescatar la función hepática en un modelo animal letal de lesión en el hígado producida por la mutación recesiva del gen de la hidrolasa fumarylacetoacetato (FAH) (Vassilopoulos et al. 2003; Wang et al. 2003). Esta recuperación metabólica se debió a la expresión del gen no mutado por parte de los hepatocitos fusionados con las células derivadas de médula ósea. Mediante análisis citogenético se confirmó que los cariotipos de estos hepatocitos eran consistentes con eventos de fusión entre las células del donante y del receptor.

Aunque en un inicio el número de eventos de fusión no era muy elevado, la fusión con CMO proporcionaba la copia no mutada del gen, complementando la función recesiva, lo que permitió la supervivencia y posterior proliferación de estos hepatocitos en un ambiente degenerativo. Como consecuencia se produjo un reemplazo de los hepatocitos mutantes que no eran capaces de sobrevivir por los hepatocitos fusionados que si lo eran, observándose un reemplazo de hasta el 50% del hígado del receptor.

Un estudio posterior demostró que estos hepatocitos poliploides producidos por fusión son tetraploides y parecen estables, aunque también se sabe que pueden producirse reducciones en la ploidía para generar células hijas con solo la mitad del contenido cromosómico (Duncan et al. 2009). Esto se demostró analizando la segregación de marcadores como la ss-galactosidasa y el cromosoma Y, ya que alrededor de un 2-5% de los hepatocitos positivos para el enzima no mutado eran negativos para uno o más de los marcadores, como se espera tras la reducción cromosómica. Esto da lugar a la generación de células hijas genéticamente diferentes, con aproximadamente una reducción del 50% en su material cromosómico. La generación de este tipo de células hijas aumenta la diversidad celular en el hígado, sin embargo también aumenta la probabilidad de la oncogénesis.

Previamente se había descubierto que la subpoblación de las CMO responsable de esta fusión se identifica como macrófagos mielo-monocíticos hematopoyéticos (Camargo et al. 2004; Willenbring et al. 2004). También se han realizado estudios para ver la capacidad de las células hematopoyéticas humanas de generar hepatocitos por fusión celular, encontrándose que, tras realizar un trasplante de CMH humanas en un modelo animal de lesión hepática severa, se producía una mejora en el estado del animal y un aumento de tres veces en el número de células que se integraban en el hígado (Kashofer et al. 2006; Zhou et al. 2009). Además se encontraron heterocariones híbridos con contenido genético humano y de ratón.

2.3.2.1.2.2 En el músculo esquelético

Previamente ya hemos comentado trabajos en los que demostraban la formación y regeneración del músculo mediada por CMO. Los primeros estudios que demuestran la implicación de la fusión en esta regeneración se realizaron en el modelo de ratones transgénicos *mdx*, modelo de la distrofia muscular de Duchenne (Gibson et al. 1995). En ellos se realizó un trasplante de fibroblastos dérmicos silvestres y se observó la formación de heterocariones con dos núcleos, uno procedente del donante y otro del ratón mutante. La fusión celular causó la reversión fenotípica y funcional de la disgenesia muscular. Las CMO son capaces de recuperar la expresión de distrofina

y revertir la función muscular mediante su migración y fusión con el músculo esquelético tras un trasplante en un ratón *mdx* (Ferrari et al. 1998; Bittner et al. 1999; Gussoni et al. 1999; Gussoni et al. 2002). Una respuesta similar se encontró en pacientes con distrofia muscular Duchenne que habían recibido un trasplante de MO, en los que trece años después del trasplante se observó la presencia del núcleo del donante en fibras musculares fusionadas.

La fusión celular no solo se produce en el músculo bajo condiciones patológicas derivadas de alteraciones genéticas, también se ha visto cómo la fusión con CMO, bajo condiciones de estrés inducido o lesión mecánica del músculo, ha logrado la regeneración muscular (LaBarge et al. 2002; Doyonnas et al. 2004).

Se ha encontrado que las células de la línea mielocítica (macrófagos y neutrófilos) son las responsables de estos eventos de fusión en el músculo esquelético, y que la infiltración de células inflamatorias es necesaria para su contribución (Camargo et al. 2003; Doyonnas et al. 2004). Esto nos indica que las células mieloides circulantes, en respuesta a una lesión y los procesos inflamatorios consecuentes, migran para regenerar el músculo esquelético y estocásticamente se incorporan a las fibras musculares maduras.

2.3.2.1.2.3 En el músculo cardíaco

Como ya hemos comentado con anterioridad, las células de médula ósea son capaces de originar cardiomiocitos *in vitro* (Makino et al. 1999) e *in vivo* (Bittner et al. 1999). Estos descubrimientos llevaron al estudio de las CMO como mecanismo regenerativo tras un infarto de miocardio (Mathur et al. 2004; Condorelli et al. 2005). Tanto en ratas (Orlic et al. 2001), como humanos (Laflamme et al. 2002; Deb et al. 2003) se encontró la presencia de cardiomiocitos procedentes de las CMH trasplantadas, aunque con una gran variabilidad en los porcentajes de incorporación. Sin embargo, no se realizaron estudios que pudiesen identificar la fusión celular y se postuló que el mecanismo usado por las CMO para generar cardiomiocitos era la diferenciación.

La primera evidencia clara de fusión entre CMH y cardiomiocitos bajo condiciones normales (solo sometidos a irradiación) se demostró en 2003 (Alvarez-Dolado et al. 2003). No se encontró evidencia de diferenciación y el porcentaje de células fusionadas fue muy bajo (< 1%). Posteriormente, se demostró que la fusión celular es el mecanismo mayoritario a la hora de regenerar el músculo cardíaco infartado, mientras que para el músculo liso y el endotelio predomina la diferenciación (Nygren et al. 2004).

También se ha visto que los cardiomiocitos fusionados son capaces de proliferar *in vitro* e *in vivo* (Matsuura et al. 2004), lo que les facilitaría la regeneración del músculo cardíaco. Sin embargo, ni los eventos de fusión celular ni su proliferación nos permiten explicar la mejora de la función cardíaca observada tras un trasplante de CMO. Esto apoya la hipótesis de que, *in vivo* estas células ejercen una acción paracrina, secretando factores de crecimiento y moléculas que tienen un efecto antiapoptótico en los cardiomiocitos (Gnecchi et al. 2008). Además, la presencia de precursores endoteliales en las CMO facilita la angiogénesis en la zona infartada, aumentando así la perfusión cardíaca y la viabilidad (Tanaka et al. 2009).

2.3.2.1.2.4 En el cerebro

En el caso del cerebro, pese a que se han realizado múltiples estudios, solo se ha podido demostrar eventos de fusión celular entre las CMO y las neuronas de Purkinje del cerebelo (Alvarez-Dolado et al. 2003), tanto en ratón como en humanos (Weimann et al. 2003; Weimann et al. 2003). Se ha observado que los heterocariones formados son estables y su número aumenta con la edad o por una lesión, lo que permite postular que las CMO podrían ser un buen mecanismo terapéutico en el caso de patologías que cursen con la degeneración de estas neuronas de Purkinje (Magrassi et al. 2007; Johansson et al. 2008; Espejel et al. 2009), como es el caso de las ataxias.

Se ha observado que, tanto la inyección localizada, como el trasplante intravenoso de CMO, son capaces de producir mejoras en las patologías neurodegenerativas como el Parkinson (Li et al. 2001) o Huntington (Lescaudron et al. 2003), un trauma o una isquemia cerebral (Li et al. 2009). Sin embargo, estas mejoras son debidas seguramente a la secreción de factores tróficos y citoquinas por parte de las CMO, ya que los eventos de fusión o transdiferenciación son escasos (Rosser et al. 2007). Aunque estos eventos se ven aumentados hasta en diez veces en las patologías que cursan con inflamación (Johansson et al. 2008). En este terreno, los estudios realizados en isquemia son los más numerosos. Pese a que se ha encontrado una mejora funcional tras el trasplante de CMO, muy pocas de estas células presentan marcadores neuronales y solo se encuentra ocasionalmente evidencias de fusión celular (Chen et al. 2001), sin embargo se ha visto que las CMO secretan un grupo de factores de crecimiento que mejoran la supervivencia neuronal tras el proceso isquémico (Kurozumi et al. 2005). Así mismo, como hemos comentado con anterioridad, la presencia de precursores endoteliales y células murales en las poblaciones derivadas de la MO trasplantada permite una mejora en la angiogénesis mediante procesos de diferenciación (Chen et al. 2003), lo cual explica parte del

beneficio observado tras un trasplante de CMO. En el caso de las células endoteliales se ha demostrado que no se formaban por fusión celular (Bailey et al. 2004; Bailey et al. 2006). Sin embargo, en el caso de las células murales o pericitos no existen estudios concluyentes.

Las CMO también han sido usadas para el estudio de enfermedades del sistema nervioso que afectan a desordenes metabólicos (Prasad et al. 2010), de forma que las nuevas células migran y se integran (mediante fusión o diferenciación) en el cerebro supliendo el déficit del metabolito. Se ha visto una terapia muy efectiva en el caso del modelo animal de la enfermedad de Niemann-Pick (ENP) (Jin et al. 2003; Bae et al. 2005), el cual padece una degeneración progresiva de las neuronas de Purkinje debido a una deficiencia en el enzima esfingomielinasa acida. CMM se transfectaron con el gen humano de dicho enzima, de forma que lo sobreexpresaban, tras lo que fueron trasplantadas directamente en el cerebro, en donde fusionaron con las neuronas de Purkinje y produjeron una mejora en la función motora cerebelar. Estos animales presentaban un aumento considerable en su número de Purkinjes y transitoriamente unos niveles de actividad enzimática en sus tejidos similar a los normales (Jin et al. 2003). En otro trabajo se demostró que estas Purkinjes fusionadas eran eléctricamente activas y presentaban una formación sináptica funcional (Bae et al. 2007). Todos estos trabajos demuestran que las CMO pueden ser usadas como un vehículo terapéutico efectivo de aporte de material genético nuevo a las neuronas de Purkinje mediante procesos de fusión celular.

Dado que se ha comprobado el papel de las CMO en la recuperación de neuronas de Purkinje o en la angiogénesis, en el presente trabajo nos propusimos estudiar si la fusión celular juega un papel importante en estos procesos. Para ello usamos modelos animales de patologías asociadas a pérdidas de neuronas de Purkinje o la generación y estabilización de nuevos vasos sanguíneos. A continuación vamos a describir las bases de dichas patologías y los datos que indican un posible papel o beneficio de la fusión en ellas.

3 Ataxia y fusión celular

La palabra ataxia es definida, según el glosario de los términos del Laboratorio de Genética Gregorio Marañón, como “un trastorno caracterizado por la disminución de la capacidad de coordinar los movimientos”. La ataxia es un síntoma o signo neurológico que consiste en la pérdida de coordinación de los movimientos musculares, en donde se ven afectadas las partes del sistema nervioso que coordinan el movimiento, como el cerebelo.

Podemos diferenciar tres tipos de ataxias: cerebelar, sensorial y vestibular.

En la cerebelar, como su nombre indica, la disfunción se produce en el cerebelo. Esto causa una variedad de déficits neurológicos tales como la hipotonía antagonista, asinergia, disimetría, discronometría y disdiadococinesia. Dependiendo de las estructuras del cerebelo que han sido dañadas la forma y lugar de expresión de estas anomalías varía y también si la lesión es unilateral o bilateral.

La ataxia sensorial se caracteriza por la pérdida de la propiocepción, la pérdida de la sensibilidad a las posiciones de las partes de articulación y del cuerpo. Generalmente esto es causado por una disfunción de la columna dorsal de la médula espinal, debido a que lleva la información propioceptiva al cerebro. Los pacientes se caracterizan porque pisan fuertemente con el talón al andar, así como por la inestabilidad postural.

La ataxia vestibular viene determinada por una disfunción del sistema vestibular del oído interno, que en casos agudos y unilaterales se asocia con vértigo prominente, náuseas y vómitos.

3.1 Etiología

Los diversos tipos de ataxia mencionados con anterioridad pueden cursar por causas comunes, de forma que pueden aparecer conjuntamente o por separado. Estas causas pueden ser: lesiones focales en el sistema nervioso central, sustancias exógenas, envenenamiento por radiación, neuropatías periféricas, degeneración cerebelar no hereditaria, ataxias hereditarias (como la ataxia de Friederich o la de Niemann Pick), malformación de Arnold-Chiari o la enfermedad de Wilson.

3.2 Modelo de ataxia del ratón PCD

Podemos encontrar diversos modelos animales que presentan ataxia, pero para la realización de este trabajo de Tesis doctoral se ha usado el modelo de ataxia del ratón PCD (del inglés *Purkinje Cell Degeneration*), que presenta diversas neurodegeneraciones postnatales y selectivas en varias regiones encefálicas, entre ellas el cerebelo.

El hecho de que los ratones mutantes pcd presenten un desarrollo neuronal normal en el momento de su nacimiento y que la degeneración neuronal se produzca en unos momentos muy concretos del desarrollo postnatal, hacen de él un buen modelo animal para el estudio de trasplantes de médula ósea y su efecto sobre la ataxia. El modelo animal se describe en detalle en la sección 1.2.3 de materiales y

métodos.

Como hemos comentado con anterioridad, se ha visto que tras un trasplante de CMM la fusión celular juega un papel importante en la recuperación cerebelar en modelos animales de enfermedades neurodegenerativas. También se han observado los efectos paracrinos resultantes de la incorporación de las CMO al tejido, mostrándose mejoras significativas en el comportamiento de los animales trasplantados (Jones et al.; Bae et al. 2007). Esto nos ha llevado a estudiar si las CMO podrían mejorar la sintomatología en nuestro modelo animal y si la fusión celular estaría implicada en la posible recuperación cerebelar.

4 Accidente cerebrovascular y fusión celular

El ictus o accidente cerebrovascular (AC) se define como la pérdida de funciones cerebrales producto de la interrupción del flujo sanguíneo al cerebro (Sims et al.). Se originan una serie de síntomas variables dependiendo del área cerebral afectada. Según su etiología se pueden clasificar como isquémicos o hemorrágicos. El primero se produce por una pérdida de irrigación debido a la interrupción súbita e inmediata del flujo sanguíneo, lo que genera la aparición de una zona infartada. Se debe a la oclusión de alguna de las arterias que irrigan el cerebro por procesos, como una estenosis intra- o extravascular por vasoconstricción, o bien por la formación de un coágulo (aterotrombótico o embólico). Por otra parte, el hemorrágico se produce por una rotura de un vaso sanguíneo de la zona cefálica, ya sea por un pico hipertensivo o por un aneurisma congénito (Zarranz).

4.1 Modelos animales

Como hemos comentado con anterioridad, existen diferentes causas y consecuencias cuando se produce un AC en humanos, por lo que encontramos diferentes tipos de modelos en animales. En ellos podemos encontrar grandes similitudes con los AC en humanos, como el concepto de daño por apoplejía, donde la muerte de células isquémicas o el estrés celular progresa como respuesta al daño isquémico inicial, o el concepto de zona de penumbra, que se define como la región del cerebro adyacente a la zona inicial de lesión y muerte celular, donde la lesión progresa hasta infartarse si no se trata (Carmichael 2005). Sin embargo hay características en las que se aproximan menos a los AC humanos, como por ejemplo el tamaño de la zona infartada. Los AC humanos presentan un tamaño menor que el que relativamente encontramos en los modelos animales. Esto también hace que el AC de los modelos animales afecten a varios circuitos neuronales alterando así

múltiples funciones, mientras que en los humanos este daño es mucho más específico. Otra diferencia es que en los humanos se produce reperusión, ya sea por la lisis natural o médica del coágulo o bien por la colateralización a través del círculo de Willis y la leptomenígea colateral que aporta sangre al perímetro de la zona infartada, mientras que no todos los modelos animales repiten este proceso.

A continuación vamos a mencionar los modelos de roedores más comunes:

- Oclusión de la arteria cerebral media (OACM): esta técnica consiste en la oclusión de la arteria cerebral media (ACM) mediante la introducción de un monofilamento (Schmid-Elsaesser et al. 1998).

- Oclusión embólica de la ACM: podemos encontrar dos modelos diferentes, mediante la inyección de microesferas o por embolización de coágulos trombóticos. Estos modelos producen infartos de tamaño y localización variable, lo que dificulta el análisis de los tratamientos (Beech et al. 2001).

- Fototrombosis: este modelo usa la fotooxidación intravascular local para generar lesiones isquémicas corticales muy definidas mediante la ruptura de microvasos (Schroeter et al. 2002).

- Isquemia cerebral unilateral por hipoxia: en este modelo se ocluye la carótida común del animal y se le somete a hipoxia (Vannucci et al. 2001). Dependiendo del tiempo de hipoxia podemos variar el tamaño de la lesión y subsecuentemente las zonas lesionadas. Nosotros elegimos este modelo debido a que tras la hipoxia la oclusión es retirada, produciéndose así la reperusión al igual que ocurre en humanos tras el tratamiento.

4.2 Estrategias terapéuticas

En la actualidad, aunque hay abiertos diversos campos de investigación, existen pocos tratamientos. Una de las opciones es tratar al paciente con una terapia trombolítica mediante inhibidores del activador del plasminógeno tisular, pero este tratamiento debe ser administrado dentro de las tres primeras horas de la isquemia, lo que dificulta su administración. También existen mecanismos quirúrgicos para el tratamiento de la isquemia. Si la isquemia es producida por un trombo, se puede proceder a la eliminación del mismo, mientras que si es debido a la estenosis de la arteria, se puede proceder a una angioplastia y la colocación de un tubo de malla metálica que permita la circulación sanguínea.

Para evitar las isquemias recurrentes, se puede tratar a los pacientes de manera preventiva administrándoles anticoagulantes. En las últimas décadas la terapia

con células madre ha sido introducida como un tratamiento experimental para los accidentes cerebrovasculares. Los vemos en detalles en la siguiente sección.

4.2.1 Terapias con células derivadas de la MO

Diversos estudios han reportado mejoras funcionales significativas tras un trasplante de CMO tras un proceso isquémico (Tang et al. 2007). Se sabe que las CMMO son capaces de secretar citoquinas y factores de crecimiento que promueven la angiogénesis y la regeneración neuronal (Chen et al. 2006). Varios estudios han demostrado la contribución de CMMO o CMH a la formación de nuevos vasos tras el proceso isquémico, incluyendo la formación de células endoteliales (Bailey et al. 2006) y células murales (Rajantie et al. 2004; Kokovay et al. 2006). Recientemente ha sido publicado que el trasplante intracraneal de CMO y el tratamiento farmacológico con ácido lipoico estimula la proliferación y diferenciación de células nuevas a través de células de la astrogλία, microglía y endoteliales tras una lesión cerebral (Paradells et al. 2014).

Algunos de dichos estudios han demostrado definitivamente que las células endoteliales son generadas por transdiferenciación y no por fusión celular (Bailey et al. 2006). Sin embargo, el mecanismo por el cual las células murales son generadas permanece desconocido.

Algunos estudios recientes han demostrado una mejora en el comportamiento animal tras el infarto cerebral gracias a la reducción en la desmielinización de los axones y una disminución del área infartada tras el trasplante de CMM humanas 24 horas tras producirse la lesión (Xu et al. 2014). En humanos estas células ya están siendo aplicadas en múltiples ensayos clínicos (Huo et al. 2014), algunos de ellos con buenos resultados preliminares en la mejora del comportamiento (Sharma et al. 2014), siendo estas mejoras más notorias en los pacientes más jóvenes y en aquellos casos de infarto isquémico frente a los de isquemia hemorrágica.

5 Fusión celular y sistema hematopoyético

Es bien conocido que dentro del sistema hematopoyético existen células capaces de fusionarse entre ellas. Los macrófagos, que están presentes en todos los tejidos, pueden fusionarse, bajo determinadas circunstancias, con otros macrófagos para diferenciarse en osteoclastos multinucleados en el hueso, o a células gigantes en múltiples tejidos en respuesta a infecciones. Los osteoclastos desempeñan un papel central en la osteoporosis y la multinucleación es un paso esencial en su diferenciación, ya que como macrófagos mononucleados no pueden reabsorber hueso de manera eficiente. La fusión monocítica también puede ser esencial en la

diferenciación de las células gigantes que se forman en los tejidos en respuesta a las partículas extrañas y en las enfermedades inflamatorias crónicas. Por último, como ya hemos mencionado, los macrófagos también pueden fusionarse con las células somáticas en diferentes órganos para promover la reparación de tejidos (Vignery 2005).

Sin embargo, pese a estas evidencias, y pese a que las CMO forman parte del sistema hematopoyético, apenas existen estudios rigurosos sobre la posible presencia de eventos de fusión dentro de este propio sistema. Solo se han realizado un par de trabajos en los que se sugería la posible presencia de células fusionadas en el torrente sanguíneo. En un primer trabajo, tras realizar trasplantes de células humanas en ratones, se atribuye la presencia de células dobles positivas para marcadores, tanto humanos como murinos, a procesos de trogocitosis (transferencia de antígenos de superficie por intercambio de vesículas y/o membranas) y no por eventos de fusión (Yamanaka et al. 2009). Por otra parte, en otro trabajo en donde se generaron quimeras con un donante de diferente alotipo (Skinner et al. 2015), se demuestra la presencia de células positivas para ambos haplotipos. Los autores sugieren que estas células son el resultado de fusiones como una forma de incrementar la variación somática dentro del sistema hematopoyético. Sin embargo, el sistema experimental utilizado no puede descartar eventos de trogocitosis que también los expliquen. Por último, también se ha demostrado que células de procesos leucémicos agudos fusionan con macrófagos, permitiendo el intercambio génico y la transmisión del cáncer (Martin-Padura et al.)

Lo hasta ahora expuesto sugiere fuertemente la presencia de eventos de fusión dentro del propio sistema hematopoyético. Por ello, en el presente trabajo, decidimos desarrollar un sistema experimental de trasplantes que nos proporcionara una respuesta inequívoca sobre si existe o no fusión intra-hematopoyética. El sistema consiste en la generación de quimeras dobles mediante trasplante de CMO procedentes de dos donantes co-sanguíneos positivos para GFP y RFP, respectivamente. Para más detalles ver sección 8.2 de materiales y métodos.

5.1 La Inflamación

La inflamación es uno de los primeros procesos defensivos del organismo frente a las agresiones del medio. Está presente en muchas enfermedades y ocurre con el fin de aislar y destruir al agente dañino, así como para reparar el tejido u órgano dañando. Se manifiesta como una respuesta inespecífica y está mediada por agentes inflamatorios. Ocurre en los tejidos conectivos vascularizados y se considera un

mecanismo de inmunidad innata.

La inflamación puede ser clasificada como aguda o crónica. La aguda es la respuesta inicial del cuerpo a los estímulos nocivos y se consigue mediante el aumento en el movimiento de plasma y leucocitos (especialmente granulocitos) de la sangre a los tejidos dañados, donde son activadas las cascadas bioquímicas que activan y regulan la respuesta inflamatoria. La inflamación prolongada o crónica conduce a un cambio progresivo en el tipo de células presentes en el lugar de la inflamación y se caracteriza por la simultánea destrucción y curación del tejido durante el proceso inflamatorio.

Los mediadores inflamatorios tienen una vida media corta y se degradan rápidamente en el tejido. Por lo tanto, la inflamación aguda cesa una vez que el estímulo se ha eliminado, pero si éste permanece el proceso inflamatorio se alarga considerándolo crónico, como en el caso de infecciones persistentes, alteraciones inmunitarias o una exposición prolongada a agentes tóxicos.

El cuadro inflamatorio se caracteriza por cambios hemodinámicos, alteración de la permeabilidad vascular y modificaciones leucocitarias (Kumar 2009). Cuando el proceso inflamatorio comienza se producen cambios vasculares como la vasodilatación que incrementa la permeabilidad y conlleva una disminución del flujo sanguíneo debido al aumento en la viscosidad de la sangre. En condiciones normales el endotelio no permite la salida de proteínas, pero bajo un proceso inflamatorio se producen alteraciones en las uniones de las células endoteliales y cambios en las cargas de la membrana basal que conlleva la salida de líquidos, proteínas y células de los vasos sanguíneos.

El proceso inflamatorio es iniciado por las células que se encuentran presentes en la mayoría de los tejidos, como son los macrófagos residentes, las células dendríticas, los histiocitos, células de Kupffer y mastocitos.

5.1.1 Inflamación como proceso inductor de la fusión celular

Se ha postulado que el daño producido por la irradiación de los animales antes del trasplante de médula ósea podría ser la causa de los eventos de fusión. De hecho, se ha visto que la irradiación en ratones neonatos produce un mayor número de eventos de fusión que en animales adultos, ya que la lesión producida en los neonatos es mayor. Y a su vez, según incrementamos la dosis de irradiación también aumentan los eventos de fusión, tanto en adultos como en neonatos (Espejel et al. 2009). También se sabe que el daño producido por la irradiación puede romper la barrera hematoencefálica facilitando así el acceso de las CMO (Nygren et al. 2008; Espejel et al. 2009).

Sin embargo, estudios recientes demuestran que son los procesos inflamatorios asociados a la irradiación los que inducen los eventos de fusión celular y no la radiación por sí sola. Johansson mostró como una inflamación crónica resultante de una encefalitis autoinmune o una dermatitis severa producía un incremento de 10 a 100 veces en el número de neuronas de Purkinje fusionadas con CMO respecto a lo previamente demostrado (Weimann et al. 2003; Rizvi et al. 2006; Johansson et al. 2008). Sus experimentos de parabiosis demostraron que los eventos de fusión pueden ocurrir sin necesidad de irradiación. Además, cuando se administran drogas antiinflamatorias como prednisolona o antibióticos, la fusión inducida tras la irradiación es inhibida (Nygren et al. 2008).

Dado que el sistema hematopoyético es el responsable de la inflamación y, como hemos mencionado, recientemente se ha descubierto que la fusión celular es un potente inductor de la fusión celular, para completar el presente trabajo nos propusimos analizar si la inflamación afectaba a los posibles eventos de fusión intra-hematopoyéticos.

Para la realización de nuestros estudios de fusión celular inducida por inflamación elegimos un modelo animal de inflamación crónica mediada por LPS (PAMP bacteriano). Los LPS son polímeros complejos que forman la parte mayoritaria de la capa exterior de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, formando una capa protectora hidrófila. Los LPS son reconocidos por el receptor TLR4 (Kumar et al. 2009), y con la mediación de los adaptadores TIRAP/MyD88 desencadenan la activación de la ruta metabólica de IRAK4,1,2 que finaliza con la liberación de citoquinas inflamatorias como la interleuquina 6.

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis doctoral es comprobar la posible implicación del proceso de fusión celular, por parte de las células derivadas de las CMMO, durante el desarrollo de diversas condiciones fisiopatológicas. Para ello escogimos tres modelos relacionados con diferentes enfermedades: ataxia cerebelar, accidente cerebrovascular, e inflamación en el sistema hematopoyético. Dentro de estos modelos patológicos nos propusimos los siguientes objetivos concretos:

Ataxia cerebelar

- Estudiar el efecto del trasplante de CMMO sobre la sintomatología atáxica del modelo de ratón PCD.
- Estudiar la distribución de las células derivadas del trasplante y su caracterización, tanto en animales receptores sanos como atáxicos.
- Verificar la implicación de la fusión celular en la posible mejora de la sintomatología atáxica tras el trasplante de CMMO y comprobar si el proceso degenerativo estimula los eventos de fusión.

Accidente cerebrovascular

- Caracterización de las células fusionadas asociadas a la vasculatura cerebral tras un trasplante de MO.
- Análisis de los eventos de fusión celular tras un proceso isquémico.

Sistema hematopoyético e inflamación

- Estudio de la fusión celular dentro del sistema hematopoyético.
- Análisis del efecto de la inflamación sobre los eventos de fusión celular dentro del sistema hematopoyético.

MATERIALES Y MÉTODOS

1 Animales de experimentación

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 los 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 CIPF o del CABIMER.

Marina Piquer cuenta con la titulación oficial de tipo C concedida por la Consejería de Alimentación, Agricultura y Pesca, de la Generalitat Valenciana, necesaria para poder trabajar legalmente con animales de experimentación.

1.1 Condiciones de estabulación y manejo de los animales

Los animales, tanto en las instalaciones del CIPF como del CABIMER, se estabularon bajo barrera en condiciones libres de gérmenes patógenos específicos (SPF, del inglés *Specific Pathogen Free*) con las condiciones ambientales constantes: temperatura ($22\pm 1^\circ\text{C}$) y humedad ($55\pm 10\%$), en grupos de máximo 4 ratones por jaula de polieteramida (435cm^3) ventiladas individualmente, con presión positiva y filtro HEPA, situadas en un rack o estantería 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, los dos animalarios disponían de un programa de centinela y control medio-ambiental.

1.2 Animales de experimentación

Para la realización de esta tesis se usaron diversas líneas de ratones transgénicos adquiridas a Laboratorios Jackson (<http://www.jax.org>) o cedidas amablemente por otros laboratorios. Así mismo, generamos en nuestro laboratorio nuevas líneas resultantes del cruce de las líneas anteriormente mencionadas. Todas estas cepas de ratones se describen a continuación.

1.2.1 Colonia R26R

La línea de ratones R26R (B6.129S4-Gt(ROSA)26Sortm1Sor/J; JAX Stock Number: 003474) se caracteriza por tener insertado el gen reportero *lacZ* (Mao et al. 1999), precedido por un codón de parada flanqueado por dos regiones LoxP, en la región del cromosoma 6 conocida como locus ROSA26 (Zambrowicz et al. 1997). Este locus, también conocido como Gt(ROSA)26Sor, fue descrito por primera vez por Friederich y Soriano (Friedrich et al. 1991). El locus ROSA26 es activo en la gran mayoría de las células del ratón, por lo que cualquier gen insertado en esta región se

expresa sin ningún tipo de restricción(Strathdee et al. 2006). Así pues, el locus ROSA26 se ha utilizado ampliamente para la expresión de genes reporteros (Mao et al. 1999; Soriano 1999; Awatramani et al. 2001). En el caso de los ratones R26R el gen reportero de la β -Galactosidasa no se expresa de forma natural, pero cuando la enzima cre-recombinasa contacta con el gen reportero, ésta recombina las dos regiones LoxP y se escinde el codón de parada, permitiendo la expresión de dicho gen. Ello permite la visualización de estas células por medio de una simple tinción de X-gal. Estos animales fueron usados en los ensayos de trasplantes como receptores de la médula ósea ya que este sistema nos permitió realizar los estudios de fusión celular (Figura 2).

Estos animales fueron adquiridos en los Laboratorios Jackson (<http://www.jax.org>) y mantenidos en homocigosis en la estirpe C57BL/6J.

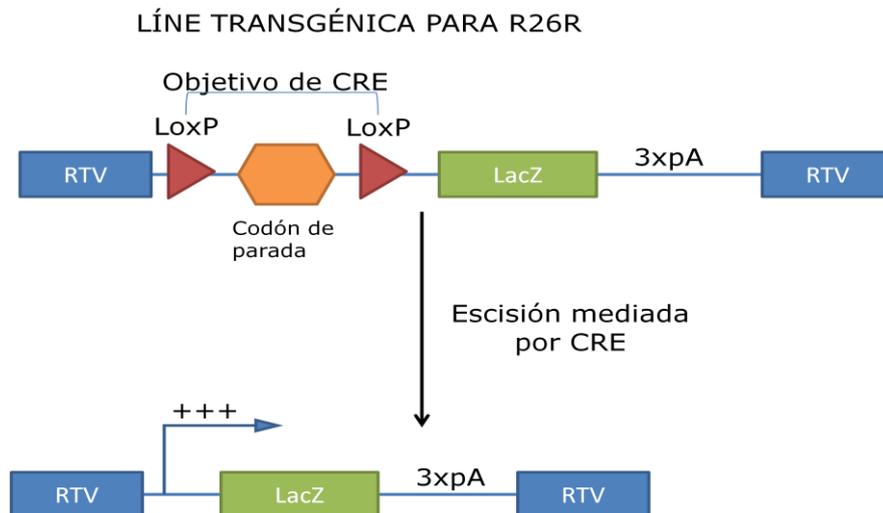


Figura 2.-Esquema de la secuencia génica para línea transgénica R26R. El gen LacZ está precedido por un codón de parada floreado por dos regiones LoxP, sitio de recombinación de la Cre recombinasa. Tras la escisión del codón de parada el gen LacZ puede expresarse.

1.2.1.1 Genotipado

1.2.1.1.1 Extracción de ADN

El ADN para la tipificación genética, tanto de esta colonia como del resto de cepas que se describen a continuación, se extrajo de una muestra de tejido procedente de la cola del animal. Para ello, homogenizamos el tejido mediante una lisis a 55° C durante 3 horas sumergido en Tampón de lisis que contiene 0,2% (p/v) de dodecil sulfato sódico (SDS, del inglés *Sodium Dodecyl Sulphate*), Tris 1,1 M a pH 8,0, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, del inglés *Ethylene Diamine Tetracetic Acid*) 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 (H₂Odd).

Tras homogeneizar la muestra se centrifugó a 14000 rpm durante 2 minutos. El sobrenadante fue transferido a un nuevo eppendorff y se le añadió 450 µl de 2-propanol. Tras agitar por inversión, se forma un precipitado de DNA visible. A continuación se volvió a centrifugar a 14000 rpm durante 10 minutos. Esta vez eliminamos el sobrenadante y procedimos a lavar con 400 µl de alcohol 70% (v/v). Volvimos a centrifugar bajo las mismas condiciones y el pellet fue resuspendido en 100 µl de H₂Odd. Todo el proceso fue realizado a temperatura ambiente y la muestra de ADN se guardó a -20°C para su almacenamiento.

1.2.1.1.2 PCR

La Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR fue descrita por primera vez por Mullins (Mullis et al. 1986) y consiste en la amplificación de un fragmento concreto de DNA, de forma que partiendo de una pequeña muestra de DNA podemos obtener múltiples copias del fragmento deseado.

Para el genotipado de estos animales usamos dos juegos de cebadores distintos. Uno nos da información sobre la presencia del inserto y el otro nos indica la presencia de la secuencia original del locus ROSA26. De esta forma, con dos PCR podemos diferenciar a los animales homocigotos, heterocigotos o silvestres para el transgén. Los cebadores para el inserto generan un fragmento de 280 pb mientras que los cebadores para la secuencia silvestre nos proporcionan un fragmento de 600 pb. Los cebadores para la secuencia silvestre fueron los sugeridos por la web de Laboratorios Jackson: (http://jaxmice.jax.org/pubcgi/protocols/protocols/_protocols.sh?objtype=protocol&protocol_id=433). A continuación se muestran las secuencias específicas para cada cebador:

Genotipo Silvestre	Secuencia
Cebador R26RF2	5´-AAGTCGCTCTGAGTTGTTAT-3´
Cebador R523	5´-GGAGCGGGAGAAATGGATATG-3´

Genotipo Mutante	Secuencia
Cebador LacZ1	5´-GCTGGGATCCGCCATTGTCAGACATG-3´
Cebador LacF1	5´-GCTGGAATTCCGCCGATACTGAC-3´

Para la realización de esta PCR usamos una mezcla compuesta por: Taq polimerasa (New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, EE. UU.), tampón

comercial de la Taq Polimerasa (New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, EE. UU.), desoxinucleótidos (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania), cebadores (10 μ M, cada uno), ADN (entre 100 y 500 ng de muestra) en H₂O. Como control positivo usamos una muestra de un animal heterocigoto de forma que presentará banda en ambas PCRs y como control negativo sustituimos la muestra de ADN por H₂O. Tanto la PCR para el genotipo mutante como la de la cepa silvestre usaron el mismo rango de temperaturas que se indica a continuación en la tabla 1.

Paso	Temperatura	Tiempo	
1	94 °C	5 min	
2	94 °C	1 min	x40 repeticiones
3	58 °C	1 min	
4	72 °C	1 min	
5	72°C	7 min	
6	4 °C	∞	

Tabla 1.- Resumen de temperaturas y tiempos usados en la PCR para el transgén R26R, el silvestre de este transgén y el transgén Cre.

1.2.1.1.3 Electroforesis

Una vez realizadas las PCRs comprobamos el tamaño del producto mediante una electroforesis en un gel de agarosa (D-1 low EEO, Pronadisa, Madrid, España) al 0.8% en Tampon Tris-borato-EDTA (TBE) 1X (Ver apéndice) con 0.5 μ g/ml de Bromuro de Etidio (Applichem, Gatersleben, Alemania). El marcador de pesos molecular empleado fue TriDye™ 100 bp DNA Ladder (New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, EE. UU.). Para la visualización de los diferentes fragmentos amplificados por PCR se uso una lámpara de luz ultravioleta (Gel Doc XR, Bio Rad Laboratories, Barcelona, España).

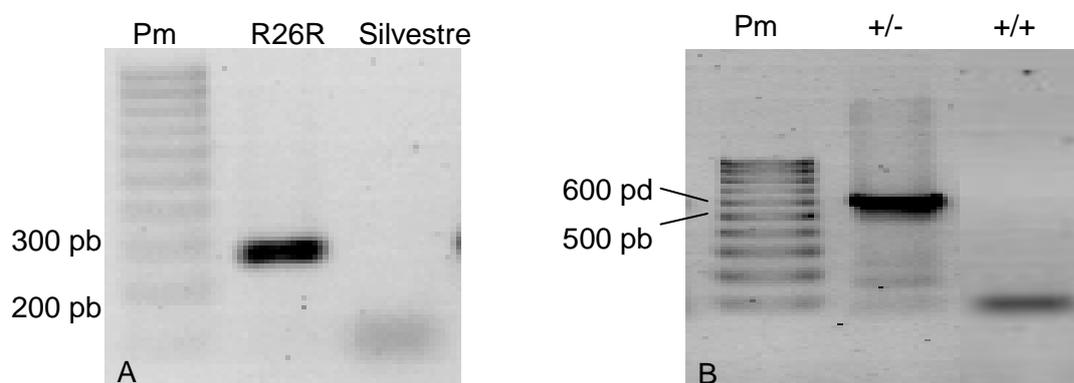


Figura 3.-Fotografía del producto de la PCR obtenido para el gen del locus R26R y su silvestre .En ambas imágenes el primer carril corresponde al marcador de peso molecular (Pm). En el segundo carril de la imagen A se observa un animal positivo para el gen de R26R, mientras que en el tercer carril tenemos un animal negativo para el gen. En el segundo carril de la imagen B podemos observar un animal positivo para el gen silvestre, mientras que en el tercero se muestra uno negativo.

Comparando los resultados de las dos PCR pudimos identificar como heterocigotos a los animales que presentan bandas en las dos PCR, mientras que los que solo la presentaban en la PCR con los cebadores para la secuencia del transgén eran homocigotos para éste y los animales que solo presentaban amplificación en la PCR con el juego de cebadores para las secuencia silvestre fueron considerados nulos para el transgén (Figura 3).

1.2.2 Colonia CRE

Estos animales (BALB/c-Tg(CMV-cre)1Cgn/J; Stock Number:003465) expresan la recombinasa Cre bajo el promotor constitutivo de *citomegalovirus* humano (CMV) y es probable que se exprese incluso antes de la implantación, durante la embriogénesis temprana. Como ya mencionamos con anterioridad, cuando la recombinasa cre entra en contacto con las dos regiones loxP de la construcción R26R se produce la escisión del codón de parada y se expresa el gen reportero *LacZ* (figura 3.). Estos animales fueron adquiridos en los Laboratorios Jackson (<http://www.jax.org>) y mantenidos en homocigosis en la estirpe BALB/c.

1.2.2.1 Genotipado

La recombinasa Cre es una enzima de 343 aminoácidos derivada del bacteriófago P1 que se descubrió como parte del ciclo de vida normal de este virus (Sternberg et al. 1981; Sauer et al. 1988). Este enzima reconoce específicamente secuencias de ADN denominadas sitios loxP, los cuales están formados por 34pb divididas en 2 secuencias de 13, formando un palíndromo e interconectados por 8pb (ATAACTTCGTATA – GCATACAT - TATACGAAGTTAT). La recombinasa Cre realiza con eficacia la escisión del ADN situada entre los sitios loxP. Después del evento de la escisión, los extremos de ADN recombinan dejando un solo sitio loxP en el lugar de la secuencia de intervención.

1.2.2.1.1 PCR

Para la identificación por PCR usamos dos cebadores diseñados en nuestro laboratorio y que se muestran a continuación:

Genotipo Mutante	Secuencia
Cebador Cre B1	5´- GAAAATGCTTCTGTCCGTTTGC-3´
Cebador Cre F1	5´- ATTGCTGTCACTTGGTCGTGGC -3´

El medio para la realización de la PCR fue el mismo explicado para la colonia R26R. En la tabla 1 queda recogido el rango de temperaturas usado en el termociclador para este juego de cebadores.

1.2.2.1.2 Electroforesis

El producto de PCR se sometió a una electroforesis en un gel de agarosa al 1% en las mismas condiciones explicadas en el apartado anterior. El marcador de peso molecular utilizado en este caso es de Biorad (New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, EE. UU.). Los animales que portan el gen para la recombinasa Cre muestran una amplificación de 251 pb (Figura 4).

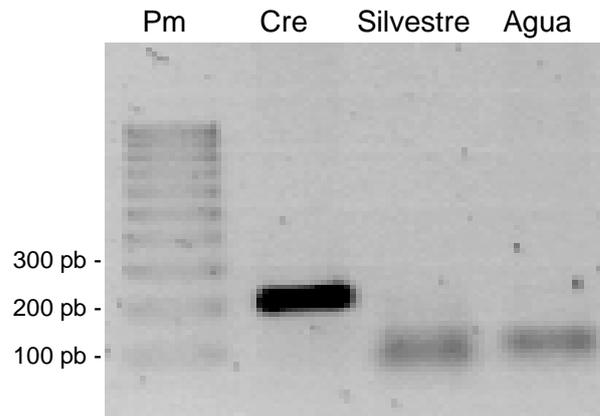


Figura 4.- Fotografía del producto de la PCR obtenido para el gen de la recombinasa Cre. El primer carril corresponde al Pm. El segundo carril corresponde a un animal positivo para la mutación de la recombinasa Cre. El tercer carril no presenta banda ya que corresponde a un animal defectivo para el gen de la recombinasa Cre. En la PCR del último carril el ADN fue sustituido por agua como control negativo de la reacción.

1.2.3 Colonia PCD-R26R

Para identificar los procesos de fusión celular ocurridos en la colonia *PCD* tras un trasplante de médula ósea se procedió a formar una nueva colonia que portase la mutación *pcd^{2J}* y a su vez el constructo para el gen reportero *lacZ* de la colonia R26R.

Los ratones de la colonia R26R son de la estirpe C57BL/6J, por lo que para mantener el sistema de detección previamente descrito para la colonia *PCD* hubo que hacer una serie de cruces entre estos animales y animales salvajes de la cepa DBA/2J, de forma que obtuviésemos animales homocigotos para la mutación R26R (*lac/lac*) pero que presentaran en homocigosis el microsatélite característico de la estirpe DBA/2J (+/+). Posteriormente, estos animales fueron cruzados con animales de la colonia *PCD* para obtener una nueva cepa doble transgénica. La colonia fue mantenida mediante cruces entre animales homocigotos para la mutación R26R (*lac/lac*) y heterocigotos para la mutación *pcd^{1J}* (+/*pcd*). El plan de cruces realizados se muestra en la figura 5.

1.2.3.1 Genotipado

Para cada una de las mutaciones se produjo una identificación mediante PCR.

El proceso seguido ha sido detallado anteriormente en los apartados de materiales y métodos correspondientes para la colonia R26R y *PCD* respectivamente.

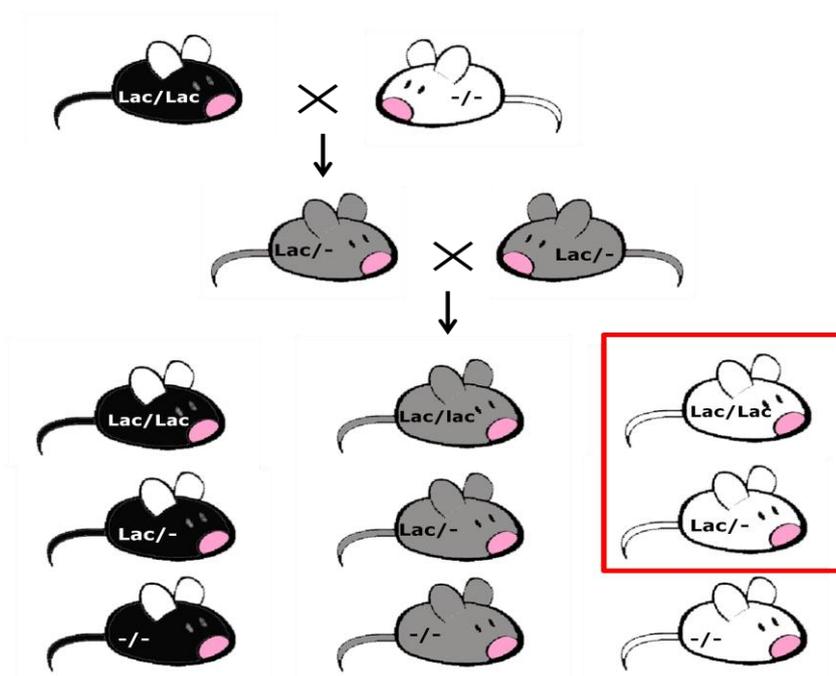


Figura 5.-Esquema de incorporación del gen reportero LacZ a ratones de fondo genético DBA/2J. Los colores representan el fondo genético de cada animal en la región del cromosoma 13 portadora de la mutación PCD. Negro: C57BL/6; Gris: DBA/2J; Blanco: c57BL/6-DBA/2J. El genotipado para LacZ se encuentra inscrito en el interior de cada ratón. Los grupos que permiten transferir el LacZ a animales PCD sin afectar el sistema de la mutación están señalados con un cuadro rojo.

1.2.4 Colonia GFP

Estos animales se usan como donantes de médula ósea ya que gracias a la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP, del inglés *Green fluorescent protein*) son fácilmente diferenciadas de las células del animal receptor del trasplante. Estos animales fueron adquiridos en los Laboratorios Jackson (Tg(CAG-EGFP)B5Nagy/J; Stock Number: 003115) y mantenidos en heterocigosis en la cepa C57BL/6J. La proteína GFP se expresa bajo el promotor de la β -actina.

1.2.4.1 Identificación de los animales

La identificación de los animales GFP se realiza bajo un microscopio de fluorescencia de una biopsia de la cola del animal. La proteína GFP, formada por 238 aminoácidos y cuyo gen fue aislado originariamente de la medusa *Aequorea victoria* Murbach y Shearere, 1902 (Hydroida, Hydrozoa, Cnidaria;(Shimomura 2005)) emite bioluminiscencia fluorescente en la zona del verde del aspecto visible. Es por ello que la observación de una muestra de tejido con luz violeta de 395 nm permite la identificación del fenotipo del animal para esa proteína.

1.2.5 Colonia RFP

Esta cepa de animales se usó para el seguimiento de las células tras realizar trasplantes dobles de médula ósea (ver sección 3.2 de materiales y métodos). Gracias a la presencia de la proteína roja fluorescente (RFP, del inglés *Red Fluorescence Protein*) estas células son diferenciadas con claridad de las células del animal receptor o de las células del otro donante. Estos animales fueron adquiridos en los Laboratorios Jackson (Tg(CAG-DsRed*MST)1Nagy/J; Stock Number: 005441) y mantenidos en homocigosis en la estirpe C57BL/6J.

1.2.5.1 Identificación de los animales

La identificación de los animales RFP se realiza bajo un microscopio de fluorescencia de una biopsia de la cola del animal. Estos ratones expresan la proteína fluorescente roja (DsRED) obtenida de *discosoma sp.* bajo el promotor de la beta-actina de pollo y la secuencia de amplificación de citomegalovirus (<http://www.jax.org>).

Esta proteína fue expresada por ratones en 2004 (Vintersten et al. 2004) y presenta una excitación máxima a 556nm y una emisión máxima a 586 nm. 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, el corazón y la vesícula seminal.

1.2.6 Colonia CRE-GFP

Estos animales fueron usados como donantes de médula ósea ya que se caracterizan por la expresión de la proteína GFP, de forma que nosotros podremos diferenciar las células procedentes del donante de las del receptor R26R. A su vez expresan la recombinasa Cre bajo un promotor constitutivo. Ello permite diferenciar las células del donante que sigan procesos de fusión de las que sigan procesos de transdiferenciación (ver sección 2 de Materiales y Métodos).

La colonia Cre-GFP se originó a partir de cruces entre animales que sintetizan la recombinasa Cre y animales que sintetizan la proteína GFP, obtenidos ambos en los Laboratorios Jackson. La colonia Cre presenta la estirpe BALB/c-Tg(CMV-cre)1Cgn/J mientras que los animales que expresaban la GFP se encuentran en C57BL/6J. En la Figura 6 se muestra el plan de cruces que se usó para la obtención de los animales dobles transgénicos.

1.2.6.1 Identificación de los animales

La identificación de los animales GFP se realiza bajo un microscopio de fluorescencia de una biopsia de la cola del animal. Esta misma muestra fue usada para obtener el DNA necesario para el genotipado de la mutación de la recombinasa Cre como se indicó previamente.

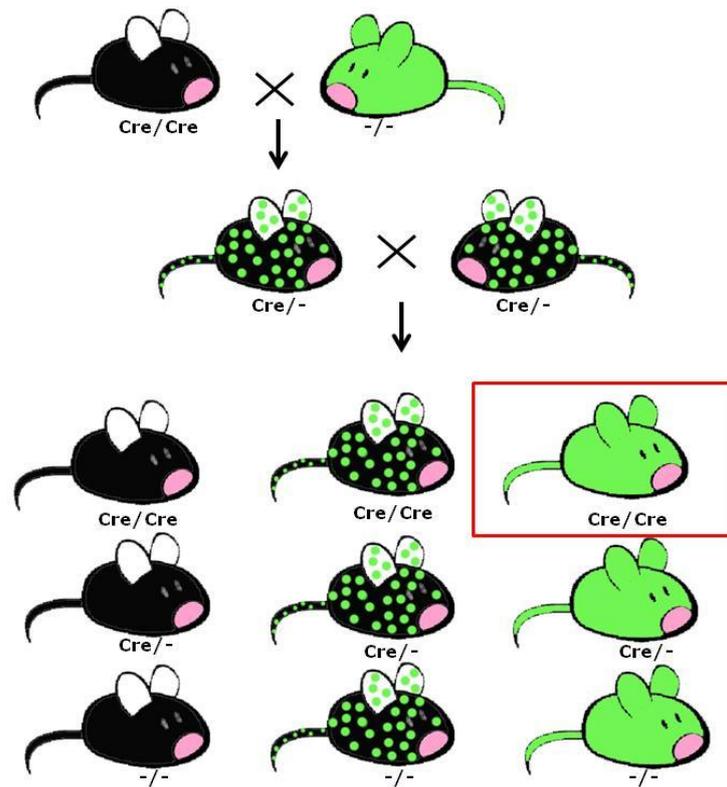


Figura 6.-Esquema de incorporación del gen de la recombinasa Cre a ratones transgénicos para la proteína GFP. El color verde implica la expresión de la proteína GFP y negro la ausencia de ello, el combinado implica la hemicigosis para la expresión de GFP. El genotipado para la cre recombinasa se encuentra inscrito la parte inferior de cada ratón. El grupo que permiten transferir la cre recombinasa y GFP está señalado con un cuadro rojo.

2 Modelos Patológicos Murinos

2.1 Modelo de isquemia cerebral

Como explicamos con anterioridad, el AC o ictus es la reducción del flujo sanguíneo hasta niveles que son insuficientes para mantener el metabolismo necesario para la función normal del cerebro. Para estudiar los eventos de fusión celular que se producen tras este tipo de lesión se implementó un modelo de isquemia focal.

Se eligió un modelo de isquemia cerebral focal basado en la lesión por falta de flujo sanguíneo combinado con hipoxia. Una vez elegido el modelo se tuvo que determinar los tiempos de hipoxia requeridos para producir lesión de forma que esta lesión no dañara todo el hemisferio del animal. Con este fin, se establecieron tres grupos con diferentes tiempos de hipoxia: 20, 25 y 30 minutos, y tras analizar los telencéfalos de estos animales mediante una tinción de Nissl se determinó que el

tiempo más adecuado para el estudio era de 26 minutos, de forma que durante los dos primeros minutos se suministraba la combinación de gases a una dosis de 1 l/min para asegurar que la cámara de hipoxia era completamente rellena con esta combinación gaseosa, y el resto de los 24 minutos restantes se mantenía la hipoxia con un flujo de 0,4 l/min. De esta forma se mantenía una lesión a nivel de córtex, estriado e hipocampo.

Una vez optimizado el tiempo de hipoxia, se llevó a cabo todo el procedimiento. Bajo anestesia con isoflurano (Inibsa; Barcelona, España) se rasuró la zona del cuello del animal. Se limpió con Betadine (Meda, Sweden) y se practicó una pequeña incisión que descubrió la carótida común izquierda del animal. Se aisló la arteria con unas pinzas y se colocó un hilo de sutura por debajo de la carótida. Una vez aislada se pinzaba con una micropinza (Fine Science Tools; Heidelberg, Germany) de forma que el flujo sanguíneo se interrumpía y se podía cerrar la incisión con grapas. El animal era devuelto a su caja y se mantenía durante tres horas en condiciones de temperatura constante.

Pasado ese tiempo se sometía el animal a condiciones de hipoxia durante 26 minutos colocándolo en condiciones de temperatura constante en una atmósfera al 7% de oxígeno y nitrógeno equilibrado. Era importante mantener la temperatura constante ya que si esta disminuía bajaba el ritmo metabólico y, como consecuencia de ello, las células requerían menos aporte de oxígeno y no se producía la lesión isquémica. Una vez pasado el tiempo en hipoxia se anestesiaba de nuevo al animal, y se retiraban las grapas y la pinza, de forma que se produjera la reperfusión. El flujo se restablecía con ayuda de unas pinzas, ya que en algunas ocasiones esto no ocurría de manera inmediata. A continuación se suturaba el animal y era devuelto a su caja de origen. Se mantenían en observación durante 24 horas, durante las que se le administraban analgésicos.



Figura 7.- Lesión producida por la operación de isquemia. La imagen de la izquierda muestra la lesión producida 7 días después de la operación de isquemia (flecha), mientras que en la de la derecha se observa la ausencia de esta lesión cuando no se produce oclusión de la arteria carótida común durante la operación.

Los animales se mantenían con vida durante 14 días y, pasado este tiempo, eran sacrificados para su análisis (Figura 8). Los grupo control eran sometidos a los mismos procedimientos excepto a la oclusión de la carótida común, de forma que en ellos no se producía la lesión cerebral, como se observa en la figura 7.

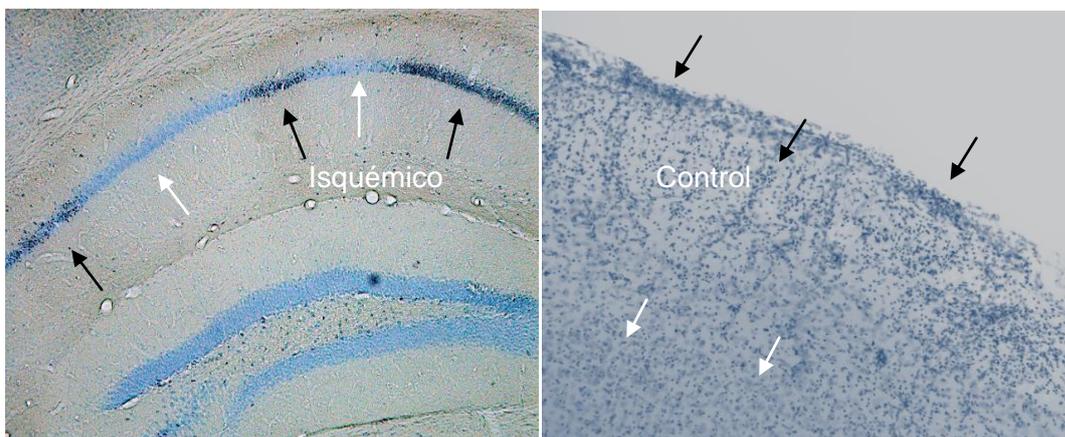


Figura 8.-Imagen de la tinción de Nissl. A la izquierda podemos observar el hipocampo y a la derecha la corteza cerebral de un animal teñido con Nissl tras haberlo sometido a una isquemia cerebral. Se puede observar zonas de muerte celular donde los núcleos picnóticos muestran una coloración mucho más oscura (flechas negras) frente a zonas con núcleos sanos más claros (flechas blancas).

2.2 Modelo de ataxia

La cepa animal, conocida como *Purkinje Cell Degeneration (PCD)*, se caracteriza por la presencia de una mutación autosómica recesiva en el gen *Nna1* que conlleva, entre otras alteraciones, la pérdida de las neuronas de Purkinje en un estadio temprano postnatal. En concreto, la cepa con la que trabajamos presentan la mutación originalmente identificada y denominada *pcd^{1J}*, que fue transferida a la estirpe C57BL/6J (Mullen et al. 1976).

Dicha mutación, denominada *pcd*, apareció espontáneamente en los laboratorios Jackson en Bar Harbor, Maine, EE.UU. Inicialmente estaba presente en la estirpe C57BR/cdj del ratón (*Mus musculus* L. 1758) y posteriormente se transfirió a la estirpe C57BL/6J (Mullen et al. 1976). Esta mutación original se denomina *pcd_{1J}*, aunque se han encontrado dos alelos mutantes adicionales y se han generado otras dos mutaciones por mutagénesis dirigidas (Mullen et al. 1976; Chakrabarti et al. 2006). La mutación original es la más grave (Fernandez-Gonzalez et al. 2002) y la mayoría de la bibliografía se refiere a la mutación original, por lo cual es la que hemos empleado para la realización de esta Tesis doctoral.

La mutación *pcd* es autosómica recesiva y se localiza en el cromosoma 13 del ratón (Mullen et al. 1976). Mediante la utilización de marcadores polimórficos (Campbell et al. 1996) se ha determinado la región portadora de la mutación, que consiste en un segmento genómico de $0,61 \pm 0,33$ megabases localizada entre los marcadores *D13Mit157* y *D13Mit176* (Fernandez-Gonzalez et al. 2002).

En dicha región encontramos el gen *nna1*, que en nuestro mutante no presenta diferencias en la secuencia codificante del gen con respecto al alelo silvestre. Sin embargo, su nivel de expresión en el SNC es nulo, lo que hace pensar que la mutación debe afectar a una secuencia reguladora del gen *nna1*. Dicho gen codifica para la proteína Nna1 (proteína 1 nuclear del sistema nervioso inducida por axotomía) (Harris et al. 2000) y se ha observado una expresión importante de su ARNm en las células de Purkinje del cerebelo, las mitrales del bulbo olfatorio, las neuronas talámicas, en fotorreceptores de la retina y en espermatozoides maduros y en desarrollo (Harris et al. 2000). La proteína murina presenta una homología del 96% con la proteína humana (NNA1) (Harris et al. 2000) y su función está involucrada en el proceso posterior a la traducción de poliglutamilación, donde cataliza la eliminación de las cadenas laterales poliglutamato con dos o más glutamatos, con preferencia por las cadenas largas y que presentan aminoácidos ácidos. Además, Nna1 metaboliza sustratos que imitan el extremo C terminal de la tubulina de una manera que sugiere que la forma tirosilada de la tubulina se acumulará en los ratones *pcd* (Wu et al. 2015).

Debido a la mutación se produce una degeneración postnatal selectiva de aquellas poblaciones neuronales que presentan expresión del ARNm de Nna1 (Fernandez-Gonzalez et al. 2002), de forma que se ven afectados las neuronas de Purkinje, las células mitrales del BO principal y determinadas neuronas de los núcleos talámicos (Mullen et al. 1976; O'Gorman et al. 1985). También presentan una lenta degeneración de los fotorreceptores de la retina y una anomalía en el espermatozoides que impide que sean fértiles. Sin embargo, las hembras no presentan problemas de fertilidad (Mullen et al. 1976). En el presente trabajo hemos utilizado ratones de la estirpe DBA con este alelo, ya que la cría es más efectiva (comunicación personal del Dr. Guénet, Instituto Pasteur, París).

Debido a los efectos de la mutación, el ratón *pcd* presenta problemas de coordinación en el movimiento en el día postnatal 21, y a las cuatro semanas de edad ya presenta una ataxia pronunciada, convirtiéndose en severa en la sexta semana de vida. Se han observado anomalías mitocondriales en los ratones mutantes a partir del día 15 de su nacimiento aunque la citoestructura aún no se ve afectada. Entre la cuarta y séptima semana de vida pierden el 95-99% de su población de neuronas de

Purkinje , lo que conlleva la aparición de la ataxia severa (Mullen et al. 1976). A la edad de 22 días se puede observar caspasa 3 activa (implicada en los procesos de fragmentación del ADN) en las neuronas de Purkinje, lo que confirma que esta degeneración es producida por procesos apoptóticos .Esta perdida en neuronas de Purkinje origina una degeneración neuronal secundaria en el cerebelo (granos) y en el complejo olivar inferior (Chang et al. 1993).

Debido a las dificultades reproductivas que presentan los animales homocigotos para la mutación (*pcd/pcd*) la colonia se ha mantenido gracias a cruces entre animales heterocigotos (*+/pcd*). En el laboratorio del Dr. Alonso Peña se realizaron cruces entre animales obtenidos en los Laboratorios Jackson (<http://www.jax.org>) con la estirpe DBA 2J de forma que la mutación *pcd^{fJ}* quedara asociada al fondo genético del cromosoma 13 de la estirpe C57BL/6J, mientras que el silvestre se asoció al fondo genético de la estirpe DBA /2J. De esta forma obtuvieron una nueva colonia *PCD* (C57BL/6J x DBA/2J) que permite tipificar genéticamente los animales originados gracias a la segregación diferencial de los dos alelos.

Estos animales fueron amablemente cedidos por el Dr. José Ramón Alonso Peña de la Universidad de Salamanca.

2.2.1 Genotipado

La mutación *pcd^{fJ}* se encuentra en una región reguladora que no ha podido ser identificada, por lo que se recurrió al uso de “microsatélites” para su identificación genotípica. Los microsatélites son secuencias de ADN en las que un fragmento de entre 1-6 pares de bases se repite en tándem. A pesar de que los microsatélites poseen altas tasas de mutación, las regiones flanqueantes están más conservadas y se emplean como marcadores moleculares.

Para la colonia *PCD* se usan dos microsatélites presentes en ambas estirpes, tanto en C57BL/6J como en DBA/2J, pero que a la vez son polimórficos y difieren en un número suficiente de repeticiones como para que sean diferenciados por electroforesis. A su vez, deben estar lo suficientemente cerca de la región portadora de la mutación *pcd^{fJ}* como para asegurar su transmisión ligada en una probabilidad muy elevada.

Los microsatélites usados bajo estas características son los D13Mit250 y D13Mit283. El primero de ellos es un fragmento de 130 pb en los ratones de la estirpe C57BL/6J, mientras que en la estirpe DBA/2J presenta 116 pb. El segundo es un fragmento de 114 y 136 pb en la estirpe C57BL/6J y DBA/2J, respectivamente. Se utilizaron ambos marcadores para asegurarnos de que su localización no está afectada por fenómenos de recombinación a lo largo de las generaciones.

2.2.1.1 PCR

Los cebadores usados para ambos microsatélites fueron proporcionados por el Dr. Alonso Peña. En la tabla 2 se recogen las secuencias de los dos cebadores correspondientes a cada uno de los dos posibles genotipos.

Microsatélite D13Mit250	Secuencia
Cebador 1	5'-ACACTCATTTCATGCACGA-3'
Cebador 2	5'-AGGTCCTCAAATCTCACAAGTAGG-3'
Microsatélite D13Mit283	Secuencia
Cebador 1	5'-GGAAGCAGTCTCCTGCCTC-3'
Cebador 2	5'-GAGAGGTGGCACATGAGGTT-3'

Tabla 2.- Cebadores usados para genotipar los microsatélites asociados al transgén PCD.

El medio para la realización de la PCR contiene los mismos componentes detallados en la colonia R26R. Como control positivo se usó un animal heterocigoto para la mutación (+/*pcd*) de forma que presente ambas bandas cuando sea visto en un gel de electroforesis y como control negativo el ADN es sustituido por agua. Los ciclos de temperatura se muestran en la tabla 3.

Paso	Temp. D13Mit250	Temp. D13Mit283	Tiempo	
1	94 °C	94 °C	5 min	
2	94 °C	94 °C	1 min	x40 repeticiones
3	54 °C	53 °C	1 min	
4	72 °C	72 °C	1 min 30 s	
5	72°C	72°C	10 min	
6	4 °C	4 °C	∞	

Tabla 3.- Condiciones de temperatura y tiempo de la PCR para la mutación *pcd*^{1J}.

2.2.1.2 Electroforesis

Los productos de la PCR para los microsatélites D13Mit250 y D13Mit283 se separan en un gel de agarosa (MS-8, Pronadisa, Madrid, España) al 3% en tampón Tris-borato-EDTA (TBE) 1X. A este gel se le añaden las cantidades ya indicadas anteriormente de bromuro de etidio. Aquellos animales que solo presenten una banda de 130 pb para el D13Mit250 o de 114 pb para el D13Mit283 son los animales homocigotos para la mutación (*pcd/pcd*), mientras que los que presenten una sola banda de 116 para el D13Mit250 o de 136 para el D13Mit283 son los homocigotos

para la cepa silvestre (+/+). Los animales que presenten dos bandas para ambos microsatélites son considerados heterocigotos (+/*pcd*; Figura 9).

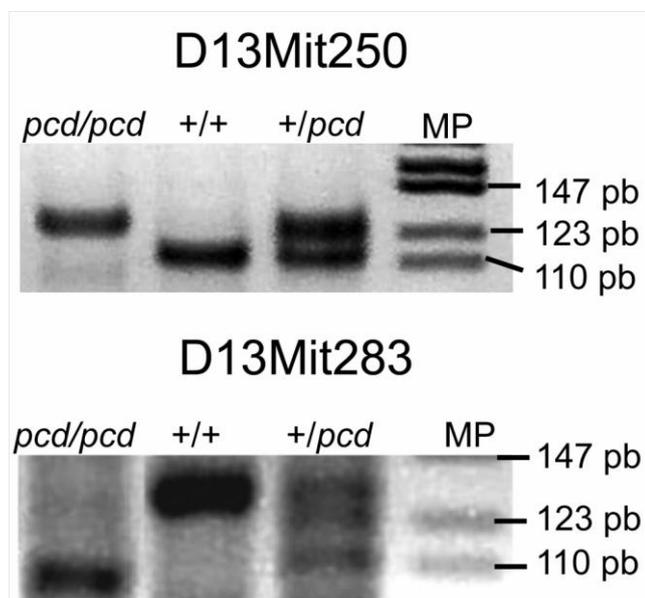


Figura 9.- Genotipado de los ratones de la colonia PCD. Imágenes de dos geles de agarosa en los que se han resuelto dos PCR para la amplificación de las regiones microsatélites del ADN del ratón D13Mit250 y D13Mit283. Las bandas simples corresponden a homocigotos para la mutación *pcd* 1J (*pcd/pcd*) y a homocigotos silvestres (+/+), mientras que las bandas dobles corresponden a animales heterocigotos (+/*pcd*). MP: marcador de peso molecular en pb.

2.3 Modelo de inflamación

Gracias a estudios previos se sabe que la inflamación promueve un incremento en los niveles de fusión celular en el cerebro y el hígado (Johansson et al. 2008; Nygren et al. 2008; Espejel et al. 2009). Para estudiar como afectaba la inflamación a la fusión que se produce dentro del propio sistema inmune se implementó un modelo de inflamación crónica por LPS.

A los animales se les aplicó una dosis de 15,5 mg de LPS por kilo de peso (Yoder et al. 1996), suministrándolo vía inyección intraperitoneal y dando dos dosis semanales durante un periodo de dos meses. Como control se usaron animales a los que se les suministró suero fisiológico estéril.

Se realizaron dos tiempos de sacrificio diferente, uno grupo fue sacrificado nada más terminar la administración del LPS mientras que el otro grupo fue sacrificado cuatro meses después de la última administración del LPS.

3 Sistemas de detección de la fusión celular

3.1 Detección por X-Gal

Para detectar eventos de fusión celular nos servimos de las líneas de ratones transgénicos derivadas de las colonias R26R y CRE. En caso de que las células procedentes de estos animales fusionen entre sí, la recombinasa Cre entrará en contacto con el gen reportero *LacZ* floxeado de la célula R26R y permitirá su expresión al eliminar el codón de parada (Figura 10). El gen reportero codifica para la β -galactosidasa que degrada β -galactósidos, como la lactosa o el 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactósido (X-Gal; Sigma-Aldrich, EE.UU).

Gracias a esta actividad enzimática podemos identificar las células fusionadas mediante técnicas histoquímicas por degradación del X-Gal o mediante técnicas inmunofluorescentes empleando anticuerpos que reconozcan la enzima β -galactosidasa. Estos sistemas de visualización ya han sido usados con anterioridad para la demostración de la fusión celular (Alvarez-Dolado et al. 2003).

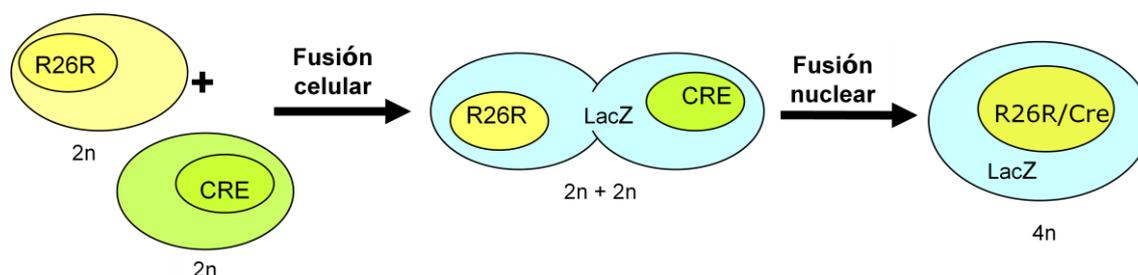


Figura 10.- Representación gráfica de la expresión del gen *LacZ* tras la fusión celular. Cuando una célula con la inserción R26R se fusiona con una de un animal transgénico para las Cre recombinasa se fusiona, se produce la expresión del gen *Lac Z*. Posteriormente puede producirse la fusión nuclear.

Para la tinción histológica por X-gal se procesó el tejido de la siguiente manera: tras inducir la anestesia del animal este fue perfundido con paraformaldehído (PFA) al 2% en PBS y glutaraldehído al 0,25% para que se pueda detectar la actividad enzimática de la β -galactodidasa mediante una tinción posterior con X-gal (Véase sección 6.1.1 de materiales y métodos).

3.2 Detección por doble marca fluorescente

Otro método para la detección de eventos de fusión es a través de la creación de quimeras transgénicas para la expresión de genes que codifican para dos proteínas fluorescentes. Para ello se trasplantó médula ósea de dos animales, que codifican

respectivamente para dos proteínas fluorescentes distintas, a un mismo receptor. De esta forma una célula que presente las dos proteínas fluorescentes al mismo tiempo debe provenir de un evento de fusión.

Este procedimiento requiere que ambos donantes compartan el mismo fondo genético, por lo que deben provenir de los mismos progenitores. Para obtener los donantes por tanto, se realizaron cruces entre individuos heterocigotos de las dos cepas transgénicas fluorescentes GFP y RFP y se seleccionaron únicamente los hermanos positivos para uno de los transgenes, como se muestra en la figura 11.

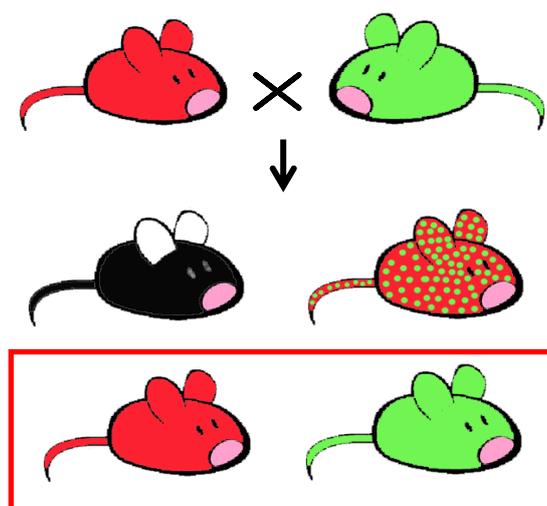


Figura 11.- Representación gráfica de los cruces producidos para la obtención de los animales fluorescentes donantes de médula ósea. Los colores representan la expresión de las diferentes proteínas fluorescentes: rojo para RFP; Verde para GFP; Negro para ausencia de fluorescencia. Los animales que pueden ser usados como donantes de MO están enmarcados en un recuadro rojo.

4 Trasplante de médula ósea

A continuación pasamos a describir los diferentes procesos que seguimos para realizar los trasplantes de médula ósea. Comenzaremos con los métodos de ablación de la médula ósea del animal receptor, seguido de la extracción de las células de médula ósea y finalizaremos con los distintos tipos de trasplante celular realizados.

4.1 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 procedentes del receptor. Para llevar a cabo este proceso hemos realizado dos procedimientos diferentes, dependiendo de la edad del animal receptor. En animales receptores de mayor edad (día postnatal veinte) se

les realizo una ablación por irradiación, mientras que a los animales de menor edad no puede aplicarse la irradiación ya que interferiría en el proceso normal de desarrollo cerebral. Para estos casos, en que el trasplante se realiza justo tras el nacimiento (día postnatal uno o dos), se aplicó una ablación química

4.1.1 Ablación química

La ablación química emplea el Busulfán (Sigma-Aldrich, EE.UU), un agente alquilante bifuncional que provoca daño al ADN. Puede actuar en cualquier etapa del ciclo mitótico, pero estudios *in vitro* han demostrado que las células en la fase G1 tardía o M son más sensibles a la droga, mientras que las que se encuentran en la fase S son menos sensibles debido a que los mecanismos de reparación del ADN permanecen activos.

La finalidad de este procedimiento es realizar los trasplantes con las nuevas células de médula ósea tras el nacimiento del animal. Para ello es necesario administrar la droga en los estadios gestacionales del receptor. Para ello, usamos un protocolo ya establecido por otros grupos de investigación mediante el cual se administró 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 médula ósea se realizó durante las primeras 24 horas tras el nacimiento (Barker 1999).

4.1.2 Ablación por irradiación

Para llevar a cabo la ablación de las células de médula ósea por irradiación se usaron dos fuentes de irradiación ionizante diferentes, de ^{60}Co o bien de ^{137}Cs . En ambos casos se produjo una irradiación completa del cuerpo del animal.

El ^{60}Co es el radioisótopo más estable del cobalto, y ha sido empleado durante muchos años en radioterapia médica. Para poder irradiar de manera uniforme por todo el cuerpo y con la misma dosis a todos los animales, estos se introdujeron en pequeñas cajas de metraquilato (que no interfiere en la tasa de radiación) diseñadas a tal efecto. La dosis de radiación empleada con este tipo de fuente fue de 7,5 Gy en la línea del animal, dosis previamente estandarizada por el Dr. Javier Sánchez Recio de la Universidad de Salamanca.

El ^{137}Cs es uno de los principales isótopos radioactivos del cesio, y en los últimos años está sustituyendo al ^{60}Co en el tratamiento del cáncer. La dosis usada también fue 7,5 Gy. A diferencia de la fuente de ^{60}Co , no hubo que utilizar ningún dispositivo especial para inmovilizar a los animales durante la irradiación, ya que se introdujeron en un contenedor específico del propio equipo, que iba girando de forma adecuada con el fin de proporcionar una irradiación homogénea.

Todos los animales fueron irradiados en el estadio postnatal 19 (P19) y trasplantados dentro de las primeras 24 horas. Tras producirse la irradiación, todos los animales se mantuvieron separados en un aislador específico para animales irradiados del SEA de la Universidad de Salamanca, independientemente del tipo de irradiación usada. Para verificar la eficacia de la irradiación, en todos los experimentos se dejó un animal control sin recibir trasplante y localizado en condiciones "sucias" fuera del aislador.

4.2 Obtención de las muestras de MO

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 procede 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 médula ósea mediante inyección de tampón fosfato salino (PBS, del inglés *Phosphate Buffered Saline*) 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 (BD Falcon; Bedford, Massachusetts, EE.UU.) 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 en una centrífuga.

A continuación se elimina el sobrenadante y el sedimento, rojo por los eritrocitos, es resuspendido en 4 ml de buffer de lisis para eritrocitos (Ver apéndice). Dejamos actuar durante 5 minutos y a continuación 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 tomamos una muestra para el recuento de células de médula ósea y vuelve a ser centrifugado. El nuevo "pellet" es resuspendido ya en un volumen adecuado de PBS para proceder a su inyección.

En los trasplantes con médula ósea procedente de dos donantes distintos (*trasplante doble*), las médulas son aisladas individualmente y previamente a la inyección se mezclan en una proporción de 1:1. Al igual que en los casos de un trasplante con un único donante, se inyectan 7,5 millones de células de la mezcla de ambas médulas óseas en un volumen no superior a 100 µl, es decir inyectamos 3,25 millones de células de cada donante.

4.3 Trasplante de células de 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 procedemos al trasplante propiamente dicho. Este se realiza mediante una inyección intravenosa ya que así se facilita la llegada de las mismas al torrente sanguíneo. Dependiendo de la edad del donante seguimos un protocolo de inyección diferente. En el caso de neonatos con ablación química se inyectó en la vena facial, mientras que para animales jóvenes/adultos sometidos a la ablación por irradiación se realizó una inyección en la vena principal de la cola.

4.3.1 Trasplante tras ablación química

Realizamos una inyección intravenosa en la vena facial 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 inyectan 7,5 millones de células por animal en un volumen comprendido entre 50-100 μ l. En el caso de un trasplante doble, también se inyectan 7,5 millones de células, pero de una mezcla de ambas médulas óseas en proporción 1:1, en un volumen no superior a 100 μ l. Es decir, inyectamos 3,25 millones de células a cada receptor. Gracias a que la inyección es realizada a favor del torrente sanguíneo no sufrimos pérdida de volumen tras la inyección.

4.3.2 Trasplante tras ablación por irradiación

Para la inyección intravenosa en la cola los animales son inmovilizados en un dispositivo específico (LE, PanLab S.L.; Barcelona, España). La cola es rociada con alcohol al 70% (V/V; Sigma-aldrich, EEUU), ya que gracias a su efecto vasodilatador nos es más fácil visualizar la vena. A continuación se realiza una inyección superficial introduciendo la aguja de 30 G de una jeringa de insulina (BD Falcon; Bedford, Massachusetts, EE.UU.) en la vena en dirección distal-proximal e inyectamos 7,5 millones de células resuspendidas en un volumen comprendido entre 100-150 μ l.

4.3.3 Comprobación de la viabilidad de las células trasplantadas

Puesto que desde el momento de la extracción celular del donante hasta el momento del trasplante transcurre un tiempo decidimos comprobar la viabilidad de las células extraídas. Para ello, tras completar el proceso experimental, incluido el trasplante, se siembran una pequeña fracción de las células empleadas en una placa de plástico estéril (Sarsted, Alemania). El medio de cultivo empleado está compuesto por medio IMDM, suero fetal bovino al 10% y pen/strep 100 μ g/ml (mezcla comercial de antibióticos Penicilina y Estreptomina; 15140-148, Invitrogen).

4.3.4 Seguimiento del trasplante

4.3.4.1 Cuidados especiales de las quimeras

Los animales trasplantados mediante ablación química fueron mantenidos con la madre durante 30 días en lugar de 21, ya que suelen presentar un menor tamaño que los animales sin tratamiento. Tras el destete, fueron mantenidos en las mismas condiciones que los animales sin tratamiento y no se observan diferencias en la supervivencia.

Los animales trasplantados con ablación por irradiación se mantuvieron durante dos semanas en el mismo aislador en el que se habían mantenido durante el periodo de irradiación.

4.3.4.2 Análisis y seguimiento de las células trasplantadas mediante citometría de flujo

4.3.4.2.1 La citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica que permite recoger datos de dispersión de luz y fluorescencia emitida por cada una de las células presentes en una suspensión celular al atravesar un punto de interrogación sobre el que incide un rayo laser a una longitud de onda definida. Cuando este haz incide sobre una célula, sufre una dispersión frontal y lateral del mismo que es recogida sobre un detector que genera una información única y específica para cada una de las células.

Basándose en esta difracción de la luz en sentido frontal (forward scatter, FS), se puede evaluar el tamaño de las células. La reflexión de la luz de manera lateral (side scatter, SS) evalúa la granularidad o complejidad de las mismas. Al mismo tiempo, y debido a la excitación de moléculas fluorescentes presentes en la célula, se recoge también por un detector y para cada célula, una emisión de fluorescencia específica. Así es posible detectar el nivel de intensidad de la fluorescencia y el porcentaje de células que presentan estas moléculas fluorescentes. El uso de moléculas fluorescentes distintas (distintos colores de fluorescencia) que se unieran a distintos marcadores celulares permitiría analizar la presencia simultánea en una célula de dichos marcadores celulares.

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 parámetros de FS, SS y/o intensidad de fluorescencia para uno o varios marcadores fluorescentes con un separador o "sorter" (FACS, del inglés Fluorescence-Activated Cell Sorter)

4.3.4.2.1.1 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 (GFP o RFP) permitía realizar este estudio sin la necesidad de un marcaje adicional. También se utilizó este procedimiento para el análisis de las células fusionadas tras un trasplante doble de médula ósea. No todos los animales trasplantados presentaron el mismo grado de quimerismo, y este seguimiento nos permitió 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 (GFP o RFP).

A su vez se utilizó la citometría de flujo para analizar el porcentaje de células fusionadas tanto en bazo, timo y médula ósea, en los procedimientos de trasplante doble de médula ósea. Para ello, en estos casos se obtenían las muestras mediante extracción de los diversos órganos una vez que el animal había sido anestesiado para su sacrificio (Véase sección 6.1 de materiales y métodos).

Para el seguimiento de la incorporación de MO trasplantada, las muestras sanguíneas fueron tomadas 2, 4 y 6 semanas tras el trasplante para los animales con ablación por irradiación, y 4 semanas tras el trasplante para los animales con ablación química. En ambos casos se usó un control negativo y uno positivo para cada tipo celular y de marcaje con fluorescencia. 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 μ l de sangre periférica en 150 μ l de PBS 0.1M en un tubo de 5ml de plástico. Se añadió 4 ml de solución de lisis de eritrocitos (Ver apéndice) 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 μ l de PBS 0.1M, quedando así listo para su paso en el citómetro de flujo. Si las células

iban a ser sorteadas se resuspendían en 400 µl de solución de sorter (Ver apéndice). Todos estos pasos se realizaron en hielo para evitar la lisis de las células sanguíneas.

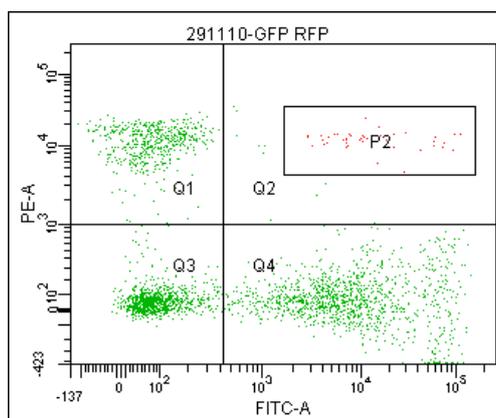


Figura 12.- Diagrama de puntos (Dot plot) en el que se representa, para cada una de las células de una suspensión (cada punto), la fluorescencia emitida en el canal verde (GFP o FITC) vs la fluorescencia emitida en el canal rojo (RFP o PE). Esto permite separar las células en cuatro subpoblaciones: células que no presentan ninguna fluorescencia (Q3), con fluorescencia GFP+ (Q4), con fluorescencia RFP+ (Q1), y células que presentan doble fluorescencia (células fusionadas) (Q2).

Para analizar el contenido del material genético de estas células se realizó una tinción del núcleo con DRAQ5 (1, 5- bis[[2-(di- methylamino) ethyl] amino]- 4, 8- dihydroxyanthracene-9, 10-dione)(Abcam, Cambridge, UK) que es un marcador fluorescente que se une al DNA en células tanto vivas como fijadas y que se excita y emite fluorescencia en el canal del rojo lejano, de forma que no interfiere con la señal de emisión de fluorescencia de la GFP o la RFP. La tinción se realiza incubando 5 minutos a temperatura ambiente con el DRAQ5 a una concentración final de 5 µM, permitiendo su análisis sin necesidad de ser eliminado.

4.3.4.2.1.1.1 Análisis de células de médula ósea

Para el análisis de células de médula ósea por citometría seguimos el mismo procedimiento que en el sección anterior (sección 3.2.1.1.1 de materiales y métodos): obtención de las muestras de BM, solo que en este caso las células fueron resuspendidas en 800 µl de PBS 0.1M para el análisis por citometría o en 800 µl de solución de sorter (Ver apéndice) cuando iban a ser seleccionadas.

4.3.4.2.1.1.2 Análisis de células de bazo

En el caso del bazo es necesaria previamente una disgregación mecánica del tejido. Para ello, se colocó el bazo sobre un filtro de 70 µm de diámetro de poro (BD Falcon; Bedford, Massachusetts, EE.UU.) que a su vez se había colocado en una placa petri a la que se le añadió PBS 0.1M. Con ayuda del embolo de una jeringa de insulina (BD Falcon; Bedford, Massachusetts, EE.UU.) disgregamos el bazo sobre el

filtro. Posteriormente fue retirado el filtro y el PBS que contiene las células se pasó a un Falcon® de 50 ml. Las células fueron centrifugadas durante 5 minutos a 300G. Eliminamos el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 20 ml de tampón de lisis de eritrocitos (Ver apéndice) durante 5 minutos. A continuación eliminamos el sobrenadante, añadimos 30 ml de PBS y volvimos a centrifugar en las mismas condiciones. Se repite el lavado con PBS y las células están listas para resuspender en 800 µl de PBS o tampón de sorter dependiendo del uso que se les vaya a dar.

4.3.4.2.1.3 Análisis de células de timo

Las células de timo son disgregadas mecánicamente como hemos explicado en la sección anterior. Una vez que disgregamos se eliminó el filtro y la suspensión celular en PBS fue colocada en un Falcon ® de 50 ml. Las células fueron centrifugadas a 300G durante 5 minutos y a continuación se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 400 µl de PBS 0.1M o Tampón de sorter (Ver apéndice) dependiendo del uso que se les vaya a dar.

4.3.4.2.2 Discriminación de dobletes en la cuantificación de los eventos de fusión.

Un aspecto importante a la hora de establecer el protocolo de detección de células fusionadas en el software del BD FACSAria utilizado, era la discriminación de los posibles dobletes. Los dobletes son tándemes de dos o más células que pasando juntas por el punto de interrogación del haz del laser del citómetro podrían dar falsos positivos (falsas células fusionadas) en el caso de que tuvieran distintas fluorescencias (una al menos fuera GFP+ y otra al menos RFP+).

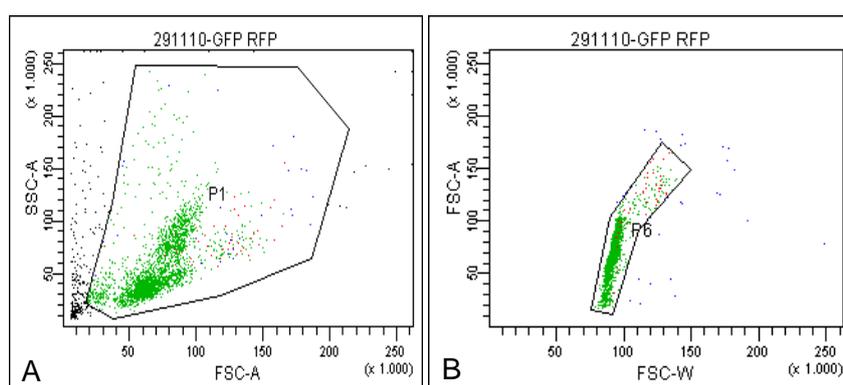


Figura 13.- Imagen de la discriminación de dobletes. A) Diagramas de puntos (Dot plot) en el que se resrepresentan las dispersiones frontal (FS o FSC-A) y lateral (SS o SSC-A) de una suspensión de células de sangre de ratón. Cada punto corresponde a una célula y contiene la información, en el eje X de su tamaño, y en el eje Y de su complejidad. B) Diagrama de puntos (Dot plot) en el que se representa el ancho del pulso del FS frente a la intensidad del mismo FS. Este diagrama permite delimitar la zona correspondiente a los siguletes y excluir de ella a los dobletes.

Para eliminar esta posibilidad se introdujo un diagrama de puntos (Dot Plot) en el protocolo de detección: área FS vs pulso FS (o anchura del FS). De forma que todas las células (puntos) que se salieran de la zona establecida como de singuletes (P6) eran considerados dobletes y por tanto excluidos del análisis (figura 13).

5 Pruebas de comportamiento y actividad motora

Parte de los animales PCD usados en esta tesis doctoral fueron sometidos a pruebas de comportamiento para evaluar su actividad motora y tener una aproximación al efecto funcional del trasplante de médula ósea sobre su patología atáxica. Concretamente, se realizaron a los ratones mutantes PCD a las dos semanas de haber recibido el trasplante (P35). No se hicieron distinciones entre machos y hembras (Takahashi et al. 2006). Las pruebas se realizaban cada 15 días, repitiéndose un total de 7 veces y alcanzando los animales la edad de 125 días.

Para la realización de estas pruebas se formaron tres grupos experimentales con 4 animales cada uno:

- Animales PCD trasplantados con médula ósea “sana” (grupo **PCD trasplantado**).
- Animales PCD sin ningún tipo de tratamiento (grupo **PCD sin trasplante**).
- Animales silvestres (+/+) hermanos de los anteriores trasplantados o no con CMO (grupo **Silvestre**).

A continuación describimos las diferentes pruebas de comportamiento a las que se sometieron los animales de los diversos grupos experimentales.

5.1 Campo abierto

La prueba del campo abierto nos permite evaluar las variaciones en la capacidad motora y obtener información sobre el comportamiento exploratorio y la reactividad emocional de los animales de experimentación. Esta prueba se llevó a cabo colocando al ratón en el interior de una caja rectangular de plástico 160 cm² de superficie y 20 cm de alto, con el piso dividido en cuadros de 5 cm de lado cada uno (figura 14).

Procedimos a colocar al animal en el centro del rectángulo y lo observamos durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo lo devolvimos a su jaula de origen. Entre animal y animal el campo abierto fue limpiado con etanol de 50% (v/v) para evitar que el siguiente animal estudiado se encontrase bajo la influencia de los olores

desprendidos por los animales precedentes.

Durante el tiempo que el animal permanece en el campo abierto registramos las veces que cruza las líneas, de forma que podemos diferenciar entre *cruces completos* cuando el animal traspasa la línea con sus cuatro extremidades y *medio cruce* cuando solo traspasa la línea con las extremidades delanteras. Esto nos da información sobre la capacidad motora principalmente.

También fueron registradas las veces que el ratón se levantó sobre sus extremidades traseras, que denominamos *alzadas*; el número de veces que el animal se aseaba (*limpiezas*) y el número de defecaciones que realizó (*defecaciones*). Las alzadas nos dan información sobre el tono muscular del animal. Así mismo, tanto las alzadas como las limpiezas nos proporcionan información sobre el comportamiento exploratorio, mientras que las defecaciones nos indican la reactividad emocional. Todas las pruebas fueron grabadas con una cámara de video situada sobre el campo abierto para su posterior visualización por un segundo observador también ciego a la condición experimental de cada individuo.

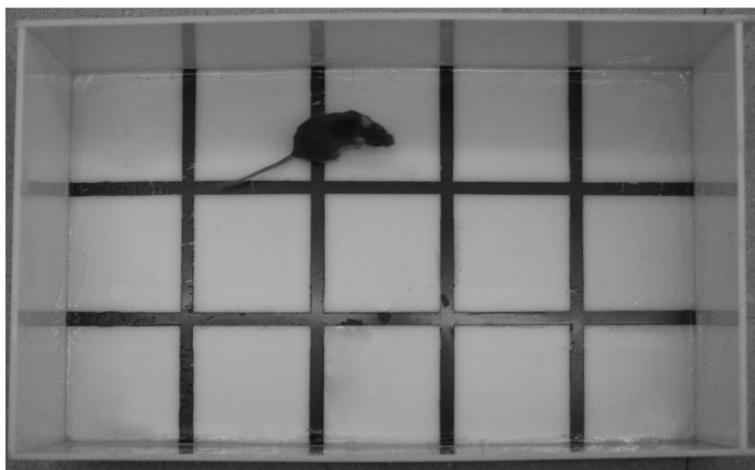


Figura 14.- Campo abierto. Imagen de un ratón mientras realiza la prueba de comportamiento de campo abierto.

5.2 Velocidad media de desplazamiento

Para el análisis de la velocidad media de desplazamiento (m/s), se situaron los ratones en el extremo de una superficie horizontal de 1 metro de longitud y 2,5 cm de ancho, y se midió el tiempo que tardaban en desplazarse de un extremo a otro. Al ser una superficie de solo 2,5 cm. de ancho, el animal no podía darse la vuelta, lo que le obligaba a desplazarse únicamente en un sentido. Asimismo, para que no escapase, uno de los lados longitudinales presentaba una altura de 20 cm; mientras que en el otro había una caída, que, además de impedir su huida permitía su grabación en vídeo.

5.3 Rotarod

Para comprobar la capacidad motora y coordinación entre el eje anterior y posterior de los animales, estos fueron sometidos a la prueba de comportamiento rotarod. En esta prueba los animales son situados sobre un eje circular que gira inicialmente a una velocidad de 4 revoluciones por minuto (rpm). Una vez el animal se ha habituado a este movimiento la velocidad se incrementa de forma constante, llegando a alcanzar las 40 rpm en un tiempo de 10 minutos. Cuando el animal no es capaz de mantenerse sobre el eje en movimiento cae sobre una plataforma que registra el tiempo que ha estado sobre el eje y la velocidad a la que giraba (figura 15).

Cada animal fue sometido a esta prueba siete veces a lo largo del día de estudio y fueron repetidas las pruebas en 4 ocasiones durante 4 semanas. Para el estudio estadístico se tomó el mejor intento conseguido de cada una de estas 4 repeticiones. Durante la realización de esta prueba de comportamiento el observador era ciego respecto a la clasificación de cada animal dentro de los diversos grupos de estudio.



Figura 15.- Rotarod. Imagen de varios animales realizando la prueba de comportamiento de rotarod.

6 Análisis histológico

A continuación describimos todos los procesos seguidos para realizar el análisis histológico de las muestras. Se describe desde el sacrificio de los animales hasta los diferentes métodos empleados para la identificación de los eventos de fusión y el trazado de las células trasplantadas.

6.1 Obtención y preparación del tejido

6.1.1 Sacrificio y disección

Los animales fueron sacrificados a distintas edades dependiendo del tipo de neuropatología que presentaban. Todos los animales fueron anestesiados previamente a su sacrificio con una mezcla de fármacos que cumplen las normas del comité de ética del animalario del CIPF y del CABIMER. Para ello usamos un agente disociativo, un relajante muscular y un fármaco para prevenir la bradicardia junto con un agente analgésico (ver tabla 4). El efecto de la anestesia se comprobó por la ausencia de reflejo palpebral.

Componente	Función	Presentación comercial	Dosis (mg/Kg)	Administración
Ketamina	Disociante	Imalgene [®] 1000 (Merial)	50	Inyección Intraperitoneal
Diacepán	Relajante muscular	Valium [®] 10 (Roche Farma)	5	Inyección Intraperitoneal
Atropina	Previene bradicardia	Atropina (BBraun)	1	Inyección Intraperitoneal
Buprenorfina	Analgésico	Buprex [®] inyectable 0.3mg(Merck & co.)	0,1	Inyección Intraperitoneal

Tabla 4.- Tabla de fármacos usados para la anestesia animal. En la tabla se especifica la función de cada fármaco, su presentación comercial, dosis y vía de administración.

A continuación, se inicia el proceso de perfusión del fijador para que los tejidos se fijen. La fijación 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. No existe un método de fijación ideal, por lo cual debe adecuarse a cada tejido y/o estudio. Es un paso rutinario, pero fundamental, para una satisfactoria preservación y análisis *post mortem*. En nuestro caso optamos por el proceso de perfusión transcardiaca con solución fijadora ya que proporciona una fijación uniforme de alta calidad.

La solución fijadora varió dependiendo del uso que quisimos darle a dicho tejido. Habitualmente usábamos una solución de Paraformaldehído al 4% que

conserva la estructura celular y tisular a gran escala en el CNS, pero si el tejido iba a ser usado para realizar la técnica histológica del X-Gal (para identificar eventos de fusión) utilizamos una solución que combina paraformaldehído al 2% y glutaraldehído al 0,25%, ya que esta solución permite mantener activa la enzima de la β -galactosidasa necesaria para esta técnica histoquímica.

Todo el proceso de perfusión, por la alta toxicidad del PFA, se llevó a cabo dentro la cabina de extracción de gases (Flores Valles S.A., España). 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 desplazó las costillas dejando expuesto el corazón. A partir de este momento el animal ya no puede respirar, pero el corazón sigue funcionando por un corto periodo. Es importante empezar el proceso de fijación antes de la abolición del batido cardiaco, 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 aorta ascendente. Con unas tijeras de microdissección se realizó una pequeña abertura en la aurícula derecha de forma que se evita el exceso cuando introduzcamos la solución fijadora, permitiendo la salida de la circulación de 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-Palmer, 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. Nosotros usamos 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 procede a la extracción de los diversos órganos. Para todos los experimentos se extrajo el cerebro e hígado, y en los animales atáxicos se extrajo también el músculo. Estas muestras fueron depositadas en solución fijadora durante toda la noche para la solución de paraformaldehído al 4% y durante 20 minutos para la solución fijadora que contiene glutaraldehído. Transcurrido este tiempo fueron depositadas en tampón fosfato (PB 0.1M, pH 7.4) con azida sódica al 0.05% hasta que fueron analizadas.

En el caso de los animales que presentaban inflamación se aislaron la sangre, médula ósea, timo y bazo, previamente a la fijación. Para ello, una vez anestesiado el animal se procedió a la separación de las extremidades posteriores; las células de

médula ósea fueron aisladas como ya se explicó anteriormente (Sección 4.2 de materiales y métodos). Cuando el bazo y timo quedan expuestos son extirpados y colocados en tampón fosfato hasta que fueron procesados. Para el caso de la sangre se realizó una inyección de 5ml de tampón fosfato con la bomba de perfusión previa al paso de solución fijadora, de forma que la sangre fue recogida a su salida por la aurícula derecha con ayuda de una jeringa heparinizada. Estos tejidos fueron disgregados y sus células analizadas por citometría de flujo (sección 4.3.4.2.1.1 de materiales y métodos).

6.2 Seccionado del tejido

Para la visualización de los tejidos por microscopio debemos obtener secciones muy finas, adecuadas a las características de estos aparatos. Hay varias técnicas de corte que se adecuan dependiendo del grosor de las secciones que queramos obtener o de la naturaleza del tejido a diseccionar.

6.2.1 Corte en vibrátomo

El vibrátomo (VT1000S, Leica Microsystems, Alemania) se usó para obtener secciones en flotación de 50 μm en el caso de los hígados, telencéfalo y cerebelos. Los órganos fueron previamente lavados en PB (0.1M, pH 7.4) para eliminar los restos de fijador. Las secciones se depositaron formando 6 series en el caso de hígado y telencéfalo y 3 series en el caso de cerebelo, separadas entre ellas por 300 y 150 μm respectivamente.

6.2.2 Corte en micrótomos de congelación

En el caso de los animales que presentaban ataxia los telencéfalos fueron cortados en un micrótomos de congelación a 40 μm de grosor y a una temperatura que oscilaba entre -23°C y -15°C . Las secciones se recogieron en flotación en PB (0.1M, pH 7.4) y se distribuyeron en series consecutivas. A continuación se lavaron tres veces durante 10 minutos cada lavado en PB, para eliminar los restos de fijador y sacarosa. Finalmente, las series que no se utilizaban en un breve periodo de tiempo se conservaron a 4°C en azida sódica 0,05% en PB.

6.2.3 Corte en criostato

El criostato se usó para las muestras de tejido muscular y se obtuvieron 10 series con secciones de 14-16 μm . Las muestras que van a ser seccionadas con este instrumento han de ser previamente congeladas, para lo cual se ha de crioprotger el tejido mediante inmersión en sacarosa al 30% en PB durante toda la noche. A continuación se congelaron las muestra encastrándolas con un medio específico (Tissue-Tek; Sakura, Japón) para este tipo de corte. Las secciones se obtuvieron a

una temperatura de -20 °C y fueron depositadas sobre un portaobjetos (76x26mm, Normax, Portugal). Los portaobjetos se almacenaron a -30 °C hasta su procesamiento.

6.3 Técnica de tinción histológica

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 llamadas colorantes. Gracias a la fluorescencia intrínseca de las células de los donantes hemos podido hacer un seguimiento de estas después del trasplante. Además, usando diversos tipos de tinciones histológicas hemos podido observar los eventos de fusión y los diferentes tipos celulares que los presentaban.

6.3.1 Histoquímica del X-Gal

Como ya hemos explicado con anterioridad, cuando una célula de un animal perteneciente a la cepa R26R se fusiona con una célula de un animal de la cepa Cre se produce la expresión de la enzima β -galactosidasa. Su actividad enzimática actúa sobre el sustrato X-Gal, de forma que se hidroliza el enlace O-glucosídico de la lactosa a galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroindol. Al separarse de la β -galactosa, el 5-bromo-4-cloro-3-indol dimeriza espontáneamente formando un compuesto azul insoluble (Figura 16).

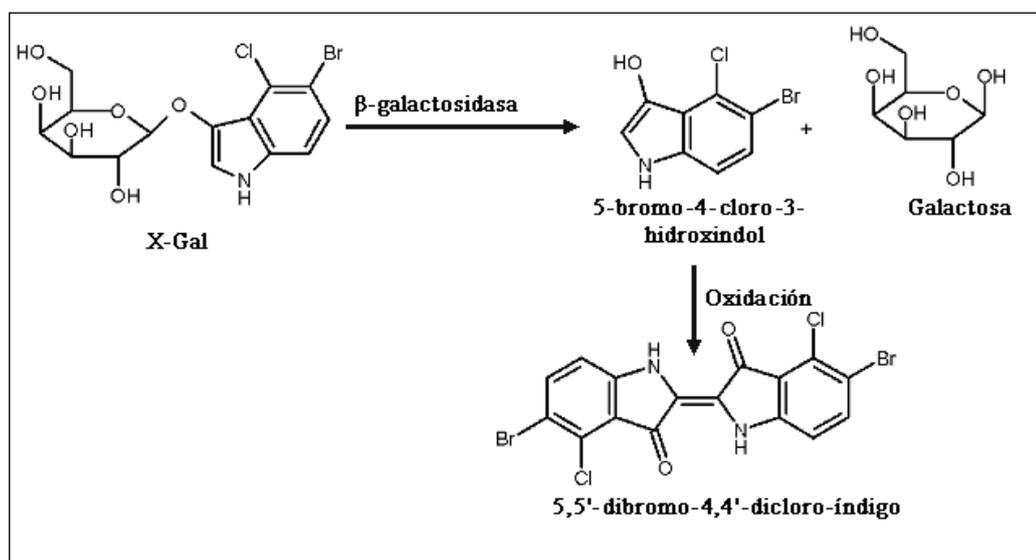


Figura 16.- Esquema de las reacciones producidas en la técnica histoquímica del X-Gal. La β -galactosidasa hidroliza el enlace O-glucosídico del X-Gal (5-Bromo-4-Cloro-3-Indol- β -Dgalactósido). Al separarse de la β -galactosa, se produce la dimerización espontánea del 5-Bromo-4-Cloro-3-Indol y se genera un compuesto, el 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-indigo, que es de color azul y precipita.

Para que esta actividad enzimática se mantenga el tejido debe ser extraído siguiendo unas consideraciones específicas, que ya han sido detalladas en el sección 6.1 de materiales y métodos. Una vez obtenido el tejido y seccionado con el vibrátomo, las muestras fueron lavadas en PB. A continuación se mantuvieron durante toda la noche en la solución de tinción del X-gal (Ver apéndice) a 37 °C. Como algunos componentes de esta solución son fotosensibles, las muestras fueron mantenidas en oscuridad. A la mañana siguiente se realizaron tres lavados de cinco minutos cada uno en PB a temperatura ambiente y las muestras ya estaban disponibles para ser usadas en otra tinción o para ser montadas sobre un portaobjetos (76x26mm, Normax, Portugal), cubiertas con un medio de montaje acuoso para ser observadas al microscopio.

6.3.1.1 Controles de especificidad

Para comprobar la especificidad de la técnica histoquímica del X-Gal, y la ausencia de expresión basal de la enzima β -galactosidasa en ausencia de la recombinasa Cre, se revelaron secciones de tejido de animales R26R en los que no se había realizado ningún tipo de trasplante. En ninguna sección de este tipo se detectaron elementos positivos. Asimismo, en todos los animales trasplantados y procesados de esta manera, se emplearon secciones de su hígado como control positivo, ya que la presencia de eventos de fusión en el hígado es bastante abundante. Por último, hay que tener en cuenta que tanto el ferrocianuro como el ferricianuro pueden formar precipitados de color azul como consecuencia de su reacción con iones de hierro libres. Por ello, se evitó la utilización de material metálico durante la manipulación de las secciones en el tiempo que duraba la reacción.

6.3.2 Tinción de Nissl

La tinción de Nissl se basa en el uso de colorantes acidófilos que se unen al ácido ribonucleico contenido en los ribosomas, tiñendo el núcleo, nucleolo y los ribosomas del retículo endoplasmático rugoso. Cuando una célula muere por necrosis se sabe que compacta su núcleo, de forma que gracias a esta tinción podemos diferenciar los núcleos picnóticos (más pequeños, redondeados y con una intensa tinción), correspondientes a las células muertas, de los núcleos normales (de mayor tamaño y con una tinción menos intensa) y poder así identificar las zonas de lesión tras un proceso isquémico.

Esta tinción se realizó con los cortes montados en portaobjetos (76x26mm, Normax, Portugal) que habían permanecido 15 minutos en la campana de vacío. Las secciones de 40-50 μ m de grosor fueron sumergidas durante 3 minutos en la solución colorante de violeta de cresilo al 2% (Sigma-Aldrich, EE.UU) (Ver apéndice). Una vez

finalizado el tiempo de exposición al colorante se realizó un aclarado con agua destilada durante unos segundos. Inmediatamente después procedimos a deshidratar las secciones. Para ello, se realizaron baños de un minuto de duración en una selección de alcoholes de graduación creciente (70%, 96% y 100%). Por último se dio un baño de tres minutos en xilol (Panreac, España) y se cubrieron con medio de montaje no acuoso Eukitt (Panreac, España).

6.3.3 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 1º-anticuerpo 2º así formado permite ser localizado e identificado *in situ* en las muestras tisulares o citológicas. Los anticuerpos utilizados en los ensayos de detección Inmunohistoquímica se detallan en el apéndice, en las tablas 15 y 16..

Esta técnica puede usarse para identificar varios antígenos simultáneamente, pero para ello han de usarse anticuerpos primarios que estén hechos en diferentes huéspedes, ya que sino el mismo anticuerpo secundario marcaría diferentes anticuerpos primarios. A la hora de usar los anticuerpos secundarios hay que usar diferentes marcajes para cada uno.

6.3.3.1 Técnica de inmunoperoxidasa

La inmunohistoquímica por actividad peroxidásica se basa en relevar el antígeno de interés por una reacción enzimática, conjugada al anticuerpo secundario, que hace precipitar un cromóforo que puede visualizarse al microscopio óptico. En este caso la actividad enzimática corresponde a una peroxidasa. Para la realización de esta técnica usamos cortes en flotación o montados sobre portaobjetos (76x26mm, Normax, Portugal), tanto cortados con vibrátomo como con criotomo de congelación. Las muestras de criostato han de dejarse atemperar durante 20 minutos y luego son colocados durante 10 minutos en la campana de vacío para mejorar la adhesión del tejido al porta.

Esta tinción comenzó con el restablecimiento de la inmunoreactividad tisular, para ello realizamos tres lavados de 5 minutos en PB a temperatura ambiente y con agitación. De esta forma eliminaremos los restos de azida sódica. A continuación procedimos al bloqueo de la actividad peroxidasa endógena del tejido. Las muestras fueron sumergidas durante 15 minutos a temperatura ambiente en solución acuosa de 10% de metanol (Panreac, España) y 3% H₂O₂ (Panreac, España). Si no realizáramos este bloqueo tendríamos señal inespecífica debido a la actividad de las peroxidasas endógenas de los tejidos.

Continuamos con el 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, del inglés *Normal goat serum*) (Gibco-Invitrogen, EE.UU) y un 0.01% Tritón X-100 (Panreac, España). En el caso de que alguno de los anticuerpos primarios este hecho en cabra, usamos suero normal de caballo (Gibco-Invitrogen, EE.UU). El siguiente paso fue el marcaje del antígeno con el anticuerpo primario. 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 el anticuerpo 2º diluido en tampón bloqueo. El anticuerpo 2º usado en este caso es biotinilado, es decir, unido covalentemente a una pequeña proteína, biotina, que servirá como el sitio de anclaje para amplificadores de señal (Véase tablas 15 y 16 en el apéndice). 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 ha unido al anticuerpo primario.

Posteriormente, se procedió a una incubación de 60 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad en una solución amplificadora de señal, el complejo ABC (Complejo de Avidina-Biotina-peroxidasa) (Vector Laboratories, EE.UU). Esta solución debe prepararse 15 minutos antes de ser usada para dar tiempo a la formación de puentes avidina-biotina, ya que la biotina es un homotetramero que permite varias uniones de avidina.

El último paso es el revelado de la reacción, de forma que obtengamos un precipitado que nosotros podamos observar. Para este revelado hemos usado dos compuestos diferentes:

- Revelado con tetracloruro de diaminobenzidina (DAB, del inglés *3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride*) (Sigma-Aldrich, EE.UU): al 0.3% + 0.01% de peróxido de hidrogeno en PB aproximadamente 10 min (según el tono de coloración adquirido) a RT y en oscuridad. El DAB es el cromógeno más popular de la actividad peroxidásica. En esta reacción el agua oxigenada actúa como un sustrato enzimático y el DAB es el donante de electrones que como resultado lleva a la oxidación del DAB que forma un precipitado coloreado marrón e insoluble.
- Revelado con tiramidas (Invitrogen, EEUU): las tiramidas son moléculas que, una vez activadas por una molécula de peroxidasa se unen de forma covalente a la proteína más cercana disponible. Este revelado se produce mediante una incubación de 10 minutos en oscuridad a temperatura ambiente con las tiramidas disueltas a la concentración correspondiente en tampón de amplificación (Ver Apéndice). La síntesis de las tiramidas se realizó siguiendo las instrucciones del TSA kit de Invitrogen.

Finalmente se realizaron tres lavados en PB para eliminar los restos de cromógeno en exceso y se pudo proceder a montar (para el caso de los cortes en flotación) y cubrir las muestras. Cuando usamos DAB los cortes se deben deshidratar previamente a ser cubiertos, para ello los sumergimos durante un minuto en alcoholes de graduación creciente (70%, 96% y 100% (v/v)), tres minutos en xilol (Panreac, España) y en seguida se cubrieron con el medio de montaje, Eukitt (Panreac, España). Si usamos las tiramidas para el revelado debemos usar un medio de montaje acuoso. . Nosotros usamos Mowiol (Carlo Erba reagents, España), en base de alcohol polivinílico que en combinación con un fuerte antioxidante como es 1,4-Diazabicyclooctano (DABCO, del inglés *1,4-diazabicyclo [2.2.2] octane*) que es eficiente para prolongar la persistencia de la fluorescencia en el tiempo. También se puede preparar con un medio de montaje que incluye DAPI (ProLong Gold antifade with DAPI, Molecular Probes-Invitrogen, EE.UU:).

6.3.3.2 Técnica de inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia se caracteriza porque podemos localizar el antígeno gracias a que el anticuerpo secundario va marcado directamente con un cromógeno fluorescente. Durante la realización de esta tesis se ha realizado inmunofluorescencia sobre cortes en flotación o montados sobre portaobjetos y con diferentes grosores, aunque en todos los casos el protocolo usado fue el mismo.

Esta tinción comenzó con el restablecimiento de la inmunoreactividad tisular, para ello realizamos tres lavados de 5 minutos en PB a temperatura ambiente y con agitación. De esta forma eliminaremos los restos de azida sódica. Continuó con el 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% de NGS (Gibco-Invitrogen, EE.UU) y un 0.01% Tritón X-100 (Panreac, España). En el caso de que alguno de los anticuerpos este hecho en cabra, usaremos suero normal de caballo (Gibco-Invitrogen, EE.UU). El siguiente paso es el marcaje del antígeno con el anticuerpo primario. 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 el anticuerpo 2º diluido en tampón bloqueo. El anticuerpo 2º usado en este caso está marcado directamente con el fluoróforo (Ver tabla 16 en el apéndice). 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 ha unido al anticuerpo primario y puede ser cubierto con un medio de montaje acuoso, en nuestro caso Mowiol (Carlo Erba reagents, España).

6.3.4 Inmunocitoquímica

Como ya hemos explicado con anterioridad, algunos tejidos fueron disgregados y sus células son analizadas por citometría. Parte de estas células fueron caracterizadas por Inmunohistoquímica, es decir, usamos anticuerpos para identificar antígenos específicos de algunos tipos celulares y poder así diferenciarlas por citometría.

Hemos usado anticuerpos primario ya marcados con el fluoróforo (Inmunohistoquímica directa) o anticuerpos primarios sin marcar y un secundario marcado (Inmunohistoquímica indirecta). En ambos casos las células estaban si fijar y en flotación. Toda la técnica se realizó una vez los eritrocitos habían sido lisados y lavadas las células (Sección 3.3.3.2.1 de materiales y métodos), solo que los lavados los realizamos con una solución de albúmina (BSA, del ingles *Bovine serum albumine*) (Sigma-aldrich, EEUU.) al 3% en PBS. A continuación añadimos el anticuerpo primario y lo dejamos 30 minutos a 4 °C en oscuridad. Este anticuerpo fue disuelto en la misma solución de BSA al 3%. En la Inmunohistoquímica directa, pasado este tiempo

realizamos dos lavados con PBS y fueron depositadas en el tampón de citometría (Ver apéndice). Si estábamos realizando una Inmunohistoquímica indirecta usamos la solución de BSA para los lavados y añadimos el anticuerpo secundario durante 15 minutos. Para finalizar, realizamos dos lavados con PBS y resuspendíamos en el tampón de citometría (Ver apéndice). Todos los pasos fueron llevados a cabo en oscuridad y en hielo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1 Ataxia cereberal

Como comentamos en la introducción, las CMO presentan las capacidades de transdiferenciarse y fusionarse con diversos tipos celulares, entre los que se encuentran las neuronas de Purkinje (Alvarez-Dolado et al. 2003). Esta capacidad ha hecho que la comunidad científica plantee estudios de trasplantes en modelos animales de enfermedades neurodegenerativas que están asociadas a una pérdida de neuronas de Purkinje (Bae et al. 2005). En nuestro caso quisimos comprobar si realizando trasplantes de médula ósea a nuestro modelo de degeneración progresiva éramos capaces de frenar o aminorar la sintomatología atáxica asociada a la neurodegeneración de las neuronas de Purkinje.

Nº Animales	Genotipo	Tratamiento	Nº Células Trasplantadas	Edad sacrificio	% quimerismo (Media ± ESM)
4	+/+	TMO P20	7.5x10 ⁶	P60	59.5±2.4
4	+/+	TMO P20	7.5x10 ⁶	P110	65.7±2.9
4	+/+	TMO P20	7.5x10 ⁶	P150	74.8±1.7
4	Pcd/pcd	NT	---	P60	---
4	Pcd/pcd	NT	---	P110	---
4	Pcd/pcd	NT	---	P150	---
4	Pcd/pcd	TMO P20	7.5x10 ⁶	P60	58.2±0.9
4	Pcd/pcd	TMO P20	7.5x10 ⁶	P110	64.8±1.8
4	Pcd/pcd	TMO P20	7.5x10 ⁶	P150	72.7±4.9

Tabla 5.- Resumen de los diferentes animales y los procesos experimentales realizados. Genotipo: +/+ animal silvestre; pcd/pcd animal PCD. Tratamiento: TMO P20, trasplante de médula ósea a la edad de 20 días; NT, no tratado. La edad de sacrificio viene indicada en días.

Para analizar el efecto de la contribución de las CMO durante diferentes estadios neurodegenerativos realizamos el trasplante de médula ósea silvestre a ratones normales y PCD de 20 días de edad, momento en que la degeneración de las neuronas de Purkinje acaba de iniciarse en los ratones PCD. Tras el trasplante, los animales fueron sacrificados a tres edades diferentes: 60, 110 y 150 días de edad. A la

edad de 60 días las neuronas de Purkinje han desaparecido completamente y está iniciándose la degeneración neuronal en otras áreas cerebrales. En las otras dos edades la muerte de las neuronas de Purkinje prácticamente se ha completado y se inician la degeneración en otras regiones como los bulbos olfativos. En la tabla 5 se muestra un resumen de los procedimientos llevados a cabo en los animales trasplantados.

Mediante citometría de flujo de la sangre periférica de los animal trasplantados comprobamos que todos presentaban un grado de quimerismo que oscilaba entre el 58% y el 85%. (Figura 17).

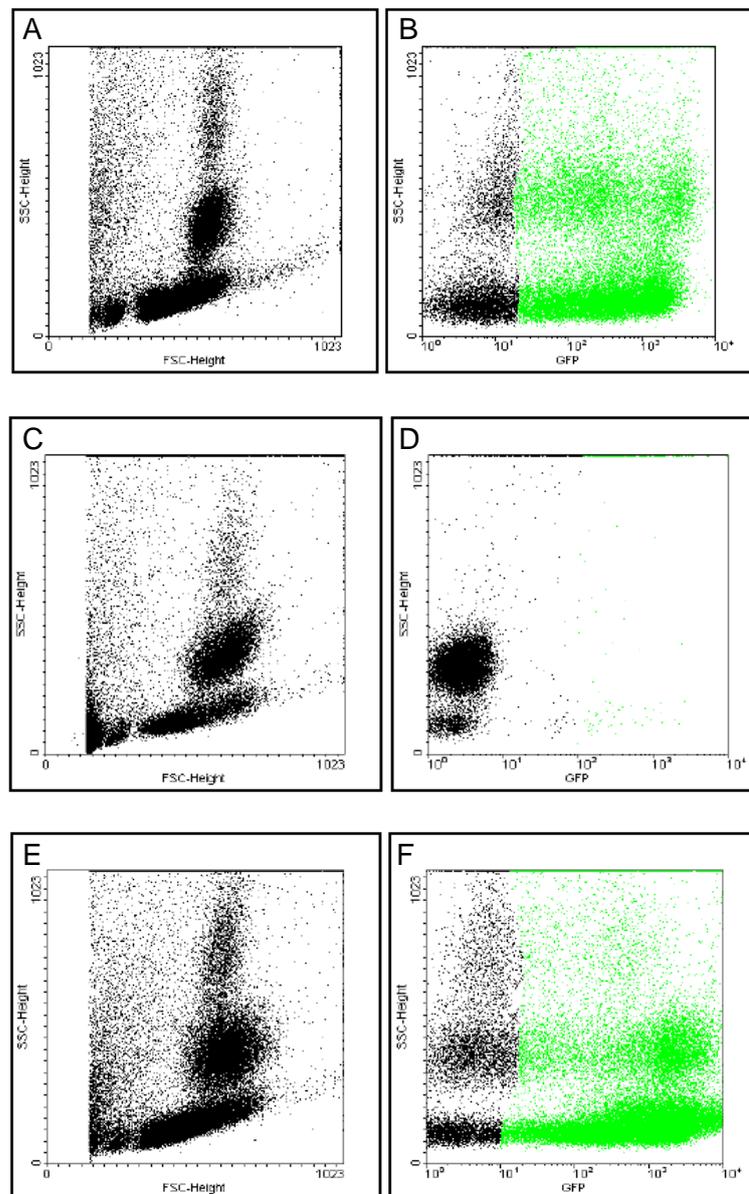


Figura 17.- Análisis por citometría de flujo de la sangre periférica. En las figuras A, C, E se representa el tamaño celular (FSC) frente a la complejidad celular (SSC). En las figuras B, D, F se muestra el grado de fluorescencia GFP que presentan estas células. Las figuras A y B corresponde a una animal GFP (control positivo), C y D corresponden a un animal silvestre

(control negativo), E y F pertenecen a un animal trasplantado con médula procedente de un animal GFP.

El análisis de la incorporación de células del donante en el huésped demostró que tras cuatro semanas no había diferencias entre los diversos grupos trasplantados ni con el animal donante (test t Student; $p \geq 0.05$). Esto concuerda con lo demostrado anteriormente (Hayakawa et al. 2003) y nos indica que no hay interferencias asociadas a la mutación *pcd_{1J}* en el proceso de incorporación de la médula ósea trasplantada. Así mismo, es importante resaltar que esta incorporación tampoco se vio afectada por el estado de progresión en que se encuentra el proceso neurodegenerativo (Mullen et al. 1976).

No encontramos diferencias entre los animales trasplantados con 5 o 7,5 millones de células, lo cual nos indica que 5 millones son suficientes para la restitución de la médula irradiada (Nygren et al. 2008). Hay estudios que demuestran que a partir de una única célula madre hematopoyética se puede restaurar todo el sistema hematopoyético de un animal irradiado (Smith et al. 1991).

1.1 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 diferentes grupos experimentales: PCD trasplantado con MO wt (*Heterotrasplante*), PCD sin trasplante y Control (*homotrasplante*).

Se realizaron diferentes pruebas para evaluar la coordinación motora, como son el campo abierto, rotarod, velocidad media de desplazamiento y footprinting. Estas pruebas se llevaron a cabo para observar el efecto funcional del trasplante de médula ósea wt sobre los animales mutantes.

1.1.1 Campo abierto

Como ya se explicó en la sección 5.1 de materiales y métodos, esta prueba nos proporciona información sobre la capacidad motora de los animales, su comportamiento exploratorio y la reactividad emocional.

De los diferentes parámetros analizados, los datos que más información nos proporcionan sobre la locomoción son los *cruces completos* y *medios cruces* (Ver materiales y métodos), así como la velocidad media de desplazamiento. Estos datos se recogen en las tablas 6 y 7. El valor medio de las diferentes pruebas a las que fueron sometidos los animales se muestra en la última columna de cada tabla.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en el campo abierto mostró,

como era de esperar, diferencias altamente significativas entre el grupo Control y el grupo PCD sin trasplantar (*U de Mann-Whitney*; $P < 0,01$) tanto para los *cruces completos* como para los *medios cruces*, observándose un descenso del 40% en el número de *cruces completos* y un aumento del 188% en el número de *medios cruces* por parte del grupo PCD.

Grupo/ Prueba	P35	P50	P65	P80	P95	P110	P125	Media
Control	75,2 ± 4,0	67,5 ± 3,5	71,7 ± 9,8	74,5 ± 9,5	79,7 ± 3,4	83,5 ± 17,6	85,7 ± 7,3	76,8 ± 3,2
PCD Trasplante	91,0 ± 5,0	102,5 ± 9,7	60,7 ± 12,8	66,7 ± 7,0	91,0 ± 18,4	45,7 ± 8,9	66,2 ± 16,2	74,8 ± 5,4
PCD sin trasplante	69,5 ± 17,6	78,2 ± 20,9	62,5 ± 17,9	45,5 ± 17,8	30,7 ± 10,9	15,7 ± 5,3	19,5 ± 5,7	45,9 ± 6,6

Tabla 6.- Valores medios (\pm ESM) de cruces completos de la prueba de campo abierto.

Grupo/ Prueba	P35	P50	P65	P80	P95	P110	P125	Media
Control	8,7 ± 0,4	12,5 ± 2,5	7,7 ± 0,8	3,0 ± 1,3	2,5 ± 0,6	5,2 ± 1,3	2,0 ± 0,4	5,9 ± 0,8
PCD Trasplante	24,2 ± 5,2	21,2 ± 2,4	13,2 ± 4,0	7,0 ± 1,5	11,0 ± 2,7	4,7 ± 1,0	6,7 ± 1,7	12,6 ± 1,6
PCD sin trasplante	29,5 ± 5,1	31,5 ± 3,5	20 ± 4,4	10,2 ± 2,2	12,0 ± 3,8	7,0 ± 1,9	9,0 ± 1,5	17 ± 2,1

Tabla 7.- Valores medios (\pm ESM) de medios cruces de la prueba de campo abierto

Interesantemente, los animales PCD trasplantados mostraron valores similares a los de los animales Control. Las diferencias en el número de *cruces completos* entre los grupos PCD trasplantado y PCD sin trasplantar también fueron estadísticamente significativas (*U de Mann-Whitney*; $P < 0,01$), mostrando un incremento del 38% en el grupo PCD trasplantado respecto al PCD no trasplantado.

Para los *medios cruces* encontramos diferencias entre los animales Control y el grupo PCD trasplantados (*U de Mann-Whitney*; $P < 0,01$), observando un porcentaje de incremento del 113% en el grupo PCD trasplantados, mientras que encontramos un 35% de incremento no significativo entre los grupos PCD con y sin trasplante. Estos

datos se presentan en la figura 18.

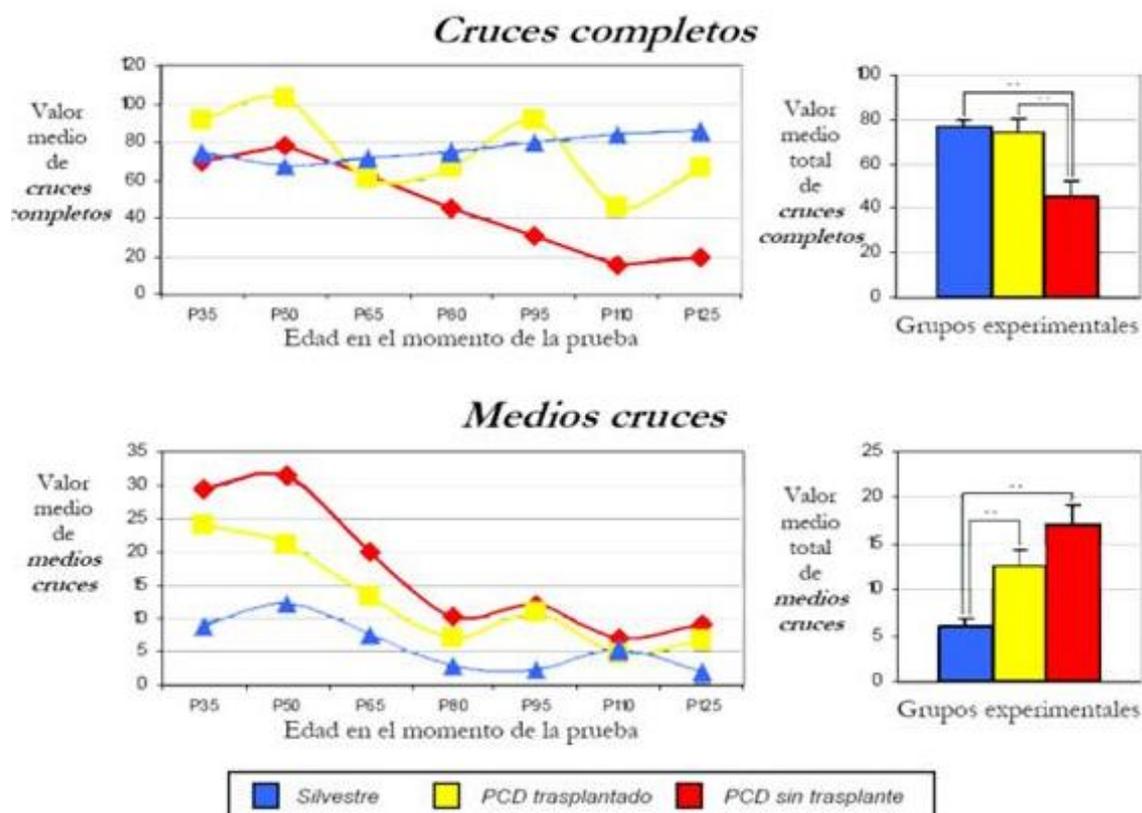


Figura 18.- Representación de los datos relacionados con la capacidad de movimiento obtenidos de la prueba de campo abierto. En la parte superior se presentan los datos de cruces completos. A la izquierda, los resultados de cada una de las pruebas y, a la derecha, los resultados agrupados para cada grupo experimental. Se encontraron diferencias altamente significativas (U de Mann-Whitney; $P < 0,01$) entre el grupo PCD sin trasplante y los otros dos grupos. En la parte inferior se presentan los datos de medios cruces. A la izquierda, los resultados de cada una de las pruebas y, a la derecha, los resultados agrupados para cada grupo experimental. Se encontraron diferencias altamente significativas (U de Mann-Whitney; $P < 0,01$) entre el grupo de animales Silvestre y los dos grupos de PCD, independientemente de que estuviesen trasplantados o no.

Estos dos parámetros son importantes a la hora de analizar la capacidad motora de los animales, dado que los *cruces completos* son consecuencia de un desplazamiento estable, continuo y en una misma dirección característico de animales sanos, mientras que los *medios cruces* se produce cuando el animal presenta un desplazamiento inestable, discontinuo y con cambios frecuentes de dirección. Por lo tanto un animal sano presentaría un elevado número de *cruces completos*, frente a un bajo número de *medios cruces*, tal y como observamos en nuestro grupo Control. Sin embargo, un animal atáxico presentaría un mayor número de *medios cruces* frente al de *cruces completos*, como ocurre en nuestro grupo PCD sin trasplante. Nuestro grupo PCD trasplantado con médula ósea WT presentó valores similares a los del grupo

Control en cuanto al número de *cruces completos*, y más alejados de los obtenidos por el grupo PCD sin trasplantar.

El número de *medios cruces* siempre ha sido mayor en los animales pertenecientes a los grupos PCD frente al grupo Control, ya que el grado de ataxia que presentan hace más inestable su locomoción y cambian constantemente de dirección. Como en el caso de los *cruces completos*, los animales PDC trasplantados presentan valores más similares al grupo Control que al grupo PCD sin trasplantar.

En general, podemos decir que el trasplante de medula ósea WT en animales mutantes PCD tienen un efecto positivo sobre su capacidad motora. En apartados posteriores realizaremos un análisis histológico de estos mismos animales. La prueba de campo abierto también nos proporciona datos relacionados con la reactividad emocional y el nivel de estrés que presentan estos animales al ser sometidos a dicha prueba. Estos datos nos lo proporcionó la medición de los siguientes parámetros: *limpiezas, alzadas y defecaciones* (Sección 4.1 de materiales y métodos). Estos datos se presentan en las tablas 8, 9 y 10; y podemos encontrar el análisis estadístico en la figura 14. Las alzadas son especialmente importantes en este contexto, puesto que requieren de un equilibrio y fuerza adecuados para realizarse. Un animal con alteraciones motoras puede tener seriamente comprometido este parámetro.

Grupo/ Prueba	P35	P50	P65	P80	P95	P110	P125	Media
Silvestre	3,5 ± 0,6	2,2 ± 0,8	2,0 ± 0,7	3,5 ± 0,8	3,7 ± 0,9	4,2 ± 1,0	4,0 ± 1,0	3,3 ± 0,5
PCD Trasplante	4,5 ± 1,0	2,7 ± 1,2	2,5 ± 0,5	2,2 ± 0,9	2,2 ± 0,6	4,2 ± 1,1	4,2 ± 0,6	3,2 ± 0,7
PCD sin trasplante	2,2 ± 0,4	1,2 ± 0,4	1,0 ± 0,4	1,5 ± 0,6	2,5 ± 1,5	1,2 ± 0,6	1,7 ± 0,8	1,6 ± 0,8

Tabla 8.- Valores medios (\pm ESM) de limpiezas de la prueba de campo abierto

Grupo/ Prueba	P35	P50	P65	P80	P95	P110	P125	Media
Silvestre	20,5 ± 1,1	24,0 ± 4,0	28,2 ± 2,0	19,5 ± 2,5	27,7 ± 1,6	21,0 ± 2,1	23 ± 2,5	23,4 ± 1,4
PCD Trasplante	20,0 ± 3,6	14,5 ± 3,1	8,0 ± 1,4	14,2 ± 3,3	11,7 ± 0,2	7,0 ± 1,3	9,0 ± 2,2	12,0 ± 2,3
PCD sin trasplante	4,0 ± 1,3	6,5 ± 3,0	6,0 ± 3,6	7,7 ± 3,8	6,0 ± 2,1	2,7 ± 1,2	5,7 ± 2,2	5,5 ± 3,1

Tabla 9.- Valores medios (\pm ESM) de alzadas de la prueba de campo abierto.

Grupo/ Prueba	P35	P50	P65	P80	P95	P110	P125	Media
Silvestre	1,5 \pm 0,2	2,2 \pm 0,8	2,0 \pm 1,0	2,2 \pm 0,4	2,7 \pm 1,1	2,2 \pm 1,3	2,7 \pm 0,9	2,2 \pm 0,7
PCD Trasplante	1,5 \pm 0,6	3,0 \pm 1,4	1,7 \pm 0,4	1,7 \pm 0,8	3,5 \pm 0,8	3,2 \pm 1,0	3,7 \pm 0,8	2,6 \pm 1,0
PCD sin trasplante	1,0 \pm 0,4	3,0 \pm 0	2,2 \pm 0,8	3,0 \pm 0,9	3,7 \pm 1,1	2,7 \pm 1,3	3,2 \pm 1,4	2,7 \pm 1,0

Tabla 10.- Valores medios (\pm ESM) de defecaciones de la prueba de campo abierto

El análisis estadístico de las *limpiezas* no mostró diferencias entre el grupo Silvestre y PCD trasplantado, indicando que ambos grupos mostraban una reactividad emocional y de movimiento similar. Por el contrario, sí encontramos diferencias estadísticamente significativas (*Bonferroni*; $P < 0,01$) entre estos dos grupos y los animales pertenecientes al grupo PCD sin trasplantar.

En cuanto al número de *alzadas* encontramos diferencias estadísticamente significativas (*Bonferroni*; $P < 0,01$) entre los tres grupos. Los animales atáxicos PCD presentaban una frecuencia de alzadas 4 veces inferior a los animales control. Interesantemente, los animales PCD con trasplante fueron capaces de alzarse mejor que los animales sin tratamiento, presentando una frecuencia el doble que estos, aunque sin llegar a los niveles del grupo de animales control. Para el número de defecaciones no encontramos diferencias estadísticas significativas entre ninguno de los grupos, lo que nos indica que los tres grupos estuvieron sometidos a similares niveles de estrés. Estos datos se muestran en la figura 19.

Como conclusiones respecto a estas variantes hay que indicar que es difícil clasificarlas como componente emocional o nivel de estrés únicamente, ya que también está altamente relacionado con la capacidad motora que presentan dichos animales. Es decir, que un animal realice un número determinado de limpiezas y alzadas no está relacionado únicamente con su estado emocional, sino que depende también de la capacidad física de este y de que sea capaz de alzarse sobre sus patas traseras y mantenerse estable en esa posición durante unos segundos. Este componente físico dificulta mucho el análisis de los resultados, ya que los animales de los grupos PCD probablemente tengan esta capacidad alterada debido al déficit motor producido por la mutación. El hecho de que no encontremos diferencias en el número de defecaciones apoya el componente motor más que emocional a la hora de explicar

las diferencias en alzadas y limpiezas observadas en los diferentes grupos. En su conjunto, los datos obtenidos en el campo abierto muestran una clara mejoría de la locomoción y movimiento en los animales PCD sometidos al tratamiento con células de médula ósea wt, si bien esta recuperación fue parcial y en ningún caso logro recuperar los niveles normales de actividad motora del grupo control.

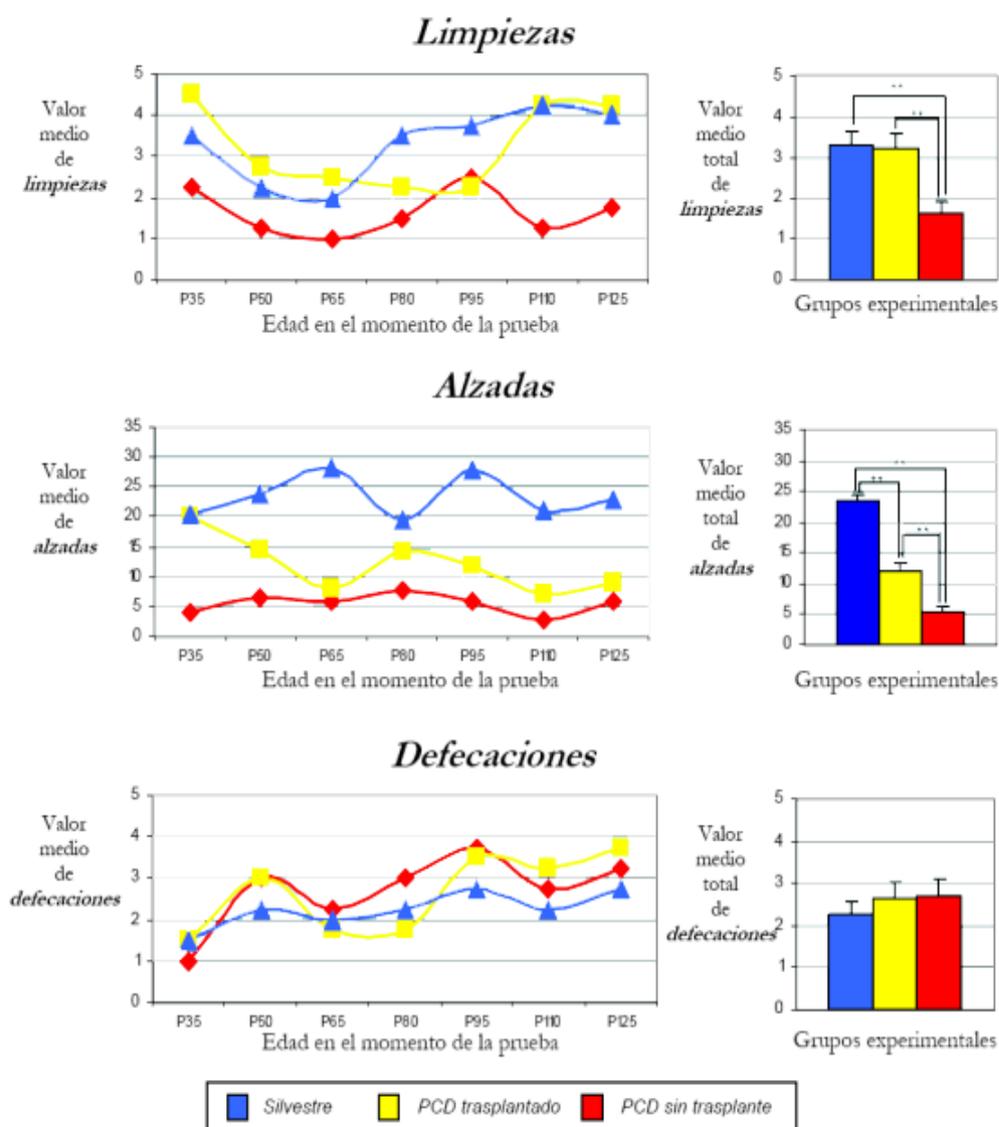


Figura 19.- Representación de los datos de reactividad emocional obtenidos de la prueba de campo abierto de los 3 grupos experimentales. En la parte superior se presentan los datos de limpiezas; en la central, los de alzadas y en la inferior, los de defecaciones. En los tres casos se representan, a la izquierda, los resultados obtenidos de cada una de las pruebas y, a la derecha, los resultados totales tomados en conjunto de cada uno de los 3 grupos experimentales. El análisis estadístico reveló diferencias altamente significativas (Bonferroni; $P < 0,01$), en el caso de las limpiezas, entre los PCD sin trasplante y los otros 2 grupos; y en el caso de las alzadas, entre todos los grupos. No se encontraron diferencias estadísticas para el caso de las defecaciones entre ninguno de los grupos.

1.1.2 Velocidad media de desplazamiento

Como ya explicamos en materiales y métodos, en esta prueba se midió el tiempo que tarda en recorrer una distancia fija de un metro. Los valores medios (\pm SEM) de cada registro, así como la media total (\pm SEM) de cada grupo, se muestran en la tabla 11. Los valores están expresados en mm/s para facilitar su interpretación.

Grupo/ Prueba	P35	P50	P65	P80	P95	P110	P125	Media
Silvestre	55,8 \pm 7,7	49,9 \pm 6,2	36,1 \pm 8,7	46,6 \pm 4,3	59,3 \pm 3,2	58,8 \pm 13,8	64,4 \pm 8,9	53,0 \pm 3,2
PCD Trasplante	32,8 \pm 2,9	29,8 \pm 2,4	23,7 \pm 4,8	37,9 \pm 5,9	40,5 \pm 3,5	36,4 \pm 7,9	33,1 \pm 5,2	33,49 \pm 1,9
PCD sin trasplante	19,6 \pm 3,0	18,5 \pm 2,6	17,4 \pm 3,9	23,9 \pm 5,5	26,1 \pm 8,6	26,6 \pm 7,8	15,6 \pm 2,0	21,1 \pm 1,9

Tabla 11.- Valores medios (\pm ESM) a diferentes edades de la velocidad media de desplazamiento (mm/s).

Al realizar la estadística (*U de Mann-Whitney*; $P < 0,01$) encontramos diferencias altamente significativas entre los tres grupos experimentales. En la figura 20 se representan los resultados de *velocidad media de desplazamiento* para cada uno de ellos. Los animales más veloces, fueron los pertenecientes al grupo Control, siendo un 60% más veloces que los PCD sin trasplante, y un 37% más veloces que los del grupo PCD con trasplante. Interesantemente, el grupo PCD trasplantado presentó un incremento significativo de un 27% frente a los ratones PCD sin trasplantar.

Hay que indicar que esta prueba es una forma sencilla y fiable de estudiar la capacidad motora de los animales, ya que debido al breve tiempo en que se realizó elimina el componente cansancio a la hora de analizar los resultados. Los animales rara vez superaban el minuto para realizarla, comparado con los cinco minutos que se tarda en realizar el campo abierto.

Esto también puede explicar que no encontráramos grandes diferencias en los tiempos según los animales envejecían, cosa que no ocurrió al analizar la prueba de campo abierto, especialmente con los resultados de cruces completos y medios cruces, ya que un mayor cansancio asociado a las dificultades motoras degenerativas podría explicar la disminución general de los datos con la edad.

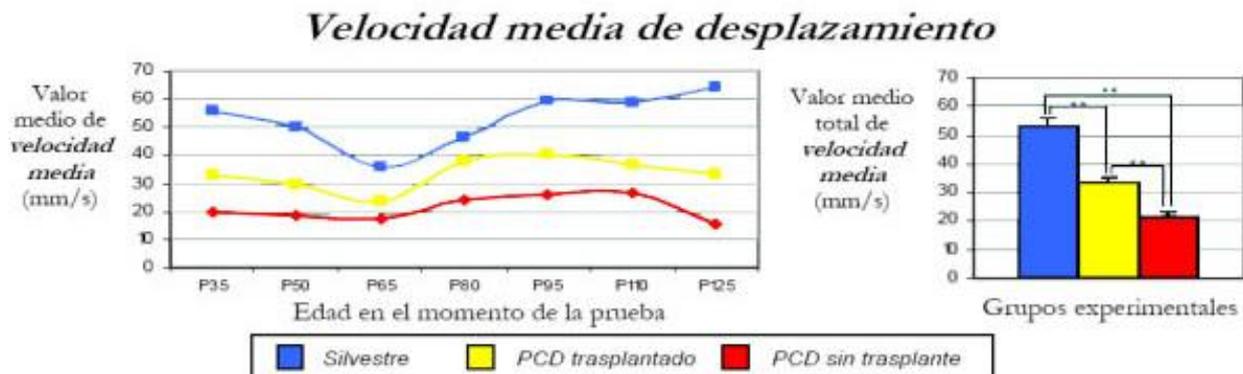


Figura 20.- Representación de los datos de velocidad media de desplazamiento de los 3 grupos experimentales. A la izquierda, se representan los valores medios de los 3 grupos experimentales en cada una de las 7 pruebas realizadas. A la derecha, se han juntado los valores de cada grupo y se ha realizado el análisis estadístico (U de Mann-Whitney) para comparar si existían diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Los resultados fueron altamente significativos ($P < 0,01$) para los 3 grupos.

Es importante destacar que durante la prueba de *velocidad media de desplazamiento* encontramos diferencias entre los distintos grupos en el apoyo de la planta de los pies. Mientras que los animales del grupo control se apoyan únicamente sobre los dedos a la hora de desplazarse, los animales que pertenecen al grupo PCD sin trasplante lo hacen apoyándose sobre sus talones. Sin embargo, los animales del grupo PCD trasplantados son capaces de desplazarse ocasionalmente sobre sus dedos. Estas diferencias pueden observarse claramente en la figura 21.

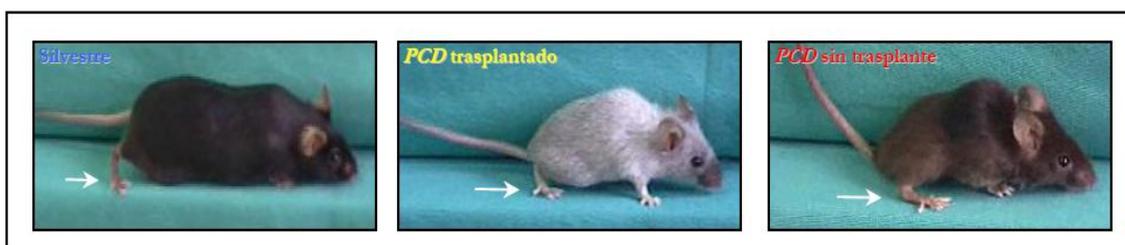


Figura 21.- Fotogramas capturados gracias a los vídeos realizados durante la prueba de velocidad media de desplazamiento. La imagen de la izquierda se corresponde con un animal del grupo Silvestre, en ella se puede apreciar cómo apoya los dedos de las patas traseras al andar. En el centro, la imagen de un animal mutante del grupo PCD trasplantado –con médula ósea WT–, que apoya también los dedos. La imagen de la derecha pertenece a un animal PCD sin trasplante, en la que se aprecia cómo apoya el talón durante su marcha.

A la vista de estas diferencias en la forma de desplazarse, intentamos realizar una prueba de comportamiento que nos midiera estas diferencias en la impronta plantar, la denominada “footprinting”. Esta prueba se basa en el análisis de las huellas dejadas por el animal al desplazarse por una superficie horizontal. Sin embargo,

debido al estado de los animales del grupo PCD sin trasplante fuimos incapaces de llevar a cabo registros útiles para el estudio posterior de las diferentes variables a medir. No obstante, como muestra de este tipo de prueba y para dejar constancia de las diferencias existentes en la forma en que los animales de cada uno de los grupos de estudio apoyan la planta de las patas, hemos creído conveniente, por ser muy ilustrativo, presentar una imagen de las huellas dejadas por un animal de cada grupo experimental (Figura 22).

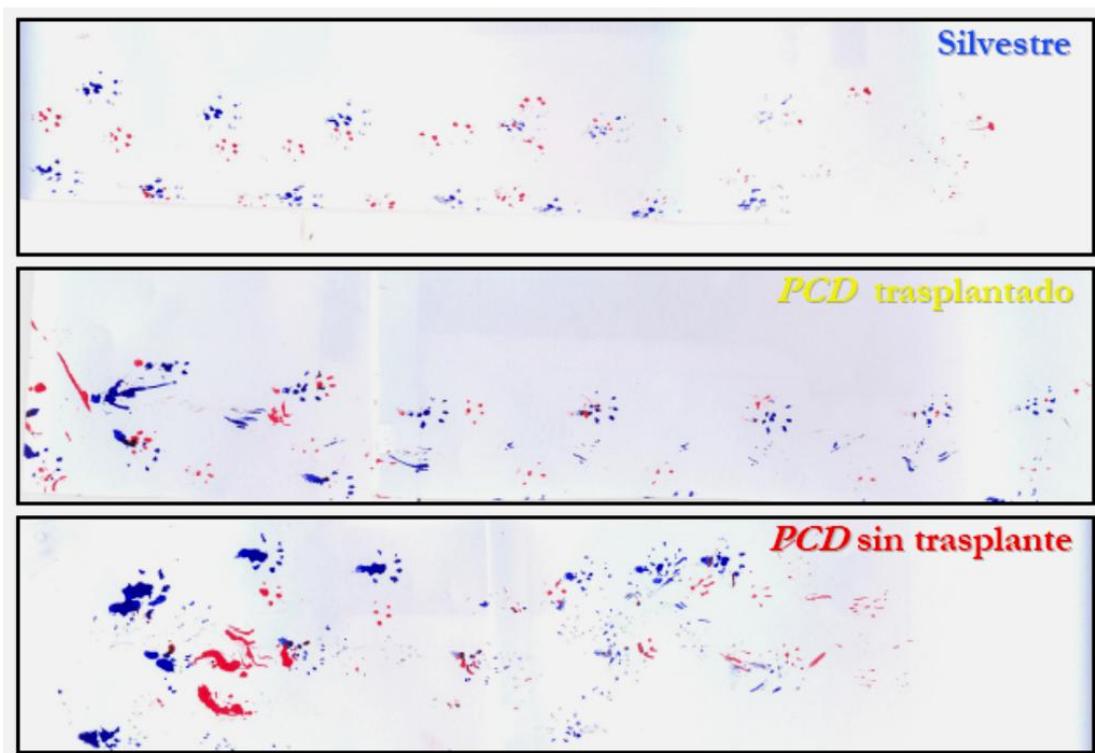


Figura 22.- Imágenes de las huellas dejadas por un animal de cada grupo experimental al desplazarse en el mismo sentido por una superficie horizontal. Para diferenciar las pisadas anteriores de las posteriores se pintaron de diferente color, siendo las rojas las delanteras y las azules las traseras. El movimiento del animal se efectuó de izquierda de la imagen a la derecha. Los animales del grupo Silvestre andan principalmente sobre sus dedos. Los del grupo PCD trasplantado apoyan los talones en alguna ocasión, aunque mantienen una marcha bastante uniforme. Finalmente, los animales del grupo PCD sin trasplante presentan una marcha desigual, con paradas y apoyando los talones en numerosas ocasiones.

1.1.3 Rotarod

Como ya explicamos en la sección 8.3 de materiales y métodos, la prueba de rotarod nos permite estudiar el equilibrio y coordinación de los sujetos de estudio. En esta prueba se registró el tiempo que cada animal era capaz de mantenerse sobre el cilindro giratorio (latencia de caída). Se realizaron siete repeticiones por día de estudio y esta serie se reiteró 4 veces durante 4 semanas (P60 a P90), tomando como dato

para el estudio estadístico la mejor latencia obtenida por el animal sobre el rotarod en cualquiera de los 4 días en los que se sometieron a la prueba de comportamiento. Los resultados pueden observarse en el panel izquierdo de la figura 23. Así mismo, se tomaron en conjunto todos los resultados de los 7 intentos, obteniendo una representación media global de cada grupo experimental. La representación de esta media se encuentra en el panel derecho de la figura 23. Al analizar estos datos encontramos que los animales controles son capaces de mantenerse una media de $2,74 \pm 0,18$ minutos, los animales PCD sin trasplantar aguantan $0,02 \pm 0,01$ minutos y los PCD trasplantados aguantan $0,69 \pm 0,13$ minutos, mostrando una diferencia significativa entre los animales control y los PCD trasplantados y entre el grupo PCD y PCD con trasplante (P valor $< 0,05$).

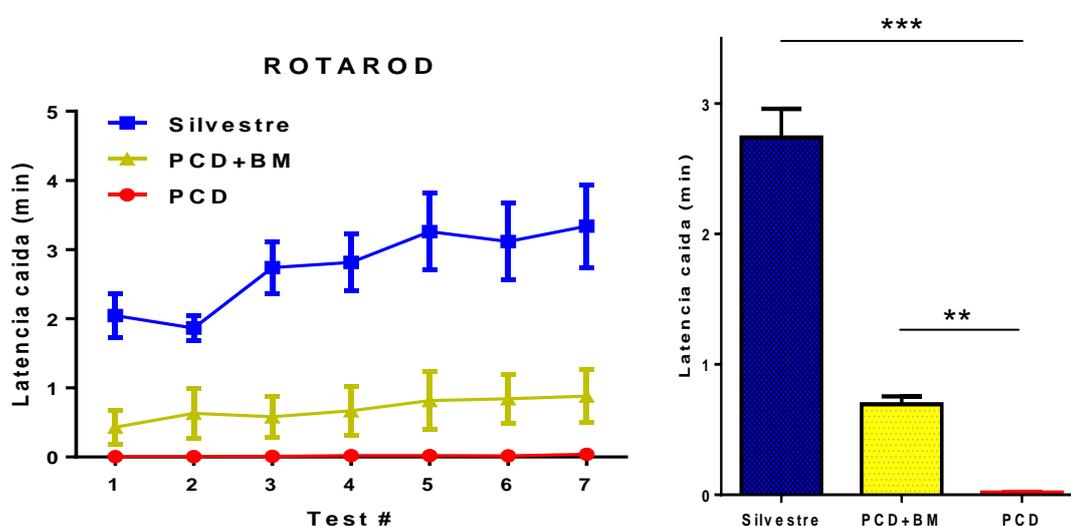


Figura 23.- Resultados del rotarod. En la gráfica de la izquierda se representa la media de las permanencias de cada grupo animal para la mejor de las latencias obtenidas en cada una de las 7 repeticiones en 4 diferentes días. En la gráfica de la derecha puede observarse la diferencia entre las medias de permanencia para cada grupo experimental tomando todos los intentos en conjunto.

Gracias a las diversas pruebas de comportamiento podemos decir que los animales PCD trasplantados con BM sana son capaces de mostrar una mejora a nivel de coordinación motora, y aunque aún están lejos de comportarse como animales sanos, si podemos observar una clara mejoría respecto a los animales sin trasplantar. En otros modelos de ataxia como la ataxia de Friederich o Niemann Pick ya se había demostrado que los animales eran capaces de mejorar su comportamiento motor tras la aplicación de diversas terapias génicas o celulares (Bae et al. 2005; Bae et al. 2007; Lim et al. 2007).

1.2 Distribución y caracterización de las células de médula ósea en el cerebelo de los animales receptores

Una vez completadas las diferentes pruebas de comportamiento, pasamos a estudiar la posible relación de estos efectos con la llegada de células derivadas del trasplante de médula ósea al cerebelo de los animales receptores. También quisimos analizar la distribución que presentaban estas células y caracterizar hacia qué tipos celulares se diferenciaban en las diferentes partes del cerebelo. Para ello, sacrificamos los animales y procesamos los cerebros (Véase sección 6.1 de materiales y métodos) para analizar, mediante histología e inmunohistoquímica, la formación de elementos gliales o neuronales en el cerebelo a partir de las células trasplantadas, ya que es allí donde se produce la pérdida de Purkinjes que ocasiona la ataxia de estos animales (Véase sección 1.2.3 de la introducción). A su vez, diferenciamos entre lo ocurrido bajo condiciones fisiológicas (grupo silvestre) y condiciones neurodegenerativas (grupos PCD). En todos los casos, el análisis se llevó a cabo a tres edades diferentes: P60, P110 y P150, que corresponden con 40, 90 y 130 días después del trasplante, respectivamente.

1.2.1 Generación de elementos gliales derivados del trasplante de médula ósea en condiciones fisiológicas normales y neurodegenerativas.

El análisis de las células GFP positivas derivadas del donante en el cerebelo reveló que en su mayoría presentaban una morfología típica de células gliales en reposo. Para confirmar estas observaciones realizamos una inmunofluorescencia de doble colocalización para GFP e Iba1 (un marcador típico de microglía) y para GFP y GFAP (un marcador de astrogliosis).

No observamos ninguna célula positiva para GFP que co-localizara para el marcador de astrocitos GFAP a ninguna de las edades analizadas en los diferentes grupos de estudio. Este resultado es consistente con los artículos publicados anteriormente, aunque hay que indicar que en los primeros estudios realizados tras un trasplante de médula ósea si se indicaba que se encontraban elementos astrogliales (Eglitis et al. 1997; Kopen et al. 1999) , aunque posteriormente se ha contradicho ya que no se han vuelto a observar, incluso en estudios cuya finalidad era profundizar en este tema (Wehner et al. 2003).

Por el contrario, la práctica totalidad de las células GFP fueron positivas también para Iba1. La abundancia de estas células de microglía doble positivas fue similar a todas las edades analizadas entre el grupo control y PCD trasplantado (Tabla 12). Así mismo, su distribución fue muy similar. La mayoría de estas células estaban localizadas en la periferia del tejido, próximas a las meninges, y siempre en zonas

perivasculares del cerebelo (Figura 24). La mayoría de las células presentaban una morfología con un soma pequeño y numerosas prolongaciones con ramificaciones características de microglía latente (figura 24 A-C). No obstante, también encontramos células con un mayor soma y un menor número de prolongaciones característicos de microglía activada (Figura 18 D-F)

		Cerebelo <i>n</i> =4	
		Control	PCD trasplantado
Edad	Genotipo		
P60		73.67±6.96	76.00±25.48
P110		114.00±5.00	130.33±30.30
P150		314.00±28.03	290.00±28.05

Tabla 12.- Recuento de células dobles positivas para los marcadores GFP e Iba1.

En esta tabla se representa el número de células doble positivas para los marcadores GFP e Iba1 tanto en el grupo control como PCD a las edades de P60, P110 y P150 expresadas como media ± ESM

En los animales PCD trasplantados, pese al ambiente neurodegenerativo, no encontramos diferencias significativas en el grado de contribución de las células derivadas de médula ósea a la población de microglía respecto al grupo control. Tampoco encontramos diferencias significativas entre las diferentes edades analizadas (Tabla 12). Ello sugiere que el proceso neurodegenerativo no modifica la llegada o la capacidad plástica de las células derivadas de médula ósea.

Cabe destacar que, aunque el elemento predominante generado desde la médula ósea trasplantada fueron células gliales (Eglitis et al. 1997; Priller et al. 2001; Wagers et al. 2002) , la contribución general de este tipo celular a la población de microglía residente (células positivas para Iba1) fue muy bajo, menos de una décima parte como se había descrito previamente bajo condiciones neurodegenerativas (Massengale et al. 2005).

La ausencia de diferencias cualitativas en su distribución y abundancia de las células derivadas del trasplante puede ser explicada por dos factores. Por un lado, que todos los animales fuesen sometidos al proceso de irradiación previo al trasplante hace que todos partieran condicionados de la misma manera para recibir el trasplante de médula ósea. Por otro lado, ambos grupos partían de un porcentaje de incorporación del trasplante similar, y como en ambos casos eran células de médula ósea sin la mutación *pcd_{1j}*, ambos grupos partían de un número similar de células derivadas de médula ósea y con unas capacidades de migración o diferenciación similares, lo que podría explicar que no observáramos diferencias en distribución y

abundancia.

Hay que recordar que hemos realizado un estudio cualitativo y para asegurar que no existe diferencia entre ambos grupos debería realizarse un estudio cuantitativo más profundo.

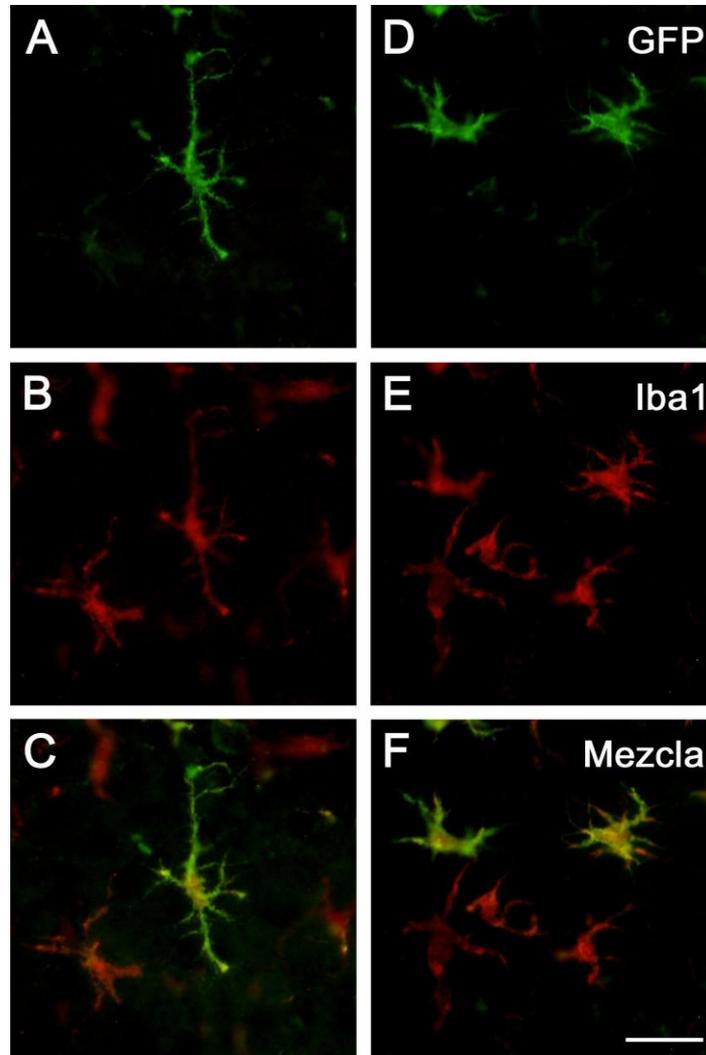


Figura 24.- Imágenes de microscopía de epifluorescencia convencional en secciones del encéfalo de un ratón silvestre trasplantado con médula ósea wt (homotrasplantado) de un donante CRE-GFP. Se pone de manifiesto la contribución de la médula ósea a la población microglial, tanto de microglía latente (A-C) como reactiva (D-F). En las imágenes superiores (A y D), se muestra el marcaje para GFP, que permite identificar las células derivadas de la médula ósea trasplantada. En las imágenes centrales (B y E), se presenta el marcaje para Iba1 (marcador específico presente en las células de microglía). Las imágenes inferiores (C y F) se corresponden con la combinación de las dos imágenes anteriores para cada tipo de microglía. También se puede observar que no toda la microglía se ha producido a partir de la médula ósea trasplantada (células positivas para Iba1 y negativas para GFP). Barra de escala: 20 μ m.

Respecto a los datos sobre la morfología de la microglía generada tras el trasplante, indicar que coincide con lo publicado anteriormente donde la mayoría de

microglía derivada del trasplante se encuentra en estado latente, aunque no se puede descartar la presencia de alguna célula activada (Ladeby et al. 2005). Por otro lado, la falta de diferencia en el número celular originadas en los diversos tiempos estudiados (P60, P110 y P150) también concuerda con lo publicado por Priller y colaboradores, donde en un estudio semicuantitativo tras un trasplante de médula ósea encontraron porcentajes de células microgliales similar a los encontrados por nosotros, tanto a las 8 como a las 15 semanas tras el trasplante (Priller et al. 2001).

Para averiguar si estas células de microglía GFP positivas fueron generadas por fusión celular, realizamos una tinción de X-gal para detectar la expresión de LacZ resultante de la recombinación de las regiones floxeadas tras un evento de fusión. No encontramos células de microglía GFP positivas que colocalizan para la tinción de X-gal en ninguno de los grupos experimentales. Esto nos sugiere que la contribución de las células de médula ósea a la formación de microglía ocurre principalmente a través de procesos de diferenciación celular.

1.2.2 Contribución de las células derivadas de médula ósea a elementos neuronales bajo condiciones normales

Para analizar la contribución de las células del donante a la formación de elementos neuronales bajo condiciones fisiológicas normales, identificamos células que colocalizasen para el marcaje de GFP, procedente del animal donante, y los marcadores gliales (Iba1 y GFAP) o el marcador neuronal calbindina (marcador específico de Purkinjes en el cerebelo). Como criterio para la caracterización de neuronas, se requería la ausencia de marcaje para la inmunohistoquímica de marcadores gliales y el marcaje positivo para la inmunohistoquímica de marcador neural, o la presencia de morfología típica neuronal.

Siguiendo este criterio y como se había visto anteriormente en estudios de otros autores, encontramos la presencia de elementos neuronales que expresaban GFP y presentaban una localización y morfología característica de las neuronas de Purkinje (Figura 25), llegando a contar un máximo de 21 células por cerebelo (Priller et al. 2001; Alvarez-Dolado et al. 2003; Johansson et al. 2008; Nygren et al. 2008) Para algunas de ellas quisimos confirmar su identificación como neuronas de Purkinje mediante la expresión del marcador calbindina (Figura 26).

Hay que indicar que la frecuencia con la que encontrábamos neuronas de Purkinje GFP positivas fue extremadamente baja comparada con la población de neuronas de Purkinje total. Estas neuronas de Purkinje positivas no mostraron una localización específica en ningún área del cerebelo, lo que coincide con el trabajo previo de Johansson (Johansson et al. 2008) y nos indica que este fenómeno puede

producirse con la misma probabilidad en cualquier punto del cerebelo. Tanto su número como momento en el tiempo en que aparecen se corresponde con lo publicado anteriormente (Alvarez-Dolado et al. 2003; Weimann et al. 2003; Magrassi et al. 2007) . Recientemente se ha publicado que cuando sometemos a los animales trasplantados a algún tipo de daño neuronal, como muerte neuronal selectiva o asociada a la inflamación, se adelanta el momento de aparición de estas células y se ve notablemente incrementado su número (Magrassi et al. 2007; Johansson et al. 2008).

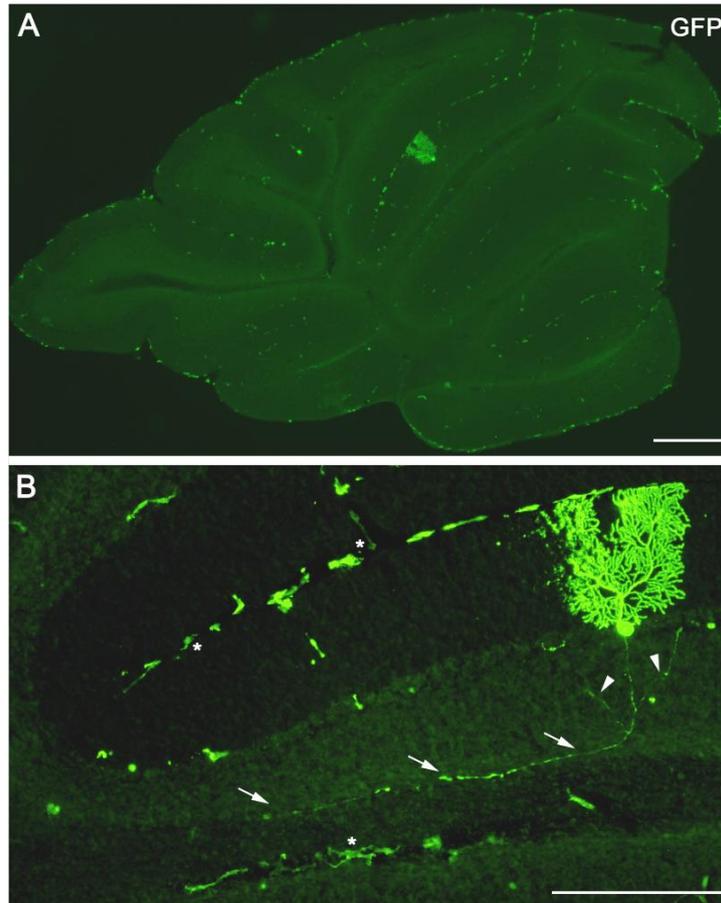


Figura 25.- Imágenes de microscopía de epifluorescencia convencional en secciones de cerebelo de un ratón silvestre trasplantado con médula ósea WT (homotrasplantado) de un donante CRE-GFP en las que se muestran las células GFP positivas. A es una imagen panorámica que muestra la localización y abundancia de las células originadas a partir de la médula ósea trasplantada en el cerebelo de estos animales, entre las que se puede observar una célula de Purkinje. B es una magnificación de la imagen anterior, que permite apreciar con mayor detalle estas células GFP positivas. En el caso de la célula de Purkinje, se observa perfectamente la complejidad del árbol dendrítico y cómo su axón (marcado por las flechas) es una muestra inequívoca de su integración en el sistema. Además, este axón presenta las típicas colaterales recurrentes (puntas de flecha) que caracterizan a las células de Purkinje. Por su parte, la microglía se localizó fundamentalmente en la periferia. Con los asteriscos se han marcado algunas de estas células de microglía. Barras de escala: 200 μ m para A y B.

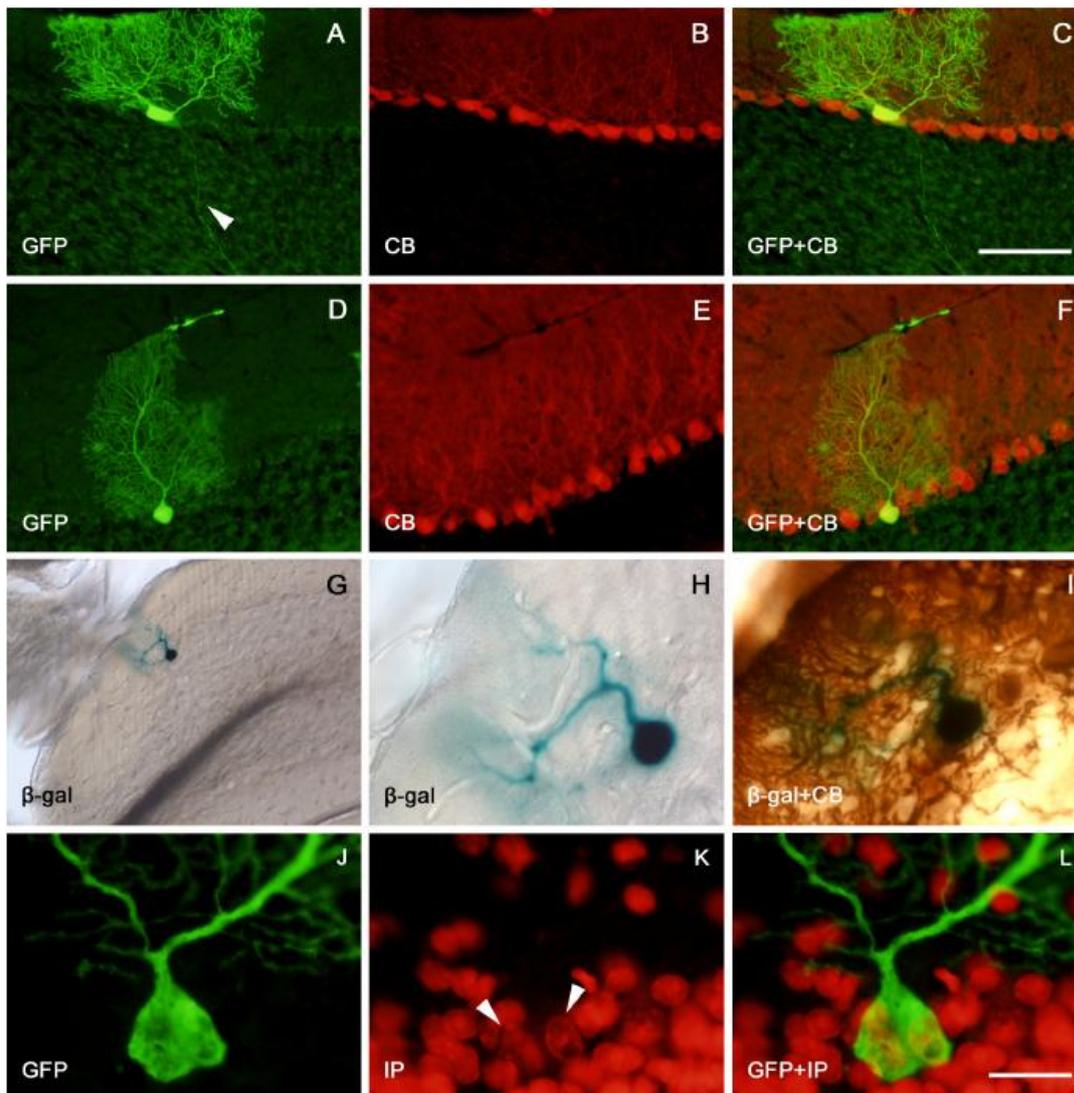


Figura 26.- Imágenes microscópicas en secciones de cerebelo de ratones silvestres trasplantados con médula ósea WT (homotrasplantados) de donantes CRE-GFP en las que se muestran algunos ejemplos de células de Purkinje originadas a partir de la médula ósea trasplantada. A y D muestran dos células de Purkinje GFP positivas, perfectamente diferenciadas, en las que se puede observar la complejidad de su árbol dendrítico y, en una de ellas, su axón (punta de flecha). En B y E se muestra el marcaje para Calbindina (CB) de las secciones anteriores y, en C y F, la colocalización de ambas señales. Las células de Purkinje originadas a partir de la médula ósea no sólo presentan la morfología típica de este tipo celular, sino que, además, expresan CB, como es propio de estas células. Las siguientes imágenes (G-I) son el resultado de la técnica histoquímica del X-Gal en el cerebelo de un ratón silvestre de la colonia PCD-R26R trasplantado con médula ósea de un donante CRE-GFP. En G se puede observar una célula de Purkinje que ha pasado por un proceso de fusión celular con CMO. En H se presenta la misma célula a más aumento y, en I, colocalizando con CB revelada mediante inmunohistoquímica con DAB. Las últimas imágenes (J-L) muestran a gran aumento el soma de una célula de Purkinje GFP positiva (J), originada a partir de la médula ósea trasplantada. K ofrece el marcaje de esa región con Ioduro de Propidio (IP, marcador nuclear) y L la colocalización de las dos imágenes anteriores. Las puntas de flecha (K) señalan dos núcleos que parecen propios de la célula de Purkinje anterior, lo que indicaría que se trata de una célula binucleada. Barra de escala en C: 100 μ m para A-F, 200 μ m para G y 50 μ m para H e I. Barra de escala en L: 20 μ m para J-L.

La morfología de estas neuronas de Purkinje positivas para GFP fue aparentemente normal, pudiendo observarse largos axones que en ocasiones presentaban sus características colaterales recurrentes, lo que sugiere su integración y conexión con otras regiones del sistema cerebelar. Por otro lado, el gran y complejo árbol dendrítico nos indica el avanzado grado de diferenciación neuronal que presentaban (Figuras 25 y 26).

Consistente con trabajos previos (Alvarez-Dolado *et al.* 2003; Weimann *et al.* 2003; Magrassi *et al.* 2007; Johansson *et al.* 2008; Nygren *et al.* 2008), el mecanismo de plasticidad involucrado en la formación de estas neuronas es claramente la fusión celular, como así se confirmó por la expresión en estas células del gen reportero LacZ (tinción de X-gal, Figura 20, G-I). La poliploidía en las células de Purkinje fue descrita previamente previos (Alvarez-Dolado *et al.* 2003; Weimann *et al.* 2003; Magrassi *et al.* 2007; Johansson *et al.* 2008; Nygren *et al.* 2008) y nosotros la encontramos en todos los casos de estas células que presentaban marcadores de médula ósea trasplantada que analizamos.

Esta poliploidía fue descrita como un evento de fusión entre una neurona de Purkinje con una célula de médula ósea trasplantada, aunque se han dado casos en los que se ha encontrado de manera natural sin la presencia de irradiación o trasplante de médula ósea (Magrassi *et al.* 2007). En dichos casos la fusión celular puede estar favorecida por la avanzada edad de los animales y la subsecuente pérdida de neuronas de Purkinje (Sturrock 1989). Todos estos datos nos pueden hacer pensar que quizá existen mecanismos moleculares o celulares que hacen que las neuronas de Purkinje estén predispuestas de manera natural a sufrir eventos de fusión celular, ya que debido a su gran y compleja arborización no pueden ser reemplazadas en adultos (Johansson *et al.* 2008).

1.2.3 Contribución de las células derivadas de médula ósea a elementos neuronales bajo condiciones fisiológicas neurodegenerativas

El análisis de los cerebelos de los animales PCD trasplantados nos permite discriminar: a) el efecto de un ambiente neurodegenerativo sobre la contribución de las células de médula ósea en esta región; y b) el efecto de un trasplante de células de médula ósea sanas en un cerebro dañado. Los marcadores y los criterios usados para examinar estos procesos fueron los mismos que los empleados para las condiciones fisiológicas normales.

Resaltar que no encontramos neuronas de Purkinjes con marcadores del donante GFP en los cerebelos de los animales PCD trasplantados, incluso en el lóbulo vermal X del cerebelo, donde la degeneración neuronal comienza más tarde (Kyuhou

et al. 2006) (figura 27). La comparación histológica de los cerebelos de animales PCD trasplantados y sin recibir el trasplante no reveló ninguna diferencia o mejora en el proceso degenerativo. Esto fue confirmado por la casi total ausencia de neuronas de Purkinje (Calbindina positivas) en todos los ratones mutantes analizados, con o sin trasplante de médula ósea.

Estos datos contrastan con los estudios publicados previamente (Bae *et al.* 2005; Magrassi *et al.* 2007; Johansson *et al.* 2008), en los que la habilidad de las células derivadas de médula ósea para fusionar con esta población neuronal se ha mostrado incrementada tras el daño a las células de Purkinje, sugiriendo que quizás las diferencias en la naturaleza del daño afectan a los procesos de fusión celular. Otra posibilidad es la diferencia en el tiempo en el que comienza la degeneración de las neuronas de Purkinje y el momento en el que se realizó el trasplante. Es posible que la muerte de las neuronas de Purkinje ya esté programada y la llegada de las células trasplantadas se produzca demasiado tarde para contrarrestar este proceso degenerativo.

La ausencia de neuronas de Purkinje, tanto de las propias del animal como de las posibles originadas a partir de la médula ósea trasplantada, hizo que nos planteáramos que otros motivos estaban causando la mejora en el comportamiento locomotor que observamos en los animales trasplantados. La primera hipótesis que planteamos es que la médula ósea trasplantada desde un animal sano pueda estar secretando diversas quimioquinas y citoquinas que estarían estimulando la regeneración y disminuyendo así el impacto de la apoptosis, suprimiendo reacciones inmunes y aumentando la angiogénesis, lo que conllevaría un incremento o mejora de la proliferación celular endógena y favoreciendo así la mejora funcional que encontramos en los animales trasplantados (Chen *et al.* 2003; Spees *et al.* 2006; Xu *et al.* 2006; Prockop *et al.* 2007; Chopp *et al.* 2008).

Para comprobar esta hipótesis habría que realizar un análisis a fondo de la sangre de estos animales para ver si encontrábamos diferencias en la concentración de alguna citoquina o factor de crecimiento entre los animales PCD trasplantados y sin trasplantar, aunque hay que indicar que hasta el momento no se ha reportado ninguna diferencia en la médula de los animales portadores de la mutación *pcd*^{1J}. No obstante, la progresión en la muerte de las neuronas de Purkinje y en otras regiones del cerebro no parece soportar esta hipótesis de trabajo.

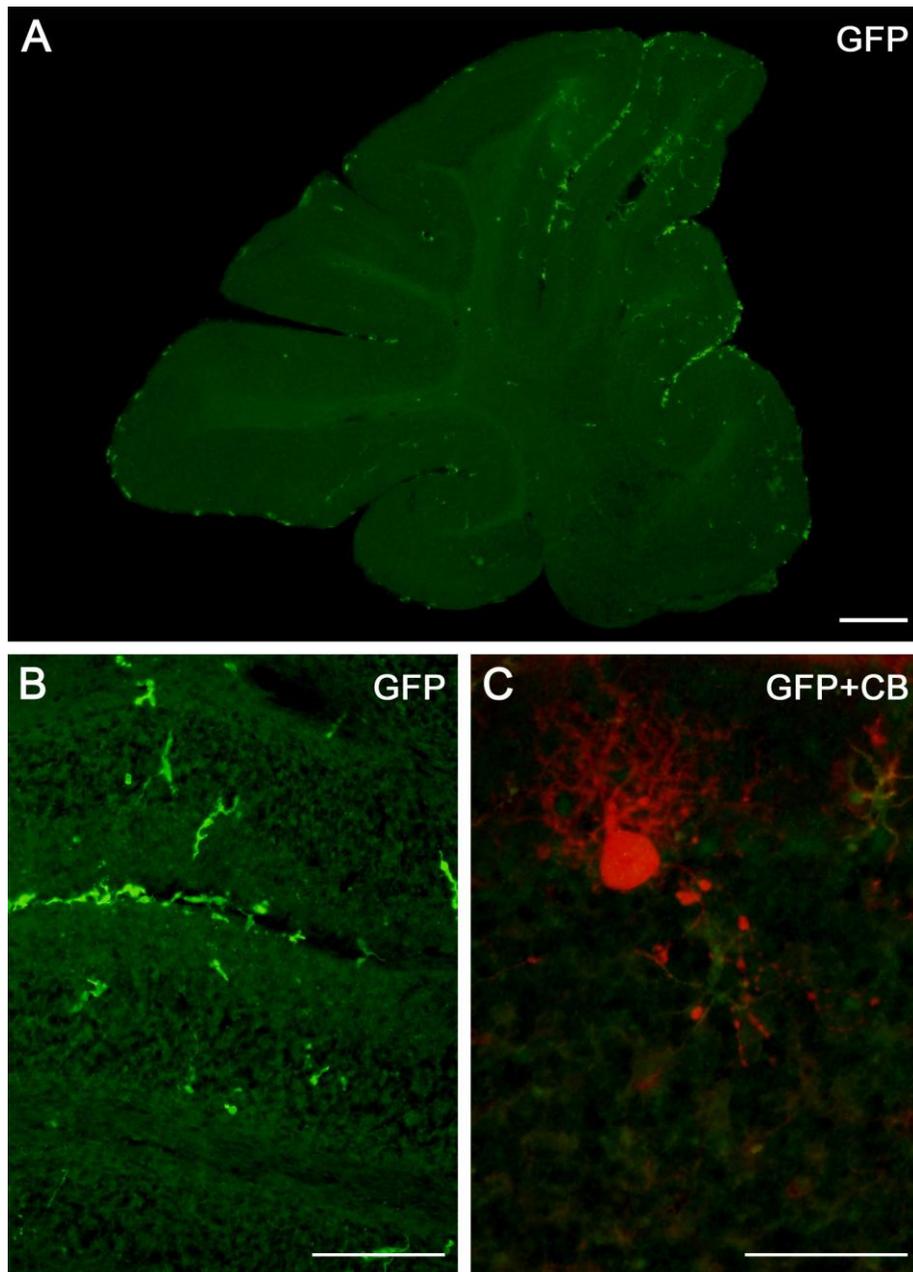


Figura 27.- Imágenes de microscopía de epifluorescencia convencional en secciones de cerebelo de ratones mutantes PCD trasplantados con médula ósea WT (PCD heterotrasplantado) de donantes CRE-GFP. A es una imagen panorámica que muestra la localización y abundancia de las células originadas a partir de la médula ósea trasplantada en el cerebelo de estos animales. B es una magnificación de la imagen anterior, que permite apreciar con mayor detalle estas células GFP positivas. C muestra una de las escasas células de Purkinje, identificada con el marcaje para Calbindina (CB, en rojo), que se pueden encontrar en el cerebelo de estos animales a cualquiera de las edades analizadas. Como en todos los animales analizados, en este caso, la célula de Purkinje no colocaliza con GFP; por tanto, no se ha producido a partir de la médula trasplantada. Su morfología es marcadamente aberrante, con un soma muy grande y un árbol dendrítico reducido. Barras de escala: 200 μm para A, 100 μm para B, 50 μm para C.

El segundo causante de la mejora motora pueden ser los efectos derivados de la radiación, ya que se sabe que la radiación causa procesos inflamatorios locales (Chiang et al. 1993), rotura de la barrera hematoencefálica (Pachter et al. 2003),

inducción de cambios en los niveles de quimioquinas circulantes (Abedi et al. 2005), secreción de citoquinas pro-inflamatorias (Shan et al. 2007), extravasación de células sanguíneas (Yuan et al., 2006) e inflamación encefálica transitoria (Johansson et al. 2008). Como efecto de todo ello puede que se esté produciendo algún efecto a nivel sistémico que explicase la mejora a nivel de comportamiento que hemos observado. Para comprobar esta hipótesis podríamos realizar trasplantes usando medios químicos en lugar de irradiación o realizar trasplantes de MO de animales mutantes a animales mutantes usando la irradiación para eliminar la MO residente (homotrasplantados).

Como última idea, no podemos descartar que la mejora funcional pueda ser debida a la presencia de células de MO a nivel muscular. En este sentido, análisis posteriores a la finalización de esta tesis en el laboratorio del Dr. Álvarez Dolado sugieren una mejora en la estructura muscular de los animales PCD trasplantados con MO, además de encontrarse la presencia de diversos tipos celulares derivados del trasplante, incluyendo miocitos. Esto sugiere que la mejora tisular a nivel muscular podría explicar las ligeras mejoras en las pruebas de locomoción al tener los animales un mejor tono muscular.

2 Accidente cerebrovascular

Como hemos mencionado en la introducción, existen diferentes poblaciones de progenitores mesenquimales y hematopoyéticos que contribuyen en mayor o menor grado a la formación de nuevos vasos. Dado que estas poblaciones son susceptibles de fusionarse, es razonable pensar en una posible implicación del proceso de fusión celular durante la vasculogénesis.

Para estudiar esta posible contribución del proceso de fusión celular a la formación de vasos, se analizaron cerebros de ratones R26R quiméricos reconstituidos con células derivadas de la médula ósea que expresan la cre-recombinasa bajo el promotor de la β -actina. Esta estrategia de trasplantes nos permitió la detección de las células fusionadas mediante una sencilla tinción de X-gal (Ver sección 3.1 de materiales y métodos).

Dos meses tras el trasplante analizamos la presencia de células positivas para X-gal, es decir células fusionadas, asociadas a la vasculatura en los cerebros de los ratones quiméricos. Observamos una frecuencia media de 251 ± 76 células positivas por cerebro, distribuidas uniformemente por todas sus áreas. Interesantemente, el $13.3 \pm 8.4\%$ de ellas presentaban dos núcleos, lo que apoyaría aún más su formación por fusión celular. La presencia de células X-gal positivas con un único núcleo puede ser explicado por la formación de un sincarión tras la fusión o bien por la generación de

nueva progenie tras una mitosis reductiva (Blau et al. 1983; Cowan et al. 2005).

2.1 Caracterización de las células fusionadas

La morfología y localización de las células fusionadas, siempre adyacentes al endotelio y lejos del lumen, sugería su tipificación como macrófagos perivasculares o bien como pericitos. Para definir la naturaleza de estas células decidimos realizar un análisis inmunohistoquímico con marcadores específicos de tipo celular. La mayoría de las células X-gal positivas coexpresaron marcadores de pericitos maduros diferenciados. Un $83.4 \pm 7.1\%$ coexpresó el marcador vimentina, un $78.6 \pm 9.9\%$ fue positivo para desmina y un $74.8 \pm 6.6\%$ para Sma (del inglés *smooth muscle α -actin*). También encontramos un $32.9 \pm 6.3\%$ de células positivas para el marcador de linaje hematopoyético CD45. Estos datos sugerían la existencia de una población de células fusionadas que coexpresan CD45 y marcadores de pericitos maduros (Figura 28).

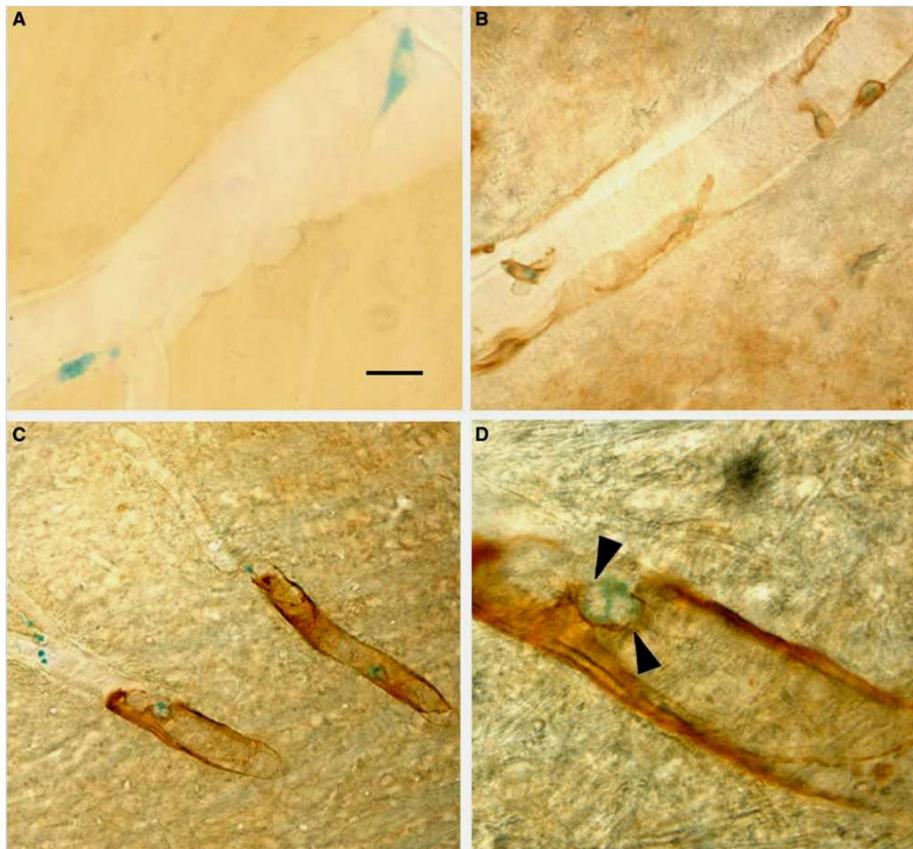


Figura 28.- Identificación de las células fusionadas como pericitos en la vasculatura cerebral. Análisis mediante tinción de X-gal (A). Muchas de estas células colocalizan con vimentina (B) o desmina (C y D), marcadores de pericitos maduros. Algunas de estas células presentan dos núcleos (cabezas de flecha). La barra representa 15 μm (A y D), 25 μm (B) y 50 μm (C).

Para confirmar esta posibilidad realizamos una inmunohistoquímica triple para

los marcadores desmina, CD45 y β -galactosidasa. Tras el análisis observamos que un $12.7 \pm 2.6\%$ de las células positivas para la β -galactosidasa coexpresaban CD45 y desmina. Este resultado confirmó la existencia de una población de pericitos maduros fusionados asociados a la vasculatura. Por contra, la gran mayoría de células fusionadas fueron negativas para el marcador NG2, característico de pericitos inmaduros o en desarrollo ($0.6 \pm 0.5\%$).

Por otra parte, nunca encontramos células que colocalizarán para X-gal y CD31 o el factor von Willebrand, excluyendo así la posibilidad de que las células fusionadas perteneciesen al linaje endotelial. Estos datos son concordantes con estudios previos que demuestran que las células endoteliales se generan por transdiferenciación de células madre hematopoyéticas y no por fusión celular (Bailey *et al.* 2006)

Los datos inmunohistoquímicos sugerían fuertemente que, bajo condiciones normales, la fusión celular contribuye a la generación de pericitos maduros y macrófagos perivasculares. Sin embargo, ninguno de los marcadores usados son marcadores absolutamente específicos de pericitos ni reconocen todas las posibles poblaciones de pericitos (Ozderem *et al.* 2003; Tigges *et al.* 2008). Además, tras la fusión celular, los genes de ambas células fusionadas pueden expresarse en el heterocarión resultante (Weimann *et al.* 2003), complicando así el uso de un único marcador para su caracterización.

Por ello, decidimos realizar un estudio mediante microscopia electrónica con el que identificar inequívocamente a las células fusionadas (Figura 29, A). La tinción de X-gal es fácilmente identificable bajo microscopia electrónica debido a su denso precipitado en el retículo endoplasmático. Bajo el microscopio electrónico, las células X-gal positivas presentaron lámina basal y extensiones que prácticamente rodeaban el lumen capilar (Figura 29, C). Contenían abundantes vesículas plasmolémicas, pocas mitocondrias y heterocromatina en la periferia del núcleo. También observamos abundantes lisosomas y, ocasionalmente, gotas lipídicas (Figura 29, B).

Todas estas características morfológicas son típicas de pericitos del sistema nervioso central (Tilton 1991). Estas observaciones establecieron inequívocamente la identidad de las células positivas para X-gal como pericitos, y confirmaron que una pequeña fracción de este tipo celular es generada por fusión celular bajo condiciones normales.

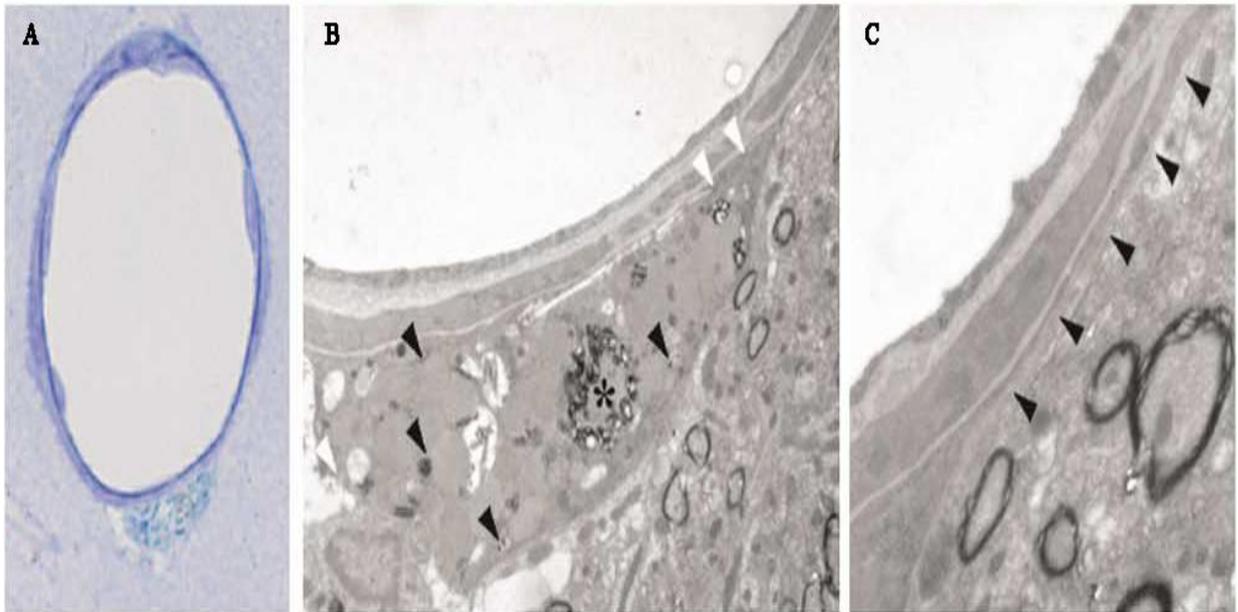


Figura 29.- Análisis de las células X-gal positivas mediante microscopía electrónica. En la imagen **A** se pueden observar los cortes semifinos (1.5 μm de grosor) de una célula X-gal positiva (de color azul-verdoso). En la imagen **B** podemos identificar los precipitados de X-gal (cabeza de flecha negra), lisosomas (asterisco) y vesículas de plasmolema (cabeza de flecha blancas) característicos de los pericitos cerebrales. En la imagen **C** tenemos una magnificación de la zona adyacente, donde se puede observar la lámina basal que se extiende rodeando el vaso sanguíneo (cabeza de flecha negras).

2.2 Estudio de la fusión celular tras un proceso isquémico

2.2.1 Análisis de la fusión celular tras un proceso isquémico

Varios grupos han demostrado recientemente la contribución de células derivadas de la médula ósea y células madre hematopoyéticas a la formación de pericitos tras un accidente cerebrovascular (Rajantie *et al.* 2004; Kokovay *et al.* 2006). Dado que los pericitos son fundamentales en el proceso de angiogénesis y estos, como hemos demostrado en la sección anterior, pueden formarse por fusión celular, decidimos estudiar la implicación del proceso de fusión durante la angiogénesis producida tras un accidente cerebrovascular. Para ello, indujimos un episodio de ictus o hipoxia cerebral en ratones quiméricos reconstituidos con células derivadas de médula ósea de forma similar al apartado anterior. Estos cerebros fueron analizados dos semanas tras la inducción de la isquemia y comparados con animales que habían sufrido el mismo proceso experimental y quirúrgico pero sin ocluir la arteria cerebral media (grupo control). Ambos grupos lo compusieron 5 animales cada uno.

Al analizar los cerebros mediante X-gal, encontramos un incremento de hasta tres veces en el número de células X-gal positivas asociadas a la vasculatura tras la isquemia. Estos animales presentaron 786 ± 183 X-gal positivas por cerebro frente a las 258 ± 82 que presentaban los animales control. Este aumento en células X-gal

positivas se debió fundamentalmente a una mayor concentración de estas células en el área periférica a la lesión (Figura 30).

El número de células doble positivas para X-gal/desmina o X-gal/vimentina fue ligeramente mayor que bajo condiciones normales, aunque no lo suficiente para que fuera estadísticamente significativo (Figura 31). Sin embargo, contrastó llamativamente un incremento de 100 veces en el número de células doble positivas para X-gal y NG2 en el área de penumbra. Observamos 489 ± 102 células doble positivas por cerebro isquémico, frente a las 5 ± 3 células encontradas en el grupo control, lo que representaba el 62.3 ± 12.9 % de las células X-gal positivas tras la isquemia (Figura 31).

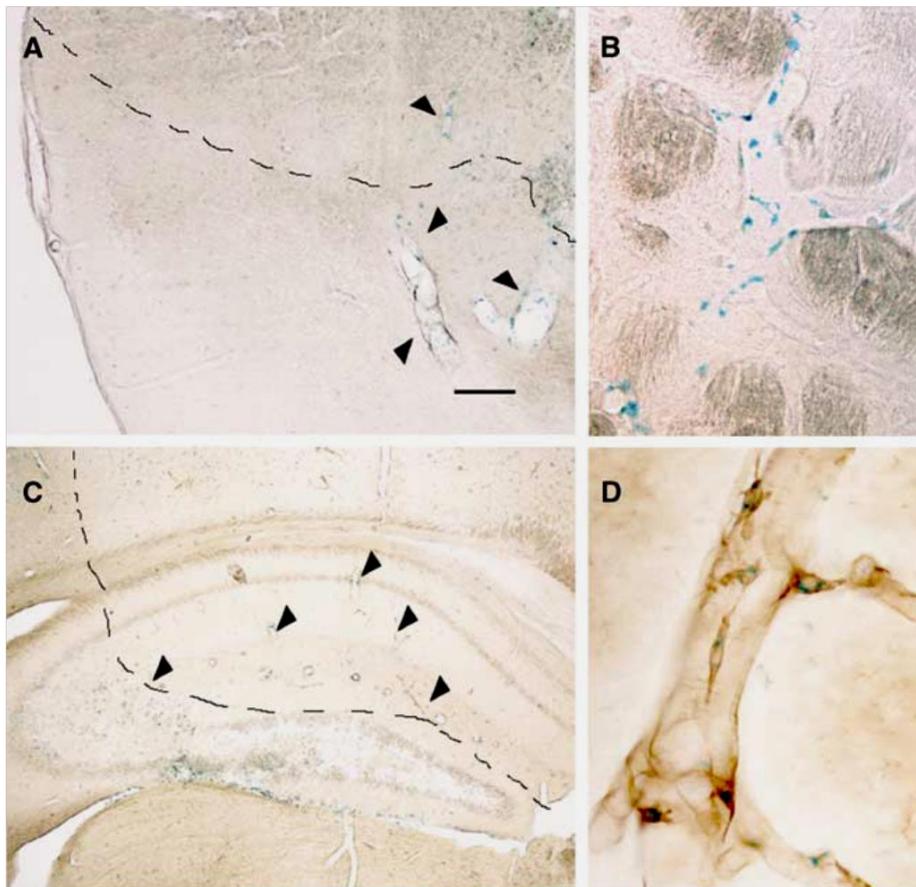


Figura 30.- La isquemia induce la formación de pericitos mediante fusión celular. (A-D) Tinción de X-gal en secciones de cerebros, se observa un gran número de células positivas (cabeza de flecha) próximas a la lesión (zona de puntos) tanto en la corteza (A), como el estriado (B) y en el hipocampo (C). La mayoría de las células fusionadas (azul) expresan NG2 (marrón), un marcador de pericitos maduros (D). La barra representa 100 μ m (A y C) y 30 μ m (B y D).

Interesantemente, también encontramos un incremento de siete veces en las células doble positivas para X-gal y CD45, pasando de 83 ± 16 células por cerebro en el grupo control a 609 ± 143 células por cerebro en los animales isquémicos. Ello

supone el 77.4 ± 18.3 % de las células X-gal positivas tras la isquemia (Figura 25). Estos porcentajes indicaban la presencia de células fusionadas doble positivas para CD45 y NG2. Un análisis mediante triple inmunohistoquímica confirmó que la mayoría, si no todas, de las células NG2/X-gal positivas también coexpresan CD45 (Figura 25). Estos resultados sugieren fuertemente que la isquemia promueve la formación de nueva vasculatura generando pericitos jóvenes a través de la fusión celular.

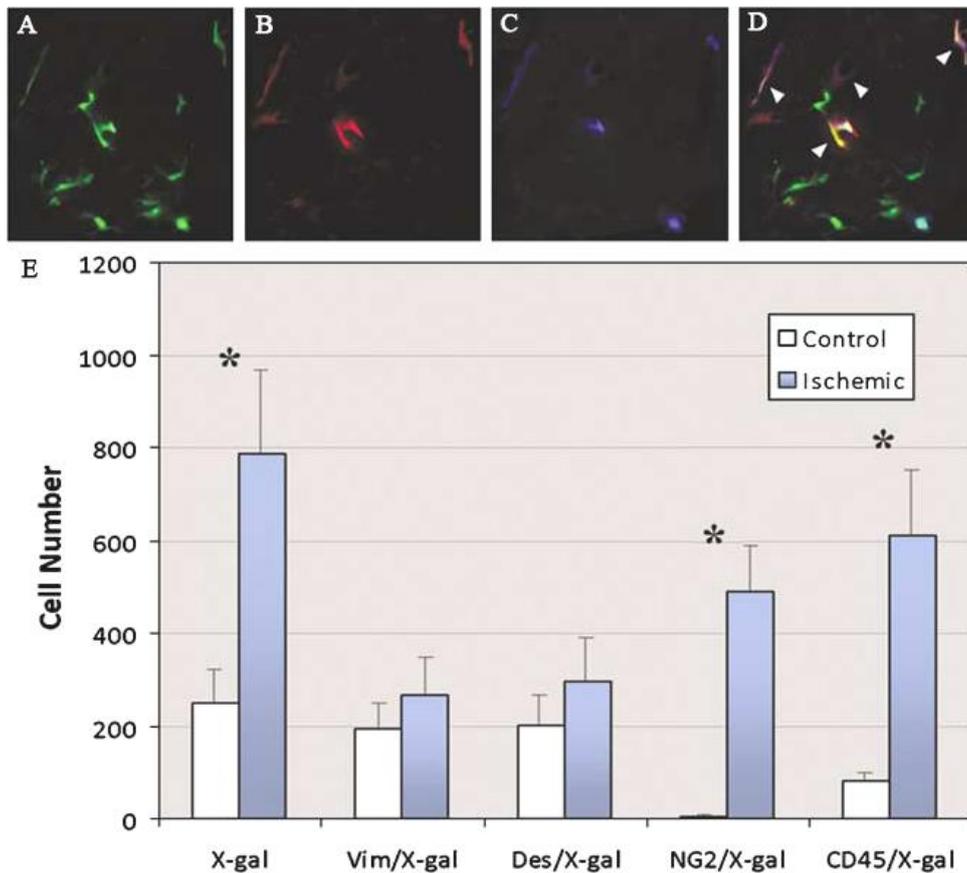


Figura 31.- Caracterización de las células X-gal positivas tras la isquemia.

En las imágenes de la **A-D** encontramos la colocalización por inmunofluorescencia de las células fusionadas (positivas para β -galactosidasa, azul) con NG2 (rojo) y CD45 (verde) mostrando a una población de células triple positivas (cabezas de flecha blancas) tras la isquemia. En la grafica (**E**) se representan el número de células X-gal positivas en el cerebro isquémico, donde podemos observar un incremento de tres veces respecto al control. Esto es principalmente por el incremento de pericitos dobles positivos para NG2/X-gal generados por fusión y el incremento de seis veces de macrófagos CD45/X-gal. (Datos estadísticos: $P < 0.001$, $n=5$).

Los pericitos son considerados una población celular heterogénea, difícil de definir y que carecen de una clara ontogenia; además son capaces de diferenciarse a otros tipos de células mesenquimales como células de musculo liso o fibroblastos(Gerhardt et al. 2003). En este trabajo hemos podido mostrar evidencias

directas de la fusión de pericitos tanto en condiciones naturales como patológicas.

Este descubrimiento puede explicar la dificultad para detectar una definida población de pericitos, su origen ambiguo, la ausencia de consenso en la literatura sobre un marcador específico, e introduce un concepto más dinámico de las células vasculares a través de su capacidad para cambiar de un tipo celular a otro por procesos de fusión celular o transdiferenciación.

En el pasado varios grupos han mostrado extensamente la contribución de células derivadas de la médula ósea o células madre hematopoyéticas a la formación de la vasculatura tras el infarto cerebral (Rajantie et al. 2004; Bailey et al. 2006; Kokovay et al. 2006). Sin embargo, el mecanismo de la formación de las células murales a partir de células derivadas de la médula ósea sigue siendo difícil de conocer. Nuestro descubrimiento, junto con los previamente descritos, sugiere fuertemente que la fusión celular y la transdiferenciación trabajan conjuntamente durante la vasculogénesis. Las células endoteliales son generadas por transdiferenciación de precursores hematopoyéticos (Bailey et al. 2006) mientras que una subpoblación de pericitos son formados por procesos de fusión celular. Aunque nuestros datos no descartan la posibilidad de que las células derivadas de médula ósea contribuyan a la formación de pericitos por transdiferenciación.

Nuestro trabajo demuestra un importante incremento en los eventos de fusión celular tras el infarto cerebral. Recientemente se ha comprobado que la inflamación celular es un potente modulador de la fusión celular (Johansson et al. 2008). El infarto cerebral está asociado normalmente a episodios de inflamación celular, lo que explicaría el incremento de eventos de fusión observado en las áreas infartadas, particularmente en el área de penumbra.

Este incremento en la fusión puede ser facilitado por la invasión de macrófagos en el área isquémica. Estas células fusionan en respuesta a infecciones y lesiones (Vignery 2008). En consonancia con esta idea está nuestra observación de un incremento de células positivas para el marcaje CD45/X-gal y los nuevos pericitos fusionados (positivas para x-gal/NG2) que co-expresan el marcador CD45, sugiriendo una fusión reciente con macrófagos. Otra posible explicación para el incremento en el número de células fusionadas puede ser la proliferación de células que previamente habían sufrido un evento de fusión celular y que generan una nueva progenie en respuesta al infarto cerebral.

La inducción de fusión celular tiene una importante implicación terapéutica. Promueve la recuperación de enfermedades degenerativas y el rescate de mutaciones recesivas (Alvarez-Dolado 2007). Dado al importante papel de los pericitos en el inicio

de la vasculogénesis { (Ozerdem et al. 2003; Tigges et al. 2008) y su regulación de la proliferación y diferenciación de las células endoteliales (Gerhardt et al. 2003), nuestros descubrimientos implican un papel activo y fisiológico de la fusión celular durante la angiogénesis, y abre nuevas puertas para la aplicación de células derivadas de la médula ósea y la fusión celular en el tratamiento del infarto cerebral.

3 Sistema hematopoyético e inflamación

Hasta ahora habíamos estudiado la fusión celular de las células derivadas de médula ósea con células residentes en el parénquima tisular del huésped, bien tras un evento de isquemia o asociada a un proceso neurodegenerativo. Sin embargo, son muy pocos los estudios sobre fusión dentro del propio sistema hematopoyético. Únicamente se conoce la fusión entre macrófagos en respuesta a infecciones crónicas y rechazo de cuerpos extraños (Vignery 2005; Vignery 2008). En este nuevo apartado quisimos estudiar la posible presencia de otros eventos de fusión dentro del propio sistema hematopoyético. Además, aplicamos un modelo de inflamación, ya que recientemente se ha encontrado que el proceso inflamatorio es un potente inductor de la fusión celular (Johansson et al. 2008).

Para ello, generamos un modelo de quimeras dobles mediante trasplantes de médula ósea procedente de dos líneas de ratones donantes diferentes en ratones receptores C57BL/6 silvestres. Como donantes se usaron dos tipos de ratones transgénicos, uno que expresa de manera constitutiva GFP y un segundo que expresa RFP (Ver sección 1.2.4 y 1.2.5 de materiales y métodos), ambos en fondo C57BL/6. De esta forma podíamos detectar los eventos de fusión mediante la localización de células doble positivas para *GFP* y *RFP*.

Para que este abordaje experimental tuviese éxito tuvimos que realizar previamente cruces entre animales heterocigotos para las líneas GFP y RFP, de forma que obteníamos ratones hermanos que compartían el mismo fondo genético, pero que expresaran una sola de las dos fluorescencias (Figura 32). Esto fue comprobado mediante citometría de flujo de la médula ósea y sangre periférica previamente al trasplante (Figura 33 a-c). Al realizar los trasplantes con animales procedentes de la misma camada solucionamos el problema inicial que habíamos tenido de que solo implantaba aleatoriamente la médula ósea de uno de los dos donantes. El trasplante de dos médulas emparentadas compatibles permite que ambas aniden y obtengamos animales receptores silvestres con la presencia de células portadoras de ambas fluorescencias.

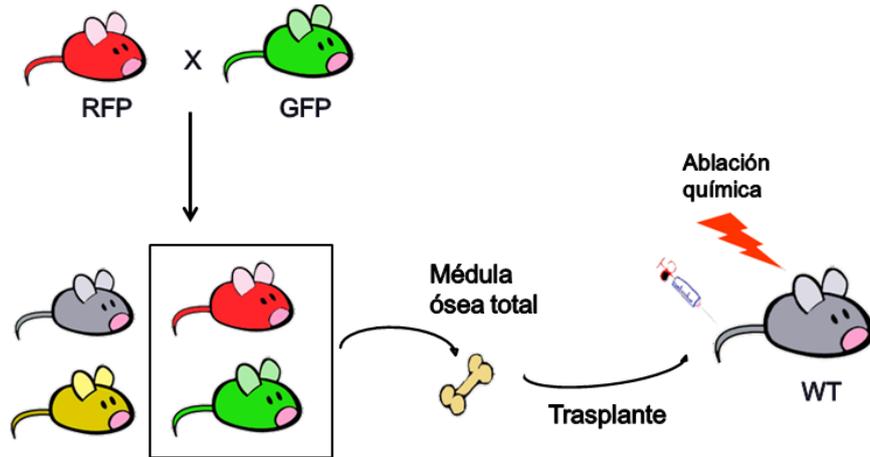


Figura 32.- Abordaje experimental. Realizamos un cruce entre un animal RFP y uno GFP. De los descendientes seleccionamos los que son únicamente RFP o GFP descartando los dobles positivos y negativos. Hacemos una extracción de la médula ósea total y la combinamos en proporción 1:1 que es trasplantado sobre un animal wt cuya médula ósea ha sido previamente ablacionada químicamente.

3.1 Análisis de la fusión celular

3.1.1 Análisis de los órganos hematopoyéticos

Los animales dobles quiméricos fueron sacrificados a los cuatro meses de haber realizado el trasplante. Para comprobar los eventos de fusión (dobles RFP/GFP positivos) en los diferentes órganos hematopoyéticos empleamos técnicas de citometría de flujo en muestras de sangre, bazo y médula ósea. Durante los estudios citométricos fuimos especialmente cautos y siempre se realizó una corrección para evitar que dos células no fusionadas que pasaran juntas por el láser no se detectaran por error como un evento de fusión (corrección de dobletes, ver sección 4.3.4.2.2 de materiales y métodos). El análisis por FACS detectó la presencia reiterada y consistente de células fusionadas en todas las muestras analizadas a los cuatro meses del trasplante (Figura 33, D-F). El porcentaje medio de células fusionadas en sangre fue de un $0,425 \pm 0,103$, un $0,3 \pm 0,081$ en bazo y un $0,075 \pm 0,025$ en médula ósea.

Para asegurarnos que estas células eran realmente doble positivas para *GFP* y *RFP* y ahondar en su análisis, procedimos a su aislamiento con la ayuda de un sorter y posteriormente las analizamos bajo el microscopio de fluorescencia, tras realizarse una tinción con DAPI para visualizar su núcleo. La visualización por microscopía verificó que estas células presentaban ambos marcadores (Figura 34).

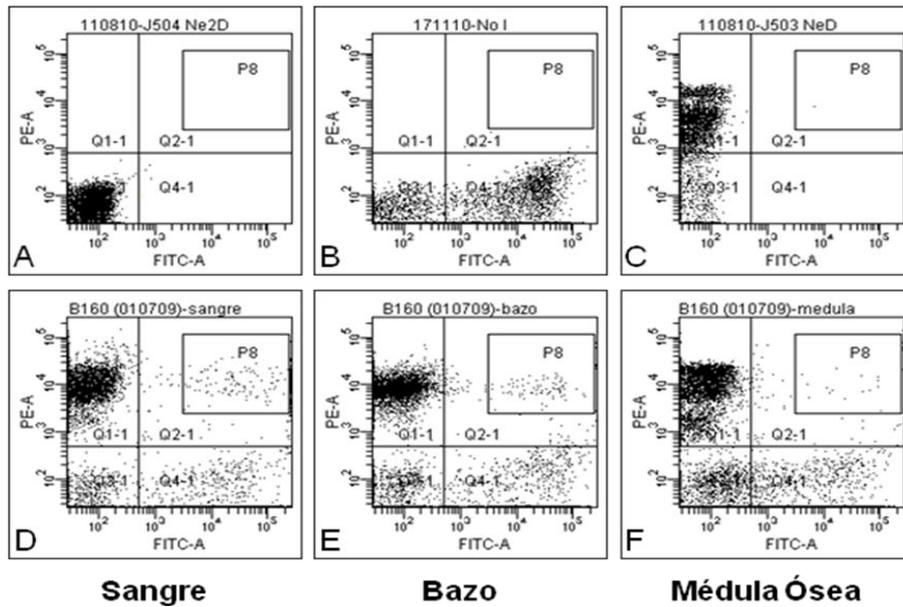


Figura 33.- Análisis por citometría de flujo de sangre de los animales receptores y donantes, y de sangre, bazo y médula ósea de los receptores una vez trasplantados. En los gráficos mostrados se representa en el eje de las X la fluorescencia GFP, mientras que en el eje de las Y se observa la fluorescencia RFP. La gráficas graficas A-C representan la sangre de un animal receptor sin trasplante, un donante GFP y un donante RFP respectivamente. En las gráficas D-F encontramos el análisis de sangre, bazo y médula ósea de un animal receptor tras el trasplante.

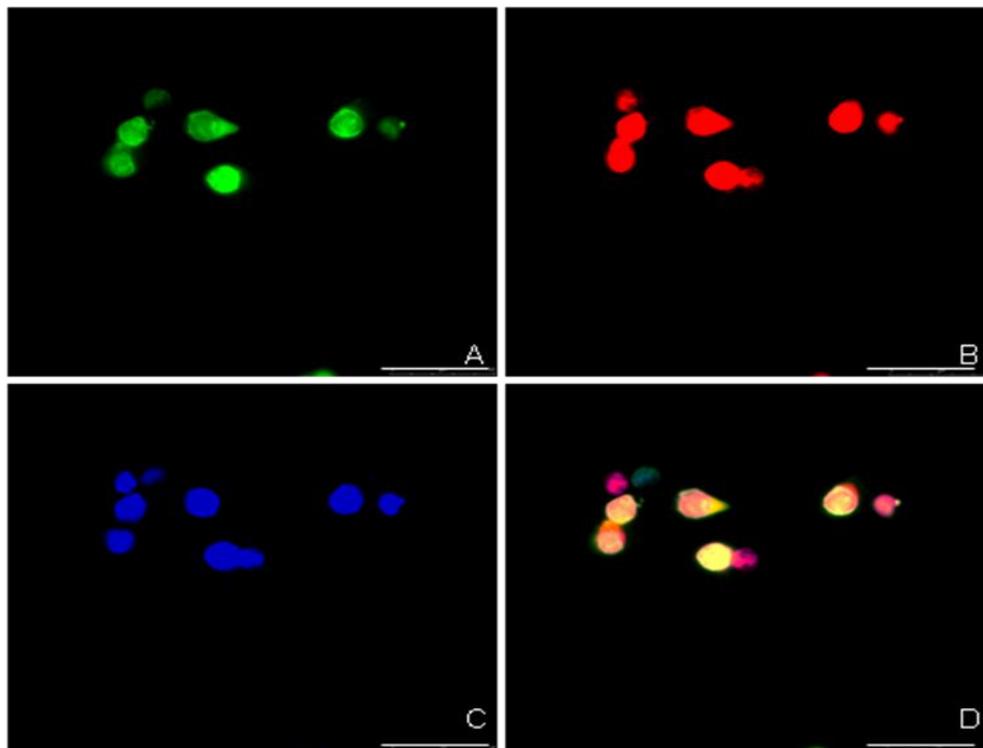


Figura 34.- Microscopía de fluorescencia de las células de sangre sorteadas. A: células positivas para GFP, B: células positivas para RFP, C: núcleos marcados con DAPI, D: unión de las imágenes anteriores. La barra representa 25 μ m.

Además, la presencia de un solo núcleo nos hizo pensar que estas células eran sincariones o que podían haber sufrido una mitosis reductiva (Yamanaka et al. 2010). Ello nos llevó a realizar un análisis de FACS empleando DRAQ5, un marcador que permite la cuantificación de ácidos nucleicos (Véase sección 4.3.4.2.1 de materiales y métodos). Este método permitió medir la cantidad de ADN que portaban las células dobles positivas, ya que al provenir de la fusión de dos células diferentes era muy probable que presentaran un mayor contenido de ADN (de 2n pasarían a 4n).

Al analizar los datos encontramos que las células que eran positivas para uno solo de los marcadores de fluorescencia o para ninguno de ellos presentaban valores de intensidad media de $62.49 \pm 1,43$ u.a., frente al de las células dobles positivas que era de un $121,43 \pm 13.91$ u.a., prácticamente el doble (Figura 35). Este dato confirmó el incremento en ADN asociado a una fusión nuclear y corroboró que eran sincariones, cuyo origen se debía a eventos de fusión. Como se ha mencionado anteriormente, para otros órganos como el hígado o el cerebelo, las células fusionadas son capaces de formar sincariones estables (Ringertz et al. 1976; Pomerantz et al. 2004; Cowan et al. 2005).

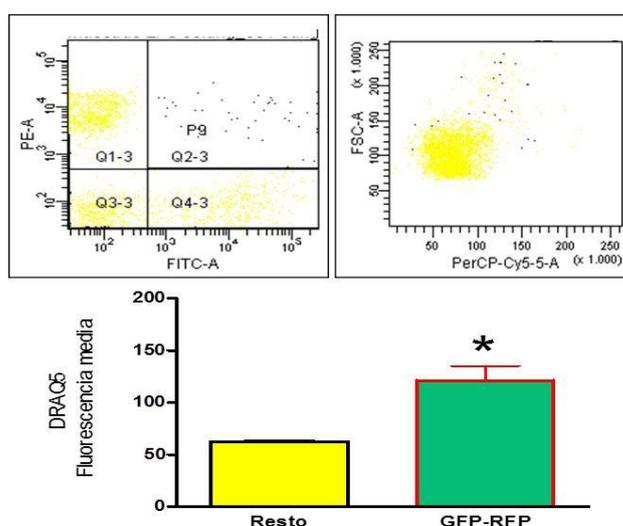


Figura 35.- Estudio del material genético mediante citometría de flujo. El primer gráfico nos muestra las células GFP en el eje de las X y las RFP en el eje de las Y, representando las dobles positivas en el cuadrante Q2-3 marcadas en negro. En el segundo gráfico podemos ver el marcaje para DRAQ5 en el eje de las X frente al tamaño celular en el eje de las Y. Siguiendo con el marcaje del gráfico anterior podemos ver las dobles positivas para GFP y RFP en negro frente al resto representadas en amarillo. En la gráfica podemos ver la representación numérica para el DRAQ5 de las células doble positivas Para GFP y RFP frente al resto de células de la sangre.

Con el fin de caracterizar la población de células fusionadas realizamos una batería de inmunocitoquímicas para diferentes marcadores específicos de linaje

(Véase sección 6.3.3 de materiales y métodos). En sangre encontramos que el $33,47 \pm 0,90\%$ de las células fusionadas eran positivas para el marcador de macrófagos Mac1, un $23,20 \pm 0,95\%$ eran positivas para el marcador de neutrófilos Gr1, un porcentaje del $48,03 \pm 1,27$ era positivo para el marcador de linfocitos maduros IgM y también encontramos un porcentaje del $14,73 \pm 0,89$ linfocitos positivos para el marcador NK1.1 característico de célula *natural killer* (Figura 35).

En el bazo observamos un alto porcentaje de linfocitos CD4 positivos ($87,30 \pm 3,31\%$) frente a un bajo porcentaje de linfocitos CD8 positivos ($2,93 \pm 1,05\%$). El porcentaje de linfocitos inmaduros CD4/CD8 positivos fue del $3,57 \pm 0,44$. Como cabría esperar, en el timo el porcentaje de linfocitos CD8 positivos se vio incrementado hasta el $10,27 \pm 2,05$ sin embargo no encontramos células dobles positivas para GFP y RFP (Figura 36).

Con este análisis pudimos ver que hay eventos de fusión en la mayoría de células derivadas del sistema hematopoyético

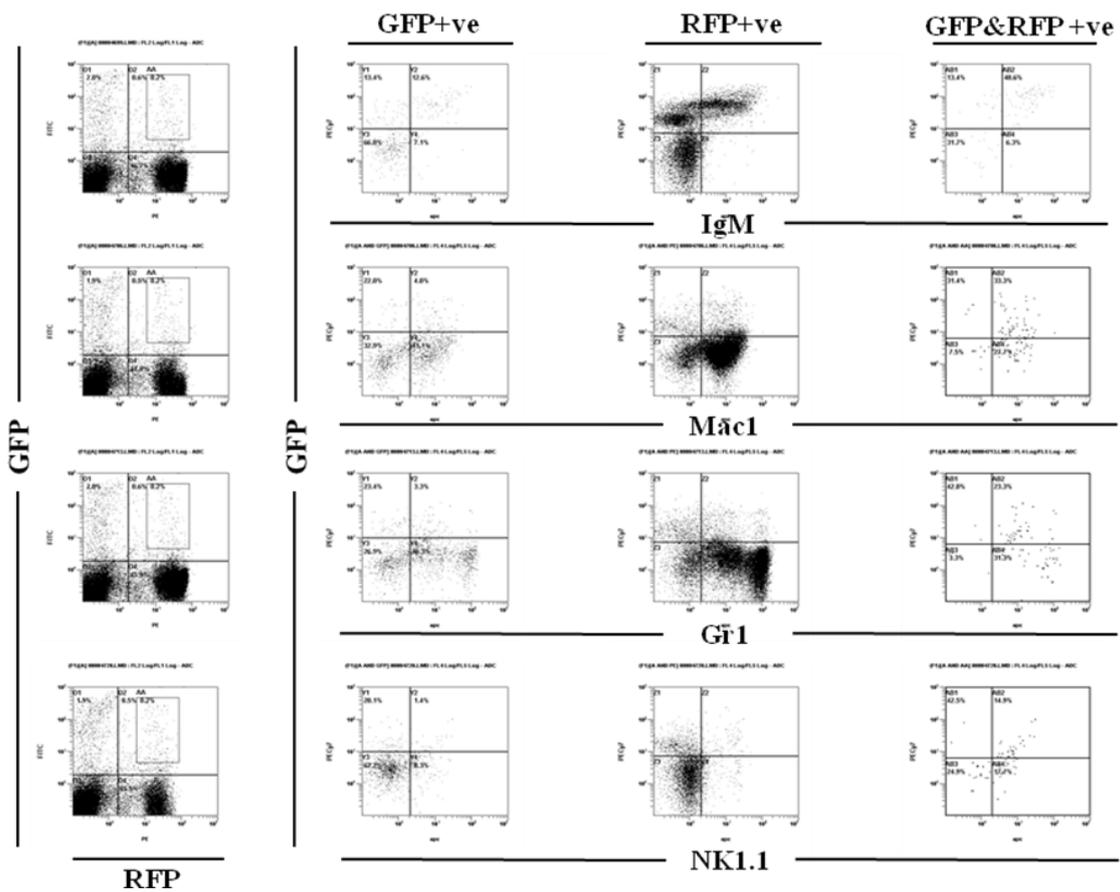


Figura 36.- Inmunocitoquímica para caracterizar por citometría de flujo las células fusionadas en la sangre. En la primera columna de gráficas se representan las células RFP (eje de las X) frente a las GFP (eje de las Y) de animales trasplantados con ambas médulas. El resto de columnas muestran de izquierda a derecha animales trasplantados con médula GFP, RFP o con ambas. En estas mismas se representa el marcador GFP en la columna de las Y, mientras que representan en el eje de las X de la fila superior a la

inferior los marcadores IgM, Mac1, Gr1 y NK1.1.

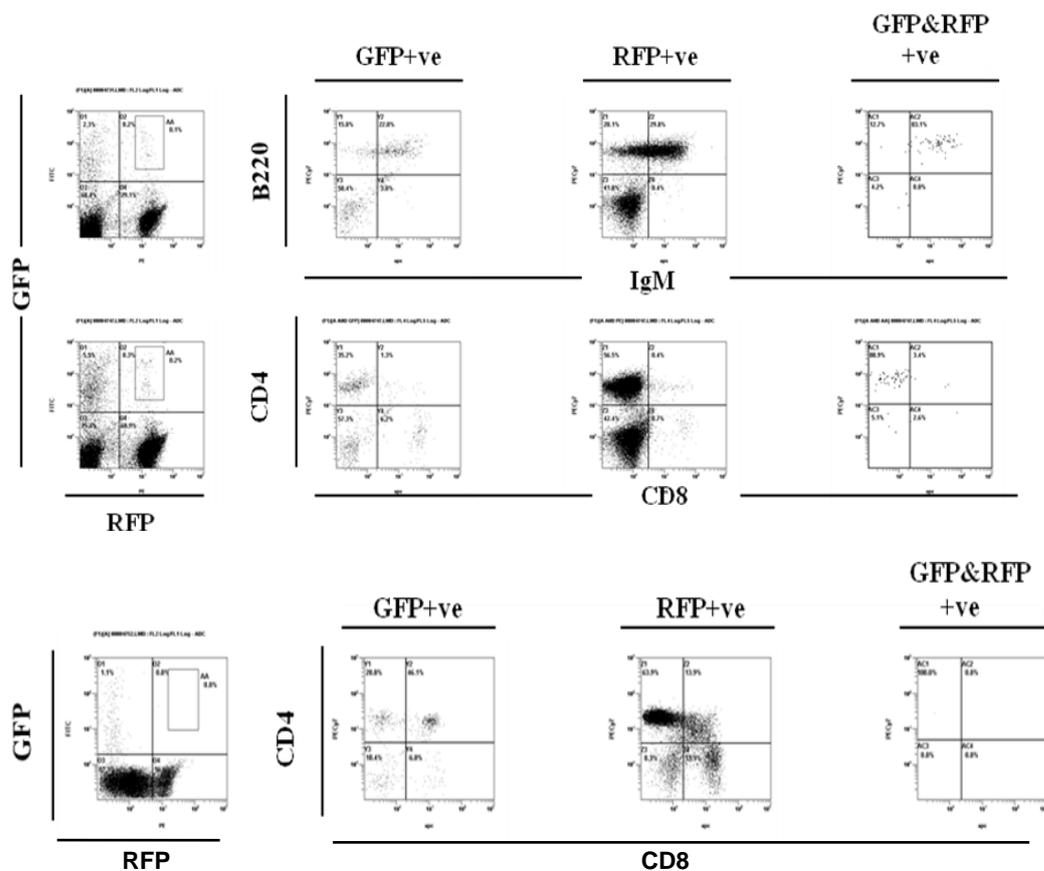


Figura 37.- Inmunocitoquímica para caracterizar las células fusionadas en bazo y timo. En la primera columna de gráficas se representan las células RFP (eje de las X) frente a las GFP (eje de las Y) de animales trasplantados con ambas médulas. El resto de columnas muestran de izquierda a derecha animales trasplantados con médula GFP, RFP o con ambas. Podemos ver representado en la primera fila los marcadores IgM (eje X) frente a B220 (eje Y), mientras que en las otras dos se representa el marcador CD8 (eje X) frente al marcador CD4 (eje Y).

3.1.2 Análisis de vasos sanguíneos, cerebelo e hígado

A continuación hicimos un estudio histológico de los diversos órganos de los animales previamente analizados, que incluyó: ojos, hígado, riñón, corazón, pulmón, telencéfalo y cerebelo. Con ello pretendíamos verificar la presencia de células fusionadas en regiones en las que ya se había reportado anteriormente, para así tener un control positivo del proceso de fusión. Además, esto nos permitía encontrar posibles eventos de fusión dobles en el parénquima de otros órganos. En todos ellos fuimos capaces de localizar células simples positivas para GFP o RFP, pero a excepción de hígado y cerebelo, siempre estuvieron localizadas en las zonas de acúmulo de sangre dentro de los vasos sanguíneos. Interesantemente, en estos acúmulos encontramos reiteradamente células doble positivas entre las células

sanguíneas que ocupaban los vasos (Figura 38).

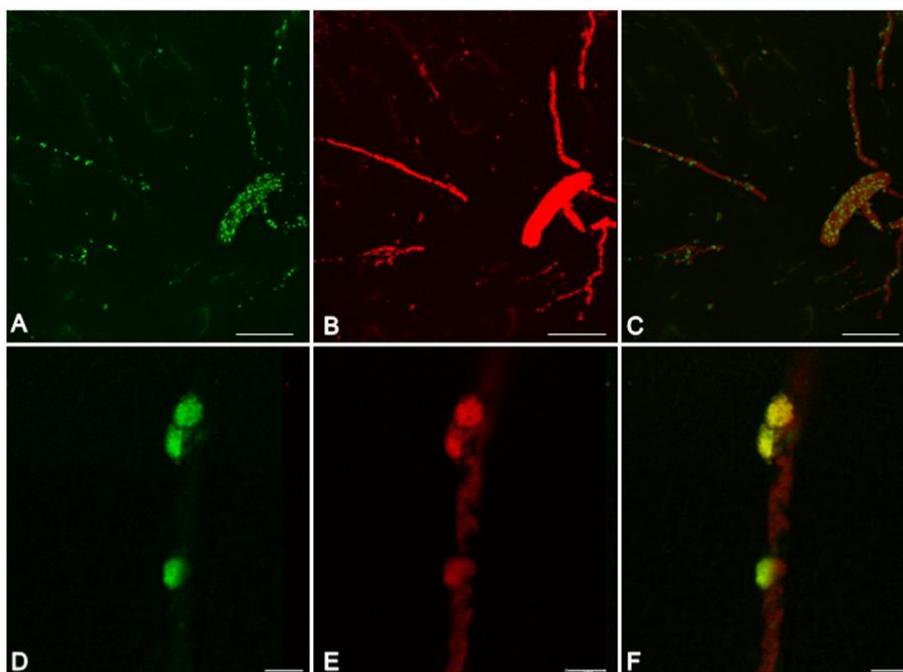


Figura 38.- Análisis histológico de los vasos del hígado. Figura A-C: una imagen general de los vasos en el hígado. La barra representa 250 μm . Figuras D-F: un detalle de un vaso, la barra representa 25 μm . A y D: células positivas para GFP, B y E: células positivas para RFP, C y F: en amarillo las células doble positivas.

Como hemos mencionado, únicamente en el caso del cerebelo e hígado encontramos células características de dichos órganos positivas para uno de los dos marcadores fluorescentes (Figura 39). En el caso del hígado observamos hepatocitos, y en el cerebelo neuronas de Purkinje. En algunas de estas células identificamos dos núcleos, lo que nos confirma su origen por fusión celular y no transdiferenciación, como se ha reportado extensamente en la literatura (Alvarez-Dolado et al.). También se ha descrito previamente que las células con origen hematopoyético, así como específicamente las de la línea mielomonocítica son capaces de fusionar con hepatocitos (Willenbring et al. 2004; Fujino et al. 2007), lo cual concuerda con la presencia de hepatocitos positivos tanto para marcaje GFP como RFP. Por último, no encontramos ningún hepatocito ni neurona de Purkinje con marcaje doble positivo para GFP y RFP.

Gracias a trabajos anteriores de nuestro grupo, y de otros encontrados en la literatura, sabemos que los eventos de fusión, tanto naturales como inducidos, aumentan con la edad (Magrassi et al. 2007; Wiersema et al. 2007). Ello nos llevó a preguntarnos si los eventos de fusión celular encontrados en la sangre aumentarían

con el paso del tiempo. Para estudiarlo, realizamos un estudio comparativo mediante FACS en sangre periférica a distintos tiempos tras el trasplante, comprobando que el porcentaje de células fusionadas se incrementaba paulatinamente con la edad (Figura 40, A), pasando de un $0,425 \pm 0,103$ a los cuatro meses del trasplante a un $1,256 \pm 0,183\%$ a los 14 meses tras el trasplante, lo que supone un incremento de prácticamente tres veces. Para comprobar si ocurría lo mismo en bazo y médula ósea se sacrificó un grupo de animales a los 14 meses tras el trasplante y obtuvimos datos consistentes para el incremento de células fusionadas en ambos órganos (Figura 40, BC). En el caso del bazo se duplicó el porcentaje, pasando de un porcentaje del $0,3 \pm 0,08$ a un $0,67 \pm 0,12$, mientras que en el caso de la médula ósea se triplicaba el porcentaje de células fusionadas, pasando de un $0,07 \pm 0,02$ a un $0.20 \pm 0,04$.

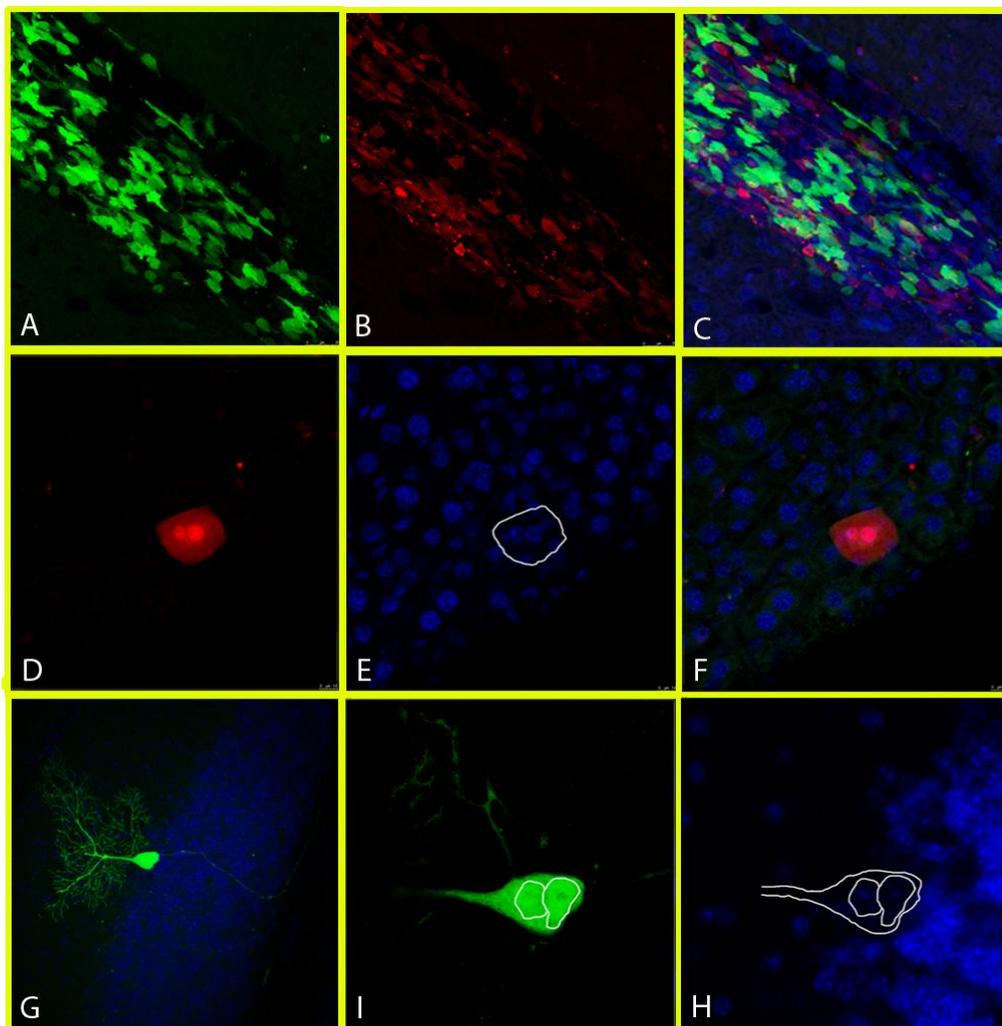


Figura 39.- Análisis del hígado y cerebelo mediante microscopía de fluorescencia. A-C: vaso sanguíneo en hígado (A) marcaje GFP, (B) marcaje RFP, (C) unión de A y B. D-E: hepatocito RFP positivo con dos núcleos, (D) marcaje RFP, (E) Dapi, (F) unión D y E. G-H: neurona de Purkinje con dos núcleos, (G) neurona de Purkinje GFP positiva, (I) Detalle del soma de la neurona de Purkinje con representación de los núcleos, (H) DAPI y representación del soma de la neurona de Purkinje.

Indicar que el aumento de eventos de fusión con la edad puede explicarse debido a que las células fusionadas son estables y funcionales, lo que les permite continuar con su vida media una vez fusionada. Hay autores que postulan que, en otros órganos como el cerebro, uno de los dos núcleos es rápidamente inactivado, lo que permitiría que la célula continuase con un metabolismo funcional (Cowan et al. 2005; Magrassi et al. 2007). De esta forma, con el tiempo van produciéndose más eventos de fusión sumándose a las células ya fusionadas y funcionales que permanecen en los órganos hematopoyéticos, lo que explicaría este aumento de células fusionadas con la edad (Kemp et al. 2014). Sin embargo, esta explicación en el caso de la sangre, en donde la vida media de los diferentes componentes celulares suele ser corta, puede no ser suficiente. No deben descartarse otros mecanismos que faciliten la fusión celular. Ciertos factores que en animales envejecidos puedan modular y favorecer los eventos de fusión, como por ejemplo aquellos asociados a un estadio crónico de inflamación, muy habitual en edades avanzadas (Fulop et al. 2015).

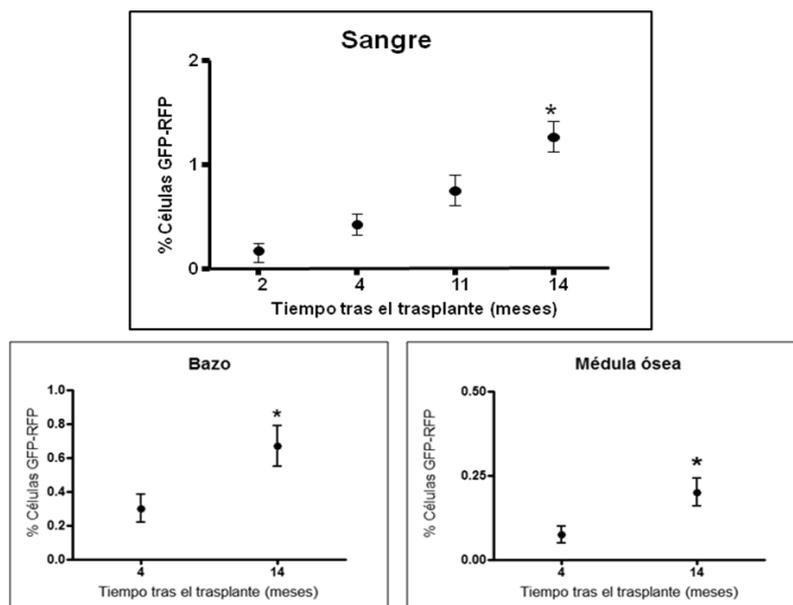


Figura 40.- Variaciones en el tiempo de los eventos de fusión en sangre, bazo y médula ósea. Se observa un crecimiento en los porcentajes de células dobles positivas para los marcajes GFP y RFP en estos órganos.

3.2 Fusión celular e inflamación

En 2008, *Johansson et al.* demostraron que la fusión entre células hematopoyéticas y las neuronas de Purkinje se incrementaba cuando el animal era sometido a un proceso de inflamación crónica (Johansson et al. 2008). A partir de entonces se han publicado varios trabajos que demuestran la relación entre fusión

celular e inflamación, tanto en hepatocitos, como neuronas de Purkinje, intestino, músculo esquelético o cardiomiocitos (Nygren et al. 2008; Davies et al. 2009; Espejel et al. 2009).

Para comprobar si un episodio crónico de inflamación podría tener un efecto sobre los niveles de fusión dentro del propio sistema hematopoyético, realizamos un tratamiento a los animales dobles quiméricos con el péptido pro-inflamatorio LPS durante dos meses. Posteriormente, sacrificamos un primer grupo de animales tras la última administración del péptido y un segundo grupo a los cuatro meses. El motivo de analizar dos tiempos fue comprobar que, en caso de encontrarse alguna variación en los niveles de fusión, se mantiene en el tiempo o desaparecen tras eliminarse el estímulo inflamatorio o por el contrario queda un remanente de células fusionadas. Como grupo control usamos animales a los que se les administró únicamente suero fisiológico (Figura 41).



Figura 41.- Esquema del experimento. Los animales son trasplantados el día que nacen. De los 60 a 120 días de vida son sometidos al tratamiento con LPS. Las edades de sacrificio son a los 120 o 240 días.

3.2.1 Análisis de los órganos hematopoyéticos

En el primer grupo de animales, sacrificados nada más terminar el tratamiento con LPS, encontramos un incremento significativo respecto a su control (ANOVA tukey Y TSTUDENT) en el porcentaje de células fusionadas, tanto en sangre como en bazo. Sin embargo, no observamos dicho incremento en la médula ósea. En sangre encontramos un incremento que triplico el número de células fusionadas, pasando de un porcentaje del $0,42 \pm 0,10$ a un $1,40 \pm 0,47$, mientras que en bazo observamos un porcentaje medio del $0,3 \pm 0,08$ en el grupo control frente a un $0,62 \pm 0,11$ en el grupo tratado, duplicando así su valor. Por el contrario, en la médula ósea encontramos valores idénticos en ambos grupos $0,075 \pm 0,025$. Estos datos pueden observarse en la figura 42.

En el segundo grupo de animales, analizado cuatro meses después de la última administración del LPS, se apreció un incremento en el porcentaje medio de células fusionadas en sangre, si bien este incremento no fue estadísticamente significativo. Los valores en la sangre fueron de un $1,27 \pm 0,14\%$ en el grupo control frente a un $2,14 \pm 0,41\%$ en el grupo LPS. De forma similar, en el bazo y la médula ósea no se

apreciaron diferencias relevantes. En el bazo observamos un ligero descenso de la media pasando a ser de $0,66 \pm 0,12$ % a un $0,62 \pm 0,18$ %, mientras que en la médula ósea obtuvimos un porcentaje del $0,20 \pm 0,04$ en el grupo control frente a un $0,22 \pm 0,07$ en el grupo tratado con LPS. Estos datos quedan reflejados en la figura 42.

Los datos demuestran que un proceso de inflamación crónica aumenta significativamente los eventos de fusión en sangre y bazo, mientras que no ocurre en la médula ósea. Y aunque con el tiempo siguen habiendo cierta tendencia no significativa en sangre, probablemente los eventos de fusión lleguen a igualarse al grupo control si pasa el tiempo necesario, al igual que ocurre en el bazo. A su vez, estos datos son consistentes con los datos mostrados anteriormente, en los cuales demostrábamos que los eventos de fusión aumentaban con la edad en sangre, bazo y médula ósea bajo condiciones control.

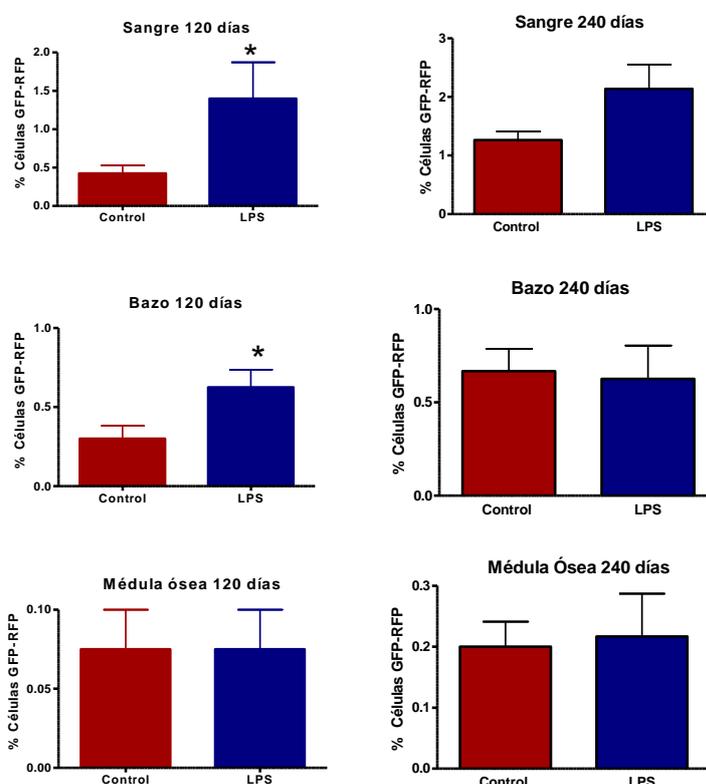


Figura 42.- Comparativa de porcentajes células GFP-RFP en sangre, Bazo y médula ósea a los 120 y 240 días, con o sin tratamiento con LPS. En la primera columna de gráficas se representa a los animales sacrificados a 120 días y en la segunda columna de gráficas los animales sacrificados a 240 días. En rojo se representan los animales sin tratamiento con LPS y en azul los animales que recibieron el tratamiento.

3.2.2 Análisis de cerebelo e hígado

Basándonos en los resultados que encontramos previamente y en la bibliografía (Alvarez-Dolado et al. 2003; Vassilopoulos et al. 2003), analizamos el cerebelo e

hígado buscando eventos de fusión con hepatocitos o neuronas de Purkinje. Encontramos que en ambos grupos, independientemente del momento de su sacrificio, se produce un incremento en el número de neuronas de Purkinje y hepatocitos que expresan uno de los dos marcadores fluorescentes respecto a los grupos control. El grupo sacrificado nada más terminar el tratamiento con LPS (a los cuatro meses del trasplante) presentó un incremento no significativo del doble de neuronas de Purkinje, pasando de una media por animal de $3 \pm 2,12$ a una media de $6,5 \pm 2,62$. En este mismo grupo los hepatocitos positivos para la fluorescencia por animal pasaron de una media de $48,25 \pm 13,87$ en los animales control a $132,00 \pm 18,40$ en los animales tratados con LPS, lo que supone un incremento significativo de más del doble de hepatocitos fusionados.

De igual forma, el grupo sacrificado cuatro meses después de recibir el tratamiento de LPS también presentó un claro incremento significativo tanto en el número de neuronas de Purkinje como en el de hepatocitos fluorescentes. La media de neuronas de Purkinje fluorescentes observadas en el grupo control fue de $10,50 \pm 1,50$, mientras que en el grupo tratado prácticamente se cuadruplicó, presentando una media de $39,75 \pm 6,52$ por animal. Por su parte, el número de hepatocitos fluorescentes se incrementó desde una media de $66,75 \pm 15,50$ en el grupo control a $159,60 \pm 10,71$ en el grupo tratado, más del doble (figura 43. Estos datos fueron analizados estadísticamente usando un test t-student).

La presencia de dos núcleos en parte de estas células fluorescentes nos indica que han sufrido eventos de fusión celular con células derivadas de la médula ósea trasplantada, descartando así su origen por transdiferenciación a partir de células derivadas de la médula ósea o que la presencia de ambas fluorescencias pueda ser explicada por transferencia a través de microvesículas. Aunque no todas las células presentaban dos núcleos se sabe que las células son capaces de fusionar núcleos y regularse (Cowan et al. 2005). Los hepatocitos incluso pueden sufrir una reducción en su poliploidía tras un evento de fusión {Duncan, 2009 #200}.

Mientras que la fusión de hepatocitos y neuronas de Purkinje con células derivadas de la médula ósea se conoce desde 2003 (Alvarez-Dolado et al. 2003; Vassilopoulos et al. 2003; Bae et al. 2005) posteriormente se ha demostrado que las células hematopoyéticas, y más concretamente las del linaje mielomocítico son capaces de fusionar con hepatocitos (Camargo et al. 2004; Willenbring et al. 2004; Fujino et al. 2007).

El hecho de que tanto el número de las neuronas de Purkinje como los hepatocitos fusionados aumenten considerablemente con el tiempo mientras que en la

sangre y bazo este incremento es mucho más sutil puede ser explicado debido a la vida media de los diferentes tipos celulares. Mientras que los hepatocitos y sobre todo la neuronas de Purkinje presentan una vida media prolongada, la de las células hematopoyéticas es realmente corta en comparación con las anteriormente mencionadas, con lo que a lo largo del tiempo, aunque se pudiesen producir más eventos de fusión en el sistema hematopoyético, estos también desaparecerían a una mayor velocidad, observándose un incremento mucho más sutil.

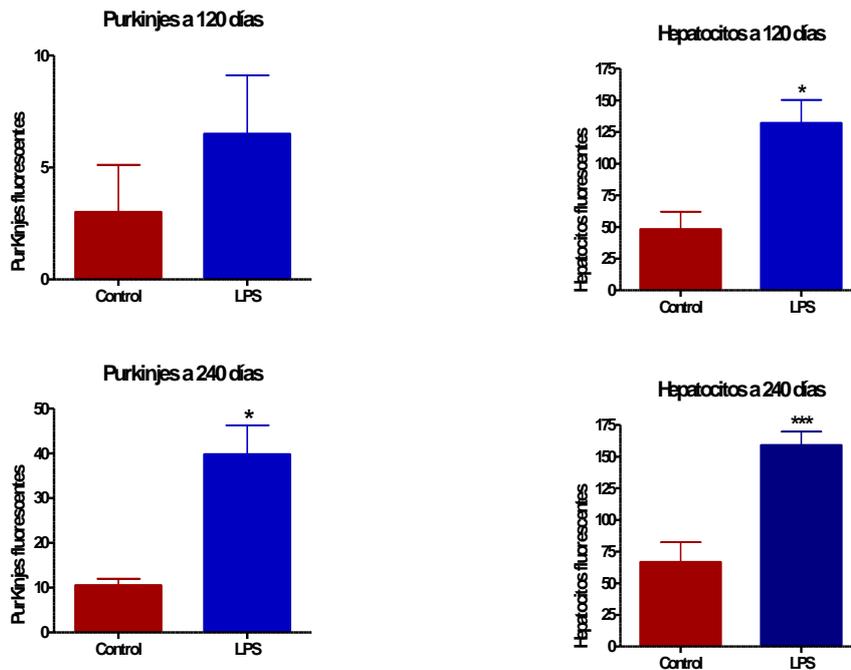


Figura 43.- Representación gráfica del número de neurona de Purkinje y hepatocitos fluorescentes en animales sometidos a un proceso inflamatorio. A la izquierda se muestran los gráficos con el recuento de las neuronas de Purkinje a las dos edades de sacrificio, 120 y 240 días. A la derecha el recuento de hepatocitos fluorescentes a las mismas edades de sacrificio. En rojo se representa el grupo control y en azul el sometido al proceso inflamatorio. (*: grado de significancia del 0,05, ***: grado de significancia 0,001).

Al igual que en nuestro trabajo, estudios recientes demuestran que los procesos inflamatorios juegan un papel muy importante en el incremento de estos eventos de fusión que se dan de manera natural entre células derivadas de la médula ósea y hepatocitos o neuronas de Purkinje (Wiersema et al. 2007; Johansson et al. 2008; Nygren et al. 2008; Espejel et al. 2009). Se ha descrito que la inducción de inflamación mediante una encefalitis severa resulta en un incremento de 100 veces en los eventos de fusión en las neuronas de Purkinje en el cerebelo (Nygren et al. 2008) y la inflamación asociada al daño producido por la rotura de la barrera hematocefálica tras la radiación también produce un incremento en la fusión celular en el cerebro

(Espejel et al. 2009). Así mismo, si se suministran drogas o antibióticos que inhiben la inflamación asociada a la radiación, este incremento en los eventos de fusión es inhibido (Espejel et al. 2009). Nuestros experimentos junto con los datos previamente descritos sugieren contundentemente que hay factores implicados en la respuesta inflamatoria que directamente inducen la fusión celular, entre los que se podrían sugerir diferentes interleuquinas proinflamatorias.

La relación entre la fusión celular y el cáncer genera una gran preocupación (Alvarez-Dolado et al.). Pese a que la fusión celular no es un inductor directo del cáncer, su papel en la progresión tumoral está claramente documentada (Duelli et al. 2003; Duelli et al. 2007). La fusión celular puede conferir nuevas propiedades a la nueva célula generada (Duelli et al. 2003; Lu et al. 2009), promoviendo la progresión tumoral incrementando la malignidad en la célula híbrida resultante, amplificando su resistencia a drogas y contribuyendo a la diversidad tumoral (Barski et al. 1960; Warner 1975; Miller et al. 1989; Pawelek 2000). También se ha descrito que la fusión entre linfocitos o macrófagos con células tumorales pueden promover la aparición de tumores metastásicos (Mekler 1971; Mekler et al. 1971).

Finalmente, la fusión celular podría estar presente en el origen de las células madre tumorales (Lu et al. 2009). También se ha descrito la relación entre los virus y el cáncer a través de la fusión celular (Duelli et al. 2005; Duelli et al. 2007), lo que nos llevaría a implementar sistemas de seguridad en las células fusogénicas donantes para impedir su fusión celular o sus consecuencias

Con estos resultados concluimos que hay fusión celular dentro del sistema hematopoyético y que esta fusión celular se ve incrementada tras la generación de una inflamación crónica con *LPS*.

CONCLUSIONES

1 Ataxia cereberal

- La médula ósea contribuye a la formación de elementos neurales en el encéfalo de animales adultos, mayoritariamente microglía y en menor medida neuronas.
- La degeneración de las neuronas de Purkinje que sufren los animales mutantes para pdc 1J , ni el ambiente neurodegenerativo, promueven los eventos de fusión celular, ni inducen la formación de este tipo celular por parte de las células de médula ósea.
- El trasplante de médula ósea de un animal sano a un animal mutante (pcd 1J) se correlaciona positivamente con una mejora parcial en su actividad motora. Sin embargo, esta mejora no puede ser explicada por la aparición de nuevas neuronas de Purkinje, sino que parece relacionarse con el tono muscular del animal.

2 Accidente cerebrovascular

- La fusión celular participa activamente en la formación de tejido vascular a través de la formación de pericitos, tanto en condiciones normales como patológicas.
- Existe una subpoblación permanente de pericitos maduros que se generan por mecanismos de fusión celular en condiciones fisiológicas normales.
- La isquemia cerebral induce en casi cien veces el proceso de fusión celular de los pericitos. Ello promueve la presencia de nuevos pericitos jóvenes fusionados, que estabilizan los vasos sanguíneos y facilitan así la angiogénesis post-isquémica.

3 Sistema hematopoyético e inflamación

- Existen eventos de fusión celular dentro de las diversas poblaciones celulares que constituyen la sangre, así como en los órganos hematopoyéticos.
- Los eventos de fusión se producen en poblaciones celulares tanto de linaje mielóide como del linfóide.
- Los eventos de fusión celular dentro del sistema hematopoyético se ven incrementados con la edad.
- Un proceso de inflamación crónica induce la fusión celular de manera transitoria dentro del sistema hematopoyético.

PUBLICACIONES

La realización de esta tesis doctoral ha finalizado con la publicación de los siguientes artículos:

- Piquer-Gil, M., J. M. Garcia-Verdugo, et al. (2009). "Cell fusion contributes to pericyte formation after stroke." J Cereb Blood Flow Metab **29**(3): 480-5.
- Recio, J. S., M. Alvarez-Dolado, et al. "Bone marrow contributes simultaneously to different neural types in the central nervous system through different mechanisms of plasticity." Cell Transplant **20**(8): 1179-92.

Brief Communication

Cell fusion contributes to pericyte formation after stroke

Marina Piquer-Gil¹, José M García-Verdugo², Ivan Zipancic¹, María J Sánchez³ and Manuel Álvarez-Dolado¹

¹Laboratory of Cellular Regeneration, Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia, Spain; ²Laboratory of Cellular Morphology, Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia, Spain; ³Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, CSIC, Seville, Spain

Recent reports have shown that bone marrow-derived cells (BMDCs) contribute to the formation of vasculature after stroke. However, the mechanism by which mural cells are formed from BMDC remains elusive. Here, we provide direct evidence that the cell fusion process contributes to the formation of pericytes after stroke. We generated mouse bone marrow chimeras using a cre/lox system that allows the detection of fusion events by X-gal staining. In these mice, we detected X-gal-positive cells that expressed vimentin and desmin, specific markers of mature murine pericytes. Electron microscopy confirmed that fused cells possessed basal lamina and characteristics of pericytes. Furthermore, induction of stroke increased significantly the presence of fused cells in the ischemic area. These cells expressed markers of developing pericytes such as NG2. We conclude that cell fusion participates actively in the generation of vascular tissue through pericyte formation under normal as well as pathologic conditions.

Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism (2009) 29, 480–485; doi:10.1038/jcbfm.2008.150; published online 10 December 2008

Keywords: Pericytes; cell fusion; transdifferentiation; stroke; bone marrow transplant; mural cells

Introduction

Adult bone marrow-derived stem cells (BMDCs) represent a promising therapeutic agent for the treatment of damaged ischemic tissue (Tang *et al*, 2007). Numerous studies have reported significant functional improvements of stroke symptoms after BMDC transplant (Tang *et al*, 2007). In the past years, the exact mechanism by which these cells elicit recovery (e.g., secretion of trophic/growth factors, cell fusion, or transdifferentiation) has been extensively investigated. Thus, it has been reported that BMDC secrete cytokines and growth factors that promote angiogenic and neurorestorative processes (Chen and Chopp, 2006). Moreover, several studies have shown the contribution of BMDC or hematopoietic stem cells to the formation of vasculature after stroke, including the generation of endothelial cells (ECs; Bailey *et al*, 2006) and mural cells (Kokovay *et al*, 2006; Rajantie *et al*, 2004). Some of them have shown definitively that EC are generated

by transdifferentiation and not by cell fusion (Bailey *et al*, 2006). However, the mechanism by which mural cells are formed remains elusive. Therefore, we postulated that cell fusion might be implicated in the generation of perivascular cells under normal conditions and after stroke. To test this hypothesis, we performed BMDC transplants with cells constitutively expressing Cre from a ubiquitous actin-driven promoter into neonatal recipient mice of the reporter strain R26R, in which LacZ is only expressed after excision of a loxP-flanked stop cassette by Cre-mediated recombination. This system allows us to detect fusion events (Álvarez-Dolado *et al*, 2003) before and after stroke induction.

Materials and methods

Animals and Bone Marrow Transplants

Animal procedures were performed in accordance with the Spanish legislation (RD 1201/05) and under the guidelines of the CIPF animal care committee. Neonatal chimeras were generated as described previously (Yoder *et al*, 1996). Briefly, busulfan (20 mg/mL in PBS containing 1% dimethyl sulfoxide; Sigma, Madrid, Spain, B2635) was injected i.p. at a dose of 15.5 mg/kg to pregnant R26R dams at 17.5

Correspondence: Dr M Álvarez-Dolado, Laboratory of Cellular Regeneration, Centro de Investigación Príncipe Felipe, Av. Autopista del Saler 16-3, Valencia 46013, Spain.
E-mail: mdolado@cipf.es

Received 21 August 2008; revised 17 November 2008; accepted 17 November 2008; published online 10 December 2008

and 18.5 gestational days, for sublethal conditioning of the future pups. The newborn busulfan-conditioned R26R mice were transplanted, via maxillofacial vein, with 50 μ L of a BMDC suspension (2×10^5 cells/ μ L) from 8- to 10-week-old mice expressing Cre recombinase under the control of the hybrid regulatory element cytomegalovirus enhancer/ β -actin promoter. For further explanation of the cell fusion detection system by X-gal using these mouse lines see Supplementary information.

Unilateral Cerebral Hypoxia–Ischemia

At 2 months after BMDC transplant, we induced a hypoxia–ischemia episode by occlusion and posterior reperfusion of carotid artery (Qi *et al*, 2004). For detailed explanation of the procedure see the Supplementary Information.

Histology, Electron Microscopy, and Quantifications

Bone marrow-derived cell-transplanted mice (2 months old), and ischemic BMDC-transplanted mice (2.5 months old, 2 weeks after stroke) with the correspondent sham-operated controls (2.5 months old) were anesthetized and transcardially perfused with 40 mL of 2% paraformaldehyde plus 0.25% glutaraldehyde. Brains were dissected and serially cut in 12 series of 50- μ m vibrotome sections. For detailed description of X-gal staining, electron microscopy, and immunohistochemistry see the Supplementary information. Cell counting was performed in 10 brain sections, serially separated each one 600 μ m, what corresponds to approximately one-twelfth of the whole forebrain. The samples were analyzed with a DM6000B microscope (Leica), using 10, 20, and 63X Plan-Neofluar objectives. Digitized images were obtained with a DFC480 digital camera and IM500/FW4000 image manager software (Leica).

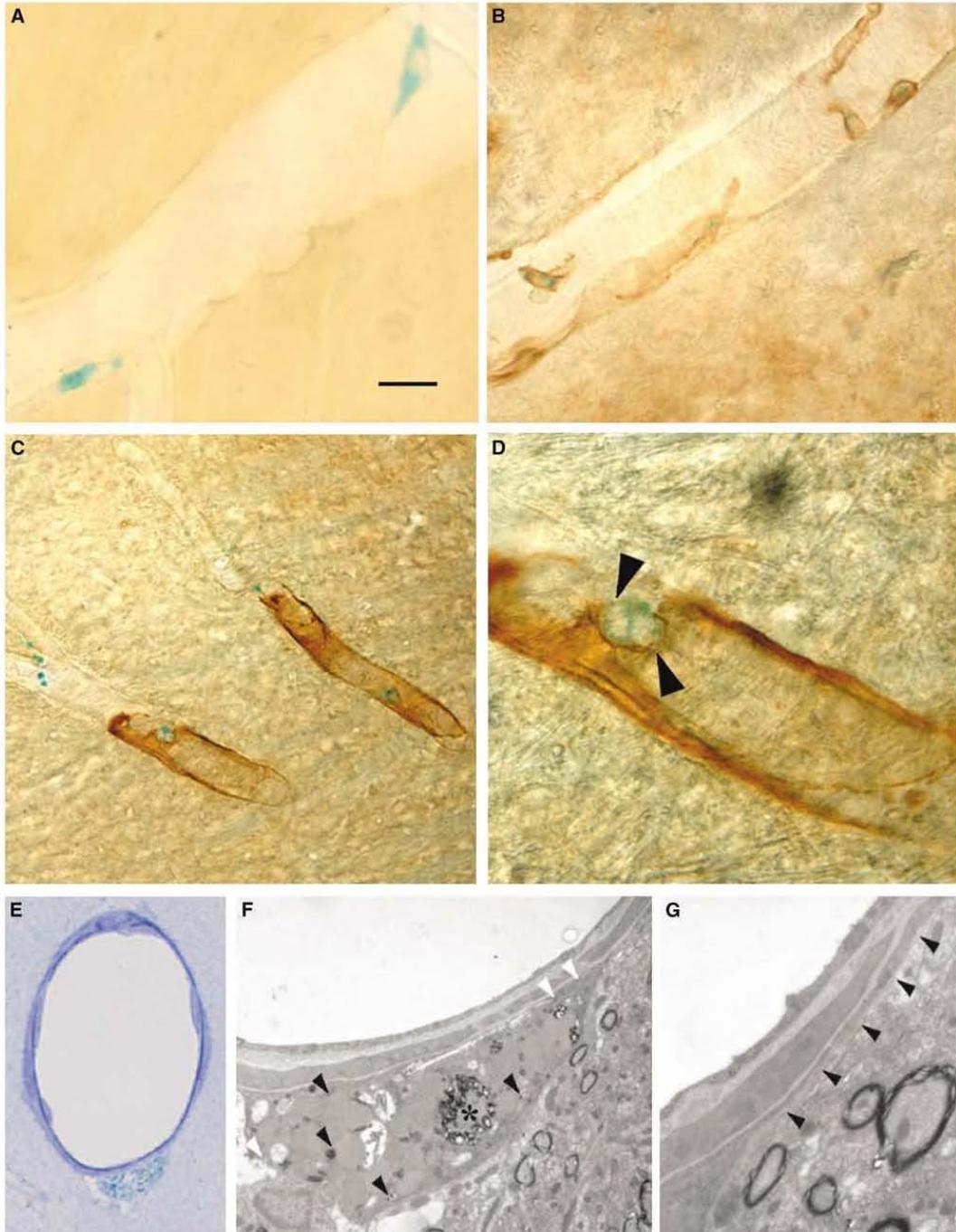
Results

To study the possible contribution of the cell fusion process to vasculogenesis, we analyzed the brains of chimeric R26R mice reconstituted with BMDC-expressing Cre under the control of β -actin promoter. This transplant strategy allows the detection of fused cells by X-gal staining (see Materials and methods section) (Alvarez-Dolado *et al*, 2003). At 2 months after the BMDC transplant, we observed X-gal-positive cells associated with the vasculature in the brains of chimeric mice (Figure 1A). Their frequency was 251 ± 76 cells/brain ($n=5$), distributed uniformly throughout the areas of the brain. Interestingly, $13.3 \pm 8.4\%$ of these cells contained two nuclei (Figures 1C and 1D), further supporting their formation by cell fusion. The presence of single nucleated X-gal-positive cells can be explained by the later formation of synkaryons, or

the generation of new progeny after reductive mitosis (Alvarez-Dolado, 2007).

The morphology and location of the fused cells, always adjacent to endothelium and away from the lumen, resembled those of perivascular macrophages or pericytes. To further define the nature of these cells, we performed immunohistochemical analysis. The majority of the X-gal-positive cells coexpressed markers for mature, differentiated rodent pericytes (vimentin: $83.4 \pm 7.1\%$, Figure 1B; desmin: $78.6 \pm 9.9\%$, Figures 1C and 1D; smooth muscle α -actin: $74.8 \pm 6.6\%$), or CD45 ($32.6 \pm 6.3\%$), a marker of perivascular macrophages. These data suggested the existence of a population of fused cells that coexpress CD45 and markers of mature pericytes. To confirm this possibility, we performed a triple desmin/CD45/ β -galactosidase immunofluorescent colocalization. After analysis, we observed that $12.7 \pm 2.6\%$, of the β -galactosidase-positive cells coexpressed CD45 and desmin. This suggests that a small population of fused pericytes may be keeping the expression of markers from both fusion partners, what indicates that one of them should be of hematopoietic lineage. In contrast, most of the fused cells were negative for the developing pericyte marker NG-2 ($0.6 \pm 0.4\%$). In addition, we never observed cells that were positive for both X-gal and CD-31, or von Willebrand factor (data not shown), excluding the possibility that fused cells were endothelial. This is consistent with previous reports showing that EC are generated by transdifferentiation of hematopoietic stem cells and not by cell fusion (Bailey *et al*, 2006).

The immunohistochemical data strongly suggested that, under normal conditions, cell fusion contributes to the generation of mature pericytes and perivascular macrophages. However, none of the markers we used are absolutely specific for pericytes, neither do they recognize all pericyte populations (Ozerdem and Stallcup, 2003; Tigges *et al*, 2008). Furthermore, after cell fusion, genes from both fusion partners are expressed in the resulting heterokaryon (Weimann *et al*, 2003), complicating the use of a single immunologic marker for its characterization. Therefore, we performed electron microscopy analysis to unequivocally identify the fused cells (Figures 1E–1G). X-gal staining is easily identifiable under electron microscopy by a precipitate in the endoplasmic reticulum. X-gal-positive cells presented basal lamina and extensions that almost surrounded the whole capillary (Figure 1G). They contained abundant plasmalemmal vesicles, few mitochondria, and heterochromatin in the periphery of their nuclei. We also observed abundant lysosomes and, occasionally, lipid droplets (Figure 1F), all of which are typical characteristics of central nervous system pericytes (Tilton, 1991). These observations further established the identity of X-gal-positive cells as pericytes, and confirmed that a small fraction of this cell type is generated by cell fusion under normal conditions.



Several groups have recently shown the contribution of BMDC and hematopoietic stem cells to the formation of pericytes after stroke (Kokovay *et al.*, 2006; Rajantie *et al.*, 2004). To study the implication of cell fusion during poststroke angiogenesis, a cerebral ischemia/hypoxia episode was induced in 2 months old BMDC chimeric mice. Their brains were analyzed 2 weeks after stroke and were compared to those from sham-operated controls (2.5 months old). We observed a threefold increase of X-gal-positive cells in the poststroke vasculature (786 ± 183 cells/brain, $n=5$) compared with their controls (258 ± 82 cells/brain, $n=5$), mostly concentrated in the periphery of the ischemic area (Figures 2A–2C). The number of X-gal/vimentin and X-gal/desmin double-positive cells was slightly higher than under normal conditions, although not statistically significant (Figure 2I). In sharp contrast, we observed a 100-fold increase of X-gal/NG2-positive cells in the area of penumbra (489 ± 102 cells/brain after stroke versus 5 ± 3 cells/brain in controls, representing $62.3 \pm 12.9\%$ of the X-gal-positive cells after stroke, Figures 2D and 2I). Interestingly, we also observed a sevenfold increase in X-gal/CD45-positive cells (609 ± 143 cells/brain after stroke versus 83 ± 16 cell/brain in controls, representing $77.4 \pm 18.3\%$ of the X-gal-positive cells after stroke, Figure 2I). These data indicated the presence of fused cells double positive for CD45 and NG2. Triple immunohistochemical analysis confirmed that the majority, if not all, of the NG2/X-gal-positive cells also coexpressed CD45 (Figures 2E–2H). These results strongly suggest that stroke promotes the formation of new vasculature by generating pericytes through cell fusion.

Discussion

Pericytes are considered a heterogeneous population of cells, which are difficult to define and lack a clear ontogeny; additionally, they also possess the capacity to differentiate to other mesenchymal cell types, including smooth muscle and fibroblasts (Gerhardt and Betscholtz, 2003). Here we provide direct evidence of pericyte fusion under normal as well as pathologic conditions. This finding may explain the difficulty to detect a defined population of pericytes, its ambiguous origin, the lack of consensus in the

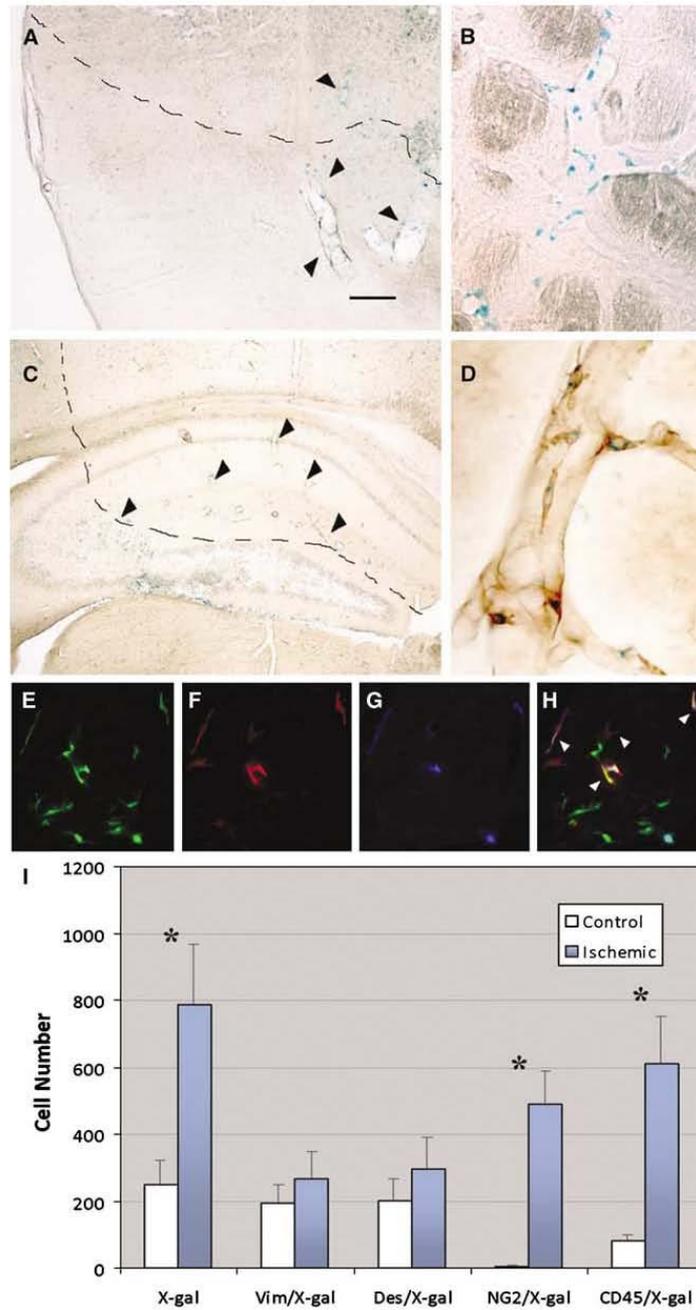
literature for adequate specific markers, and may introduce a more dynamic concept of vascular cells, as they may change from one cell type to another as facilitated by fusion and/or transdifferentiation processes.

In the past years, several groups have extensively shown the contribution of BMDC or hematopoietic stem cells to the formation of vasculature after stroke (Bailey *et al.*, 2006; Kokovay *et al.*, 2006; Rajantie *et al.*, 2004). However, the mechanism of mural cells formation from BMDC remained elusive. Our findings, together with those from other groups, strongly suggest that cell fusion and transdifferentiation processes work in concert during vasculogenesis. EC would be generated mainly by transdifferentiation of hematopoietic precursors (Bailey *et al.*, 2006), whereas at least a subpopulation of pericytes would be formed by cell fusion. Nevertheless, our data do not exclude the possibility that BMDC also contribute to the formation of pericytes through a transdifferentiation process.

Our observations reveal an important increment in cell fusion events after stroke. Recently, inflammation has been shown as a potent modulator of cell fusion (Johansson *et al.*, 2008). Stroke is usually associated with inflammation, which may explain the increased fusion observed in ischemic brains, particularly, in the penumbra area. This increment in fusion may also be facilitated by the invasion of macrophages in the ischemic area. These cells fuse in response to infections and injuries (Vignery, 2008). Supporting this idea is our observation of a sevenfold increment in CD45/X-gal-positive cells, and that all the new fused pericytes (X-gal/NG2-positive cells) coexpress CD45, suggesting a recent fusion event with macrophages. An alternative explanation for the increment in the number of fused cells may be the proliferation of previous fused cells that generate new progeny in response to stroke.

The induction of cell fusion has important therapeutic implications. It promotes the recovery of degenerative diseases and the rescue of recessive mutations (Alvarez-Dolado, 2007). Given the important role of pericytes in the initiation of vasculogenesis (Ozerdem and Stallcup, 2003; Tigges *et al.*, 2008) and their regulation of EC proliferation and differentiation (Gerhardt and Betscholtz, 2003), our findings implicate an active, physiologic role for cell fusion during angiogenesis, and may open new

Figure 1 Identification of fused cells as pericytes in the brain vasculature. Analysis of mouse R262/Cre bone marrow chimeras by X-gal staining detects positive cell in the brain vasculature (A). Most of the cells colocalize with vimentin (B), or desmin (C and D), markers for mature pericytes. (D) Some of these cells display two nuclei (arrowheads). (E) Semi-thin section (1.5- μ m) of a fused cell (blue-green in color) counter-stained with toluidine blue revealing its perivascular location. (F) Electron microscopy analysis of the same fused cell showing the X-gal precipitates (black arrowheads), lysosomes (*), and plasmalemmal vesicles (white arrowheads), characteristic of brain pericytes. (G) Magnification of an adjacent sections showing the basal lamina (arrowheads) that extends surrounding the blood vessel. Bar in (A) represents 15 μ m (A and D), 25 μ m (B), 50 μ m (C), 10 μ m (E), 2.5 μ m (F), and 1 μ m (G).



therapeutic perspectives in the application of BMDC and cell fusion for stroke treatment. Future efforts will be devoted to the identification of fusion

partners and to the study of how this process is induced by factors related with poststroke inflammation.

Figure 2 Stroke induces pericyte formation by cell fusion. (A–D) X-gal staining of brain sections from R26R/Cre bone marrow chimeras 2 weeks after stroke revealed a high number of fused cells (arrowheads) in regions close to the ischemic boundary (punctuated line) of the cortex (A), striatum (detail in B), and hippocampus (C). Most of these fused cells expressed NG2, a developing pericyte marker (D). (E–H) Immunofluorescent colocalization of fused cells (β -galactosidase positives, blue) with NG2 (red) and CD45 (green) showing a triple-positive population of cells (white arrowheads) after stroke. (I) Representation of the number of X-gal-positive cells in the ischemic brain showing a threefold increment about their controls. This was principally because of the increment of NG2/X-gal double-positive pericytes generated by cell fusion and also the sevenfold increment of CD45/X-gal macrophages (* statistical significance: $P < 0.001$, $n = 5$). Bar in (A) represents 100 μm (A and C), 30 μm (B and C), and 50 μm (E–G).

Acknowledgements

We thank Deborah Burks for her criticism and Mario Soriano for EM technical expertise. This work was supported by grants from Spanish Ministry of Health (FIS 04/2744) and Regenerative Medicine Programme from the CIPF. M.P-G and IZ were recipients of PhD fellowships from CIPF and Generalitat Valenciana, respectively.

Disclosure/conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Alvarez-Dolado M (2007) Cell fusion: biological perspectives and potential for regenerative medicine. *Front Biosci* 12:1–12
- Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, Lois C, Morrison SJ, Alvarez-Buylla A (2003) Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 425:968–73
- Bailey AS, Willenbring H, Jiang S, Anderson DA, Schroeder DA, Wong MH, Grompe M, Fleming WH (2006) Myeloid lineage progenitors give rise to vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:13156–61
- Chen J, Chopp M (2006) Neurorestorative treatment of stroke: cell and pharmacological approaches. *NeuroRx* 3:466–73
- Gerhardt H, Betsholtz C (2003) Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res* 314:15–23
- Johansson CB, Youssef S, Koleckar K, Holbrook C, Doyonnas R, Corbel SY, Steinman L, Rossi FM, Blau HM (2008) Extensive fusion of haematopoietic cells with Purkinje neurons in response to chronic inflammation. *Nat Cell Biol* 10:575–83
- Kokovay E, Li L, Cunningham LA (2006) Angiogenic recruitment of pericytes from bone marrow after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:545–55
- Ozderdem U, Stallcup WB (2003) Early contribution of pericytes to angiogenic sprouting and tube formation. *Angiogenesis* 6:241–9
- Qi X, Okuma Y, Hosoi T, Kaneko M, Nomura Y (2004) Induction of murine HRD1 in experimental cerebral ischemia. *Brain Res Mol Brain Res* 130:30–8
- Rajantie I, Ilmonen M, Alminaitie A, Ozderdem U, Alitalo K, Salven P (2004) Adult bone marrow-derived cells recruited during angiogenesis comprise precursors for periendothelial vascular mural cells. *Blood* 104:2084–6
- Tang Y, Yasuhara T, Hara K, Matsukawa N, Maki M, Yu G, Xu L, Hess DC, Borlongan CV (2007) Transplantation of bone marrow-derived stem cells: a promising therapy for stroke. *Cell Transplant* 16:159–69
- Tigges U, Hyer EG, Scharf J, Stallcup WB (2008) FGF2-dependent neovascularization of subcutaneous Matrigel plugs is initiated by bone marrow-derived pericytes and macrophages. *Development* 135:523–32
- Tilton RG (1991) Capillary pericytes: perspectives and future trends. *J Electron Microscop Tech* 19:327–44
- Vignery A (2008) Macrophage fusion: molecular mechanisms. *Methods Mol Biol* 475:149–61
- Weimann JM, Johansson CB, Trejo A, Blau HM (2003) Stable reprogrammed heterokaryons form spontaneously in Purkinje neurons after bone marrow transplant. *Nat Cell Biol* 5:959–66
- Yoder MC, Cumming JG, Hiatt K, Mukherjee P, Williams DA (1996) A novel method of myeloablation to enhance engraftment of adult bone marrow cells in newborn mice. *Biol Blood Marrow Transplant* 2:59–67

Supplementary Information accompanies the paper on the Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism website (<http://www.nature.com/jcbfm>)

Bone Marrow Contributes Simultaneously to Different Neural Types in the Central Nervous System Through Different Mechanisms of Plasticity

Javier S. Recio,*¹ Manuel Álvarez-Dolado,^{†1} David Díaz,* Fernando C. Baltanás,*
Marina Piquer-Gil,[‡] José R. Alonso,*[‡] and Eduardo Weruaga*

*Laboratory of Neuronal Plasticity and Neurorepair, Institute for Neuroscience of Castilla y León,
Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain

[†]Laboratory of Cell Therapy for Neuropathologies, Andalucian Center for Molecular Biology and Regenerative Medicine,
CABIMER, Seville, Spain

[‡]Universidad de Tarapacá en Arica, Arica, Chile

Many studies have reported the contribution of bone marrow-derived cells (BMDC) to the CNS, raising the possibility of using them as a new source to repair damaged brain tissue or restore neuronal function. This process has mainly been investigated in the cerebellum, in which a degenerative microenvironment has been suggested to be responsible for its modulation. The present study further analyzes the contribution of BMDC to different neural types in other adult brain areas, under both physiological and neurodegenerative conditions, together with the mechanisms of plasticity involved. We grafted genetically marked green fluorescent protein/Cre bone marrow in irradiated recipients: a) the PCD (*Purkinje Cell Degeneration*) mutant mice, suffering a degeneration of specific neuronal populations at different ages, and b) their corresponding healthy controls. These mice carried the conditional *lacZ* reporter gene to allow the identification of cell fusion events. Our results demonstrate that BMDC mainly generate microglial cells, although to a lesser extent a clear formation of neuronal types also exists. This neuronal recruitment was not increased by the neurodegenerative processes occurring in PCD mice, where BMDC did not contribute to rescuing the degenerated neuronal populations either. However, an increase in the number of bone marrow-derived microglia was found along the life span in both experimental groups. Six weeks after transplantation more bone marrow-derived microglial cells were observed in the olfactory bulb of the PCD mice compared to the control animals, where the degeneration of mitral cells was in process. In contrast, this difference was not observed in the cerebellum, where Purkinje cell degeneration had been completed. These findings demonstrated that the degree of neurodegenerative environment can foster the recruitment of neural elements derived from bone marrow, but also provide the first evidence that BMDC can contribute simultaneously to different encephalic areas through different mechanisms of plasticity: cell fusion for Purkinje cells and differentiation for olfactory bulb interneurons.

Key words: Bone marrow transplantation; Cell fusion; Neural repair; Neurodegeneration;
Neural differentiation

INTRODUCTION

In recent years, it has been shown that bone marrow-derived cells (BMDC) owe their plasticity to changes in their fate, which allows their contribution to different cell populations in diverse organs (7,19,22,26,40,41,48), including the central nervous system (CNS) (2,8,9,34,54). This surprising capacity has been considered a potential tool for the development of innovative therapeutic

strategies to treat degenerative, posttraumatic, and hereditary diseases (3,9). Thus, the contribution of BMDC to diverse tissues has been described under normal and pathological conditions. The contribution rate was always very scarce (2,42), but this low “basal” frequency, described under physiological conditions, was significantly increased when the target organs underwent injury (2,27,34,56), especially when accompanied by inflammation (23,38).

Received February 1, 2010; final acceptance November 22, 2010. Online prepub date: February 3, 2011.

¹These authors provided equal contribution to this work.

Address correspondence to Eduardo Weruaga, Ph.D., Laboratorio de Plasticidad Neuronal y Neuroreparación, Instituto de Neurociencias de Castilla y León, Universidad de Salamanca, C/ Pintor Fernando Gallego, No. 1, E-37007 Salamanca, Spain. Tel: +34-923-294500, ext. 5324; Fax: +34-923294549; E-mail: ewp@usal.es

In the CNS, the arrival of BMDC at the brain has mainly been studied in the cerebellum, where they contribute to the Purkinje cell population in animal models (2,43,50,54) and humans (35,53). Similar to other organs, this contribution of BMDC seems to be increased by a neurodegenerative or injured microenvironment (3,30). The underlying mechanism responsible for this process has long been a very controversial issue, and two main possible plasticity mechanisms have been proposed: differentiation (24,40,42) and cell fusion (2,39,47,51,54). They are not mutually exclusive. However, despite this, the lack of studies in which both processes are analyzed together and discerned under exactly the same conditions has reinforced the controversy. Recent evidence supports the cell-fusion mechanism for the generation of Purkinje cells (23,30,38). However, very little is known about the possible plasticity mechanisms for other neuronal types. Thus, encephalic regions other than the cerebellum require a more extensive review. This is the case of the olfactory bulb (OB), where previous works studying the contribution of BMDC are scarce and have provided confusing or inconsistent data (8,11,32,43). This region is characterized by a continuous recruitment of new neurons along adulthood, which also may influence the behavior, differentiation, and arrival of BMDC. Moreover, no previous studies have been performed in animals suffering from neurodegeneration in the OB, and hence an exhaustive study of the behavior of BMDC after their arrival at this highly plastic encephalic region, in comparison with others, under both healthy and diseased conditions should help us to better understand the contribution of BMDC to the brain.

Accordingly, in this work we further analyzed the effect of different neurodegenerative stages on the contribution of BMDC to several brain regions, together with the plasticity mechanism(s) involved. As in previous work in the field, we performed intravenous transplantation of genetically marked bone marrow in lethally irradiated mice. The recipients were both wild-type and mutant mice from the *Purkinje Cell Degeneration* (PCD) mouse line. Homozygous recessive mice (*pcd/pcd*) undergo a selective postnatal neurodegeneration in several encephalic areas at different ages (16,36,44). They lose the Purkinje cells around postnatal day 20, which causes severe ataxia (36). In addition, they have a selective loss of OB mitral cells, starting around 60 days after birth (18). Prior to this age, the cellular and synaptic organization in the OB seems to be normal (4,17,18). Thus, analysis of the cerebellum and the OB of these mutant animals grafted with wild-type bone marrow allowed us to study the possible effect of different neurodegenerative environments on the arrival and contribution of the BMDC to these areas.

Additionally, in order to discern the plasticity mecha-

nism involved in this process, the PCD mouse line was crossed with the conditional Cre reporter mouse line, R26R (2,31). In this line, the *lacZ* reporter gene is expressed exclusively after CRE recombinase excision of a loxP-flanked stop cassette. As bone marrow donors we used mice constitutively expressing CRE recombinase and green fluorescent protein (GFP) under the control of the β -actin promoter. This transplant strategy has been used previously with success to discern between cell fusion and differentiation events (2,31).

Our data indicated that the contribution of BMDC to the formation of new neuronal elements in the encephalon of adult mice was not restricted to the Purkinje cells of the cerebellum, but also took place in OB interneurons. Unexpectedly, the neurodegenerative environment had no effect on the behavior of BMDC. In contrast, and very interestingly, the contribution of BMDC occurred through two different plasticity mechanisms, depending on the region and cellular type: cell fusion for the Purkinje cells of the cerebellum, and differentiation for the OB interneurons. This strongly suggests that plasticity mechanisms may be modulated by region- and cell type-specific factors.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Recipients were obtained from the PCD-R26R mouse colony. This colony was established at the Animal Research Facility of the University of Salamanca in two steps. First, in order to be able to genotype the *pcd^{fl}* mutation, heterozygous C57BL/6J mice (*+pcd*) from a colony originally obtained from Jackson Laboratories were mated with wild-type DBA/2J females, establishing the PCD colony. Thus, the *pcd^{fl}* allele was associated with the genetic background of the C57BL/6J strain, and the wild-type one with the genetic background of the DBA/2J strain. Mice were genotyped by PCR amplification of specific microsatellite sequences that show intraspecific divergences. Second, in order to obtain wild-type and *pcd/pcd* animals carrying the CRE reporter *lacZ* gene (2,31), *+pcd* animals (from the PCD colony) were crossed with R26R mice (JAX 003474).

Donors were obtained from the PCD-(CRE-GFP) mouse colony. Homozygous mice expressing CRE recombinase under the control of a hybrid regulatory element of the cytomegalovirus enhancer β -actin promoter (28), and homozygous mice expressing GFP under the same promoter (20) were bred to generate β -actin CRE-GFP mice. Furthermore, to prevent allograft rejection, the mice were crossed with *+pcd* animals (from the PCD colony), increasing the consanguinity between donors and recipients (Fig. 1). The experiments were carried out in accordance with the guidelines of the Euro-

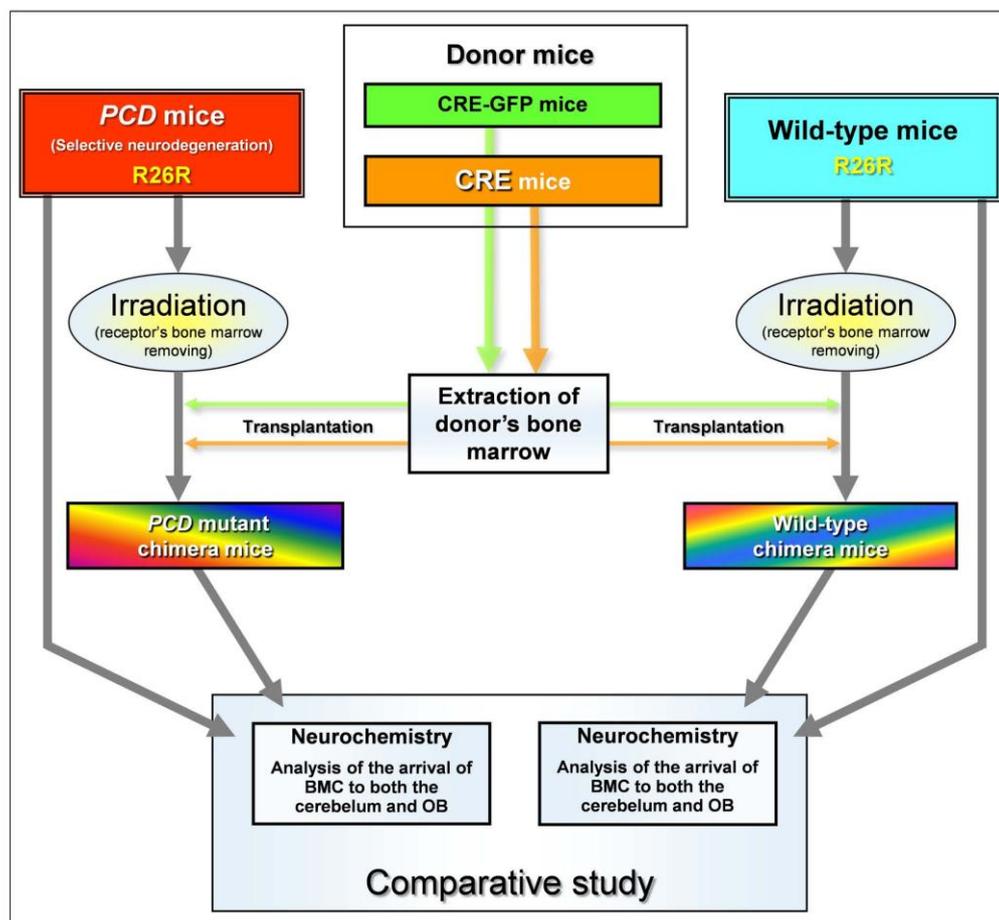


Figure 1. Chart depicting the work schema to demonstrate both the destination and cell mechanism for BMDC to be integrated into nervous tissue. Donor mice contain GFP, the *Cre* transgene, or both, while the recipient mice carry the conditional floxed reporter gene *lacZ* in the *R26R* loci. Recipient mice were wild-type or exhibit a natural neurodegenerative process (PCD). After irradiation, all the recipient mice were transplanted with donor bone marrow, and the brains of the resultant chimeric mice were analyzed and compared.

pean Community Council (86/609/EEC) and current Spanish legislation for the use and care of laboratory animals (RD 1201/2005). The protocols for animal care and manipulation used were approved by the Bioethics Committee of the University of Salamanca.

Bone Marrow Transplantation

Wild-type bone marrow cells were collected from 4–8-week-old donor mice by flushing tibias and femurs with Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM; Invitrogen). Red blood cells were subsequently lysed by 5

min of incubation in ice-cold ammonium chloride (140 mM in Tris 17 mM). After a double wash and mild centrifugation, 7.5×10^6 bone marrow cells were injected intravenously into the tail vein in both the wild-type and *pcd/pcd* R26R mice. Animals undergoing bone marrow transplantation (BMT) were lethally irradiated to remove their own bone marrow 24 h before grafting. Owing to their particular characteristics (fairly young—P19—and some of them PCD mutant animals), we previously tested different doses of irradiation (unpublished data) in order to select the minimum lethal dose

for these P19 animals (7.5 Gy). Moreover, to ensure the survival of the transplanted PCD mutant mice, we performed whole BMT, without sorting its populations.

Flow Cytometry

Donor engraftment was determined by flow cytometry of peripheral blood (FACS Calibur, BD Biosciences). Peripheral blood was subjected to red blood cell lysis by treatment with ammonium chloride (see above), washed, and resuspended in phosphate buffered saline (PBS). Cytometric analysis was performed twice: 2 weeks after grafting and on the day of sacrifice (see below). Recipients showing a donor chimerism <50% in the first sample were rejected. As indicated in Table 1, all transplanted mice analyzed in this study showed significant levels of multilineage chimerism of peripheral blood leukocytes.

Tissue Collection

At P60, P110, and P150, groups of experimental animals were deeply anaesthetized intraperitoneally with a solution composed of ketamine [120 µg/g body weight (b.wt.)] and xylazine (10 µg/g b.wt.) and were perfused through the ascending aorta, first with 0.9% saline for 1 min and then with 50 ml of fixative containing 4% paraformaldehyde (for general immunofluorescence) or 2% paraformaldehyde + 0.25% glutaraldehyde (for X-gal histochemistry) in 0.1 M phosphate buffer (PB). Encephala were dissected out, cut into blocks (rostral, including the OB; medial and caudal, including the cerebellum) and immersed in the same fixative solution for 20 min at room temperature (RT). Then, the blocks were rinsed in PB and cryoprotected with 30% sucrose in PB overnight at 4°C. Rostral and caudal blocks were cut in 40-µm coronal or sagittal sections, respectively; serial

sections were obtained with a freezing microtome and were collected in alternating series. Representative sections were stained with X-gal staining or immunohistochemistry. Medial blocks were frozen and stored at -80°C for future experiments.

X-gal Staining and Immunohistochemistry

To identify cell-fusion events, sections were processed with X-gal staining by placing them in PB containing 10 mM $K_3Fe(CN)_6$ and 10 mM $K_4Fe(CN)_6$ together with the β-gal substrate, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-gal; 1 mg/ml; Molecular Probes), at 37°C overnight. Then, to characterize the X-gal-positive cells, selected sections were processed immunohistochemically with anti-Iba1 antibody [goat (1:500), from Everest Biotech, or rabbit (1:750), from Dako], or anti-GFAP [rabbit (1:2,000), from Sigma], or anti-calbindin [CB; mouse (1:2,000) or rabbit (1:7,000), from Swant], or anti-Reelin [mouse (1:1,000), from Chemicon] in a medium containing 0.2% Triton X-100 (Probus) and 5% normal donkey serum (Vector) in PBS overnight at RT. Biotinylated donkey anti-goat, rabbit, or mouse IgG secondary antibodies (1:200) were from Jackson ImmunoResearch, and avidin-biotin-peroxidase complex (Kit Elite ABC; 1:200) was from Vector. The reaction product was visualized by incubating sections in 0.02% 3,3'-diaminobenzidine (DAB) and 0.003% H_2O_2 in 0.1 M Tris-HCl buffer.

Immunofluorescence

Double or triple immunofluorescence was used to identify GFP⁺ cells, along with other cellular antigens for both neurons (CB and Reelin) and glial cells (GFAP and Iba1). Sections were incubated with 0.2% Triton X-100 and 5% normal serum and were costained with anti-

Table 1. Summary of the Different Experimental Animals Employed and the Experimental Procedures Followed in the Present Study

No. of Animals	Genotype	Treatment	No. of Transplanted Cells	Sacrifice Age	% GFP ⁺ Blood Cells at Death (Mean ± SEM)	Degenerative Stage	
						Cerebellum	OB
4	+/+	BMT P20	7.5×10^6	P60	59.5 ± 2.4	N	N
4	+/+	BMT P20	7.5 ± 10^6	P110	65.7 ± 2.9	N	N
4	+/+	BMT P20	7.5×10^6	P150	74.8 ± 1.7	N	N
4	<i>pcd/pcd</i>	NT	—	P60	—	PD	N
4	<i>pcd/pcd</i>	NT	—	P110	—	PD	D
4	<i>pcd/pcd</i>	NT	—	P150	—	PD	PD
4	<i>pcd/pcd</i>	BMT P20	7.5×10^6	P60	58.2 ± 0.9	PD	N
4	<i>pcd/pcd</i>	BMT P20	7.5×10^6	P110	64.8 ± 1.8	PD	D
4	<i>pcd/pcd</i>	BMT P20	7.5×10^6	P150	72.7 ± 4.9	PD	PD

Genotype: +/+, wild-type; *pcd/pcd*, PCD. Treatment: BMT, bone marrow transplantation; NT, not treated. Degenerative stage at sacrifice age of both Purkinje cells (cerebellum) and mitral cells (OB): N, normal; D, degeneration; PD, postdegeneration.

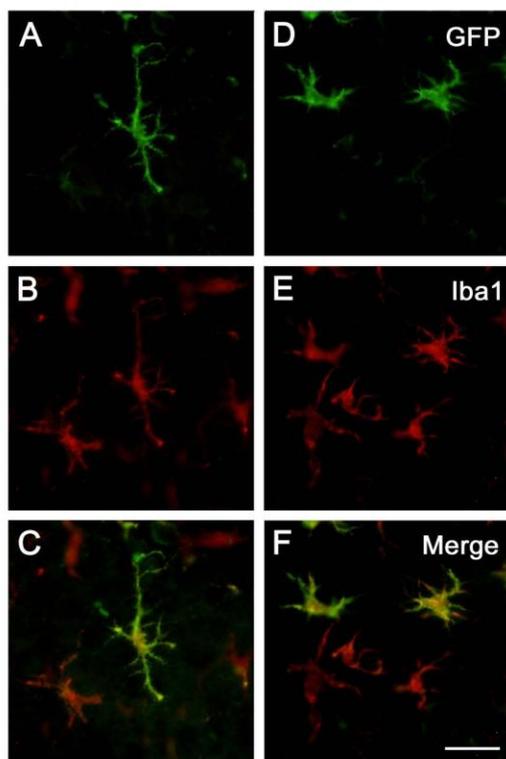


Figure 2. Epifluorescence microscopy images from encephalic sections of a P150 wild-type mouse transplanted with GFP bone marrow. These images show the contribution of the bone marrow to the microglial cell population, both resting microglial cells (A–C) and activated ones (D–F). Resting and activated cells were identified by their morphological characteristics. Upper images (A, D) show GFP labeling, which allows the identification of the newly generated cells coming from the transplanted bone marrow. Images in the central portion (B, E) exhibit the Iba1 signal (microglial cell specific marker). Lower photographs (C, F) correspond to the merging of both previous images for each kind of microglial cell. Scale bar: 20 μ m.

GFP antibody [goat (1:2,000) or rabbit (1:4,000), from AbCam] and the above described primary antibodies. Secondary antibodies (Cy-2, Cy-3, Cy-5 conjugated) were used at a dilution 1:500 (from Jackson Immunoresearch). Nuclei were counterstained with DAPI (Gibco-BRL) or propidium iodide (PI; Sigma).

Microscopy Analysis

Processed sections were analyzed for the coexpression of the indicated markers under an Olympus Provis AX70 microscope (UPlanSApo lens up to 60 \times N.A.

1.35) equipped with an Olympus DP70 digital camera. Selected sections were also examined with a confocal microscope (Leica TCS SP spectral confocal microscope; pinhole opening up to 1.5 Airy; Ar/ArKr and He/Ne laser excitation and Planapochromatic objectives up to 63 \times N.A. 1.4). Digital images were processed with Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems) to adjust contrast slightly and assemble the final plates.

Cell Counting and Statistical Comparison

The same animals were used for analyzing both the olfactory bulb and cerebellum. All GFP⁺ Purkinje cells and OB interneurons were counted immediately after the observation of all sections, since their numbers were low. However, to compare the quantities of GFP⁺ microglial cells anatomically comparable sections were selected. Both the OB and cerebella of PCD mice undergo a dramatic shrinkage (4,14,25,33), which would make the comparison of cell density values unfounded for analyses. Thus, we chose the number of cells per section as the morphometric value for comparisons between experimental groups. For the cerebellum, two purely sagittal sections were chosen (where the 10 cerebellar lobules were clearly seen). Regarding the OB, a central coronal section was chosen for comparisons, as previously described (14,55). Four animals from each experimental group were analyzed. Therefore, these values represent an estimation of the arrival of BMDC to specific regions, without the influence of their shrinkage due to the *pcd*^{fl} mutation. GFP⁺ cells were counted with the NeuroLucida and Neuroexplorer programs (MicroBrightField, Magdeburg, Germany).

All counts were performed by the same person (D.D.), following the same criterion and using a double-blind study. Once homoscedasticity had been checked with the Kolmogorov-Smirnov test, a one-way ANOVA test was employed to analyze possible differences among different graft survival times within each genetic group; Bonferroni post hoc test was performed to make the simple comparisons. Following this, Student's *t*-test was performed in order to assess possible differences between PCD and wild-type mice within each survival time.

RESULTS

In order to analyze the effect of different neurodegenerative stages on the contribution of BMDC to the cerebellum and olfactory bulb, we performed BMT in 20-day-old normal and PCD mice (see Materials and Methods and Fig. 1). At this age, Purkinje cell degeneration in PCD animals has just started (36), while OB mitral cells are still alive (4,17). After transplantation, the animals were sacrificed at three different ages: P60, P110, and P150. At P60 (40 days posttransplantation), Purkinje

Table 2. Number of GFP⁺ Microglial Cells After Bone Marrow Transplantation

Age	Cerebellum (n = 4)		Olfactory Bulb (n = 4)	
	Wild-Type	PCD	Wild-Type	PCD
P60	73.67 ± 6.96	76.00 ± 25.48	43.25 ± 4.77	86.67 ± 5.46
P110	114.00 ± 5.00	130.33 ± 30.30	84.50 ± 7.50	139.67 ± 50.26
P150	314.00 ± 28.03	290.00 ± 28.05	393.00 ± 47.84	359.50 ± 86.56

Number of GFP⁺ microglial cells found in both wild-type and PCD recipients after transplantation at P60, P110, and P150. Data are mean ± SEM.

cells were mostly lost in PCD mutants, whereas mitral cell degeneration had not yet begun. At P110 (90 days posttransplantation), Purkinje cell death had already finished and the neurodegenerative process in the OB was taking place. Finally, at the last age (130 days posttransplantation), both degenerative processes had been already completed.

Each of the transplanted animals selected for this study displayed substantial engraftment of GFP⁺ donor cells in the peripheral blood, with chimerisms ranging from 58% to 85% of total cells (Table 1), including contributions to both the myeloid and lymphoid lineages (unpublished data). No significant difference (Student's *t*-test, $p \geq 0.05$) was found in the percentage of GFP⁺ cells incorporated into the peripheral blood of PCD and wild-type transplanted mice. This demonstrated that the capacity of the PCD mice to host a wild-type bone marrow was not affected by the PCD mutation and allowed a comparison of the results obtained from both experimental groups.

Generation of Glial Elements From Transplanted Bone Marrow Under Physiological and Neurodegenerative Conditions

Gross observations of GFP⁺ donor-derived cells in both the cerebellum and the OB of transplanted mice revealed that the vast majority of these cells had the typical morphology of resting microglial cells. To confirm this observation, we performed double immunofluorescence colocalization for GFP and Iba1 (a typical microglial marker) (Fig. 2). The overall contributions of double-positive GFP/Iba1 microglial cells to the whole resident microglial populations (Iba1 single-labeled cells) were quite weak, about less than a tenth part (as previously described) (32), even for neurodegenerative conditions in both encephalic regions. However, the analysis revealed a time-dependent increase in double-positive GFP/Iba1 microglial cells in both the wild-type and PCD animals along the ages studied, this increase being significantly different at P150 (Table 2, Fig. 3).

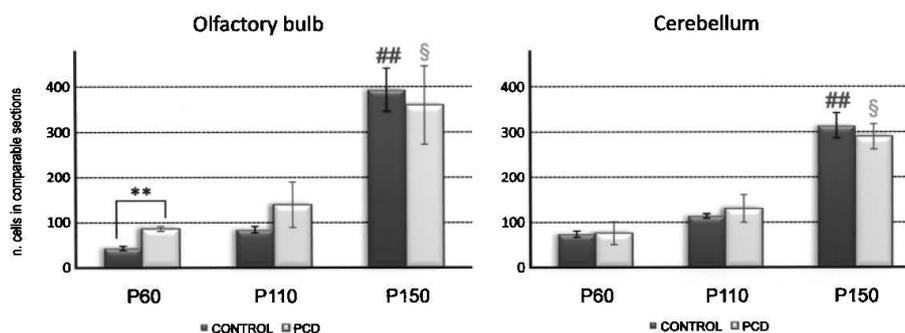


Figure 3. Graph showing the number of GFP⁺ microglial cells in the recipient animals after bone marrow transplantation. The number of cells was quantified in comparable sections in both wild-type and mutant animals in order to avoid the incorrect evaluation of cell densities because of the natural shrinkage of the tissue in mutant mice. Within each studied encephalic region, statistical differences were founded among survival times for both wild-type animals (## $p < 0.01$, ANOVA-Bonferroni post hoc test) and PCD mutant mice ($\$p < 0.05$, ANOVA-Bonferroni post hoc test). Moreover, in the olfactory bulb, statistical differences were demonstrated between both experimental groups at P60 (** $p < 0.01$ Student's *t*-test).

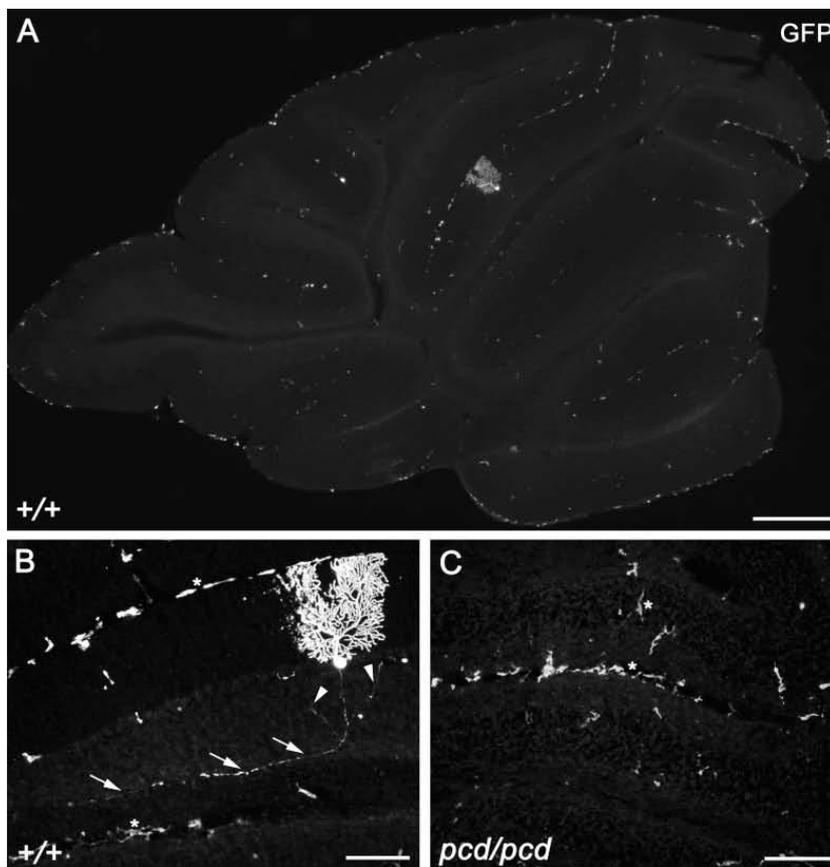


Figure 4. Epifluorescence microscopy images of cerebellum sections from a P150 wild-type mouse (A, B) and a P150 PCD mouse, both grafted with GFP bone marrow, showing the GFP⁺ cells. (A) Panoramic image showing the distribution and abundance of the cells newly generated from the transplanted bone marrow in the cerebellum. A GFP⁺ Purkinje cell can be observed. (B) Magnification of the previous image and allows the assessment in greater detail of both the GFP⁺ Purkinje cell and the surrounding microglial cells. This GFP⁺ Purkinje cell has a very complex dendritic tree and a long axon (indicated with arrows), presenting direct evidence of its integration in the cerebellum. Moreover, the axon presents the typical recurrent collaterals (arrowheads) that characterize Purkinje cells. Furthermore, microglial cells were basically located in a peripheral position. Some of these microglial cells are indicated with asterisks. (C) The same region of a transplanted PCD mouse, showing the location of the newly generated cells in the cerebellum of these mutant animals. Scale bars: 200 μ m (A) and 100 μ m (B, C).

Most of these cells were located peripherally, close to the meninges, but also in perivascular locations of the cerebellum and the OB (Fig. 4). Furthermore, in the transplanted PCD mice, the neurodegenerative environment of the OB at P60, and to a lesser extent at P110, led to significant differences in the contribution of BMDC to the generation of microglial cells in comparison with age-mated transplanted wild-type animals ($p < 0.01$ at P60) (Fig. 3), coinciding with the time window of mitral cells degeneration (18,49).

To investigate whether GFP⁺ microglial cells were generated by cell fusion, we performed X-gal staining to detect the *lacZ* expression resulting from the recombination of floxed sequences after a fusion event. We never observed GFP⁺ microglial cells colocalized with X-Gal staining in any brain region of either experimental group. Accordingly, the contribution of BMDC to microglial cells must occur through a differentiation process.

Finally, the possible formation of astrocytes from the

Table 3. Number of GFP⁺ Neurons After Bone Marrow Transplantation

Age	Purkinje Cells (Cerebellum) (<i>n</i> = 4)		Interneurons (Olfactory Bulb) (<i>n</i> = 4)	
	Wild-Type	PCD	Wild-Type	PCD
P60	0	0	0.25 ± 0.25	1.25 ± 0.95
P110	0	0	2.25 ± 0.63	0.75 ± 0.25
P150	2.07 ± 0.71	0	4.25 ± 0.48	3.50 ± 0.87

Number of GFP⁺ neuronal elements found in both wild-type and PCD recipients after transplantation at P60, P110, and P150. Data are mean ± SEM.

BMDC was also analyzed. No GFP⁺ cells coexpressing GFAP (considered as a specific marker for astrocyte lineage) were observed in any region studied (including the subventricular zone, SVZ) under any of the experimental conditions tested (data not shown).

Contribution of BMDC to Neuronal Elements Under Normal Conditions

To analyze the contribution of donor BMDC to neuronal elements under physiological conditions, we immunocolocalized GFP⁺ donor-derived cells with glial markers (Iba1 or GFAP) and neuronal region-specific markers, either CB in the cerebellum (Purkinje cells marker) or Reelin in the OB (mitral cell marker). As criteria for characterizing neurons, we required (a) the absence of immunostaining for glial markers and (b) positive immunostaining with CB or Reelin, or a display of distinctive typical neuronal morphology.

With these criteria, in the cerebellum of transplanted wild-type animals the only neuronal elements found were Purkinje cells (Fig. 4). As previously reported, their frequency was very scarce (Table 3), their maximum number observed per cerebellum being 4 at P150. Owing to the low number of these cells, the statistical comparison between groups would be untrustworthy. These cells clearly exhibited the characteristic morphology of Purkinje cells and expressed CB (Fig. 5). Furthermore, it was possible to confirm their integration in the cerebellar system through the observation of long axons, even showing recurrent collaterals (Figs. 4 and 5). Consistent with previous work (2,23,30,38,54), the plasticity mechanism involved in their generation was clearly cell fusion, as confirmed by the expression of the lacZ reporter gene (X-Gal staining) (Fig. 5) and the observation of GFP⁺ binucleated Purkinje cells (Fig. 5).

Interestingly, in the OB of the transplanted wild-type animals we found mature olfactory interneurons expressing GFP (Fig. 6). These newly generated neurons,

derived from donor cells, were very scarce (Table 3). They were located in different layers of the OB, with no preferential distribution. Owing to the strong neurochemical diversity of OB interneurons (5,13), we determined the OB neuronal subtype by means of their characteristic localization and very distinctive morphology. We unmistakably characterized both juxtglomerular cells and granule cells (Fig. 6C). All of them displayed the typical morphology of neurons belonging to the layer where they were found. No double-positive Reelin/GFP cells were found in the OB, indicating that BMDC do not contribute to OB mitral cells (Fig. 6G–J).

Finally, contrary to what was seen for the Purkinje cells, none of these newly generated OB cells had two nuclei, strongly suggesting a differentiation mechanism as their possible underlying origin. To check this assumption, we looked for the expression of the lacZ reporter gene in the OB of transplanted mice. We did not find any cell fusion event in this region. Moreover, we carefully looked into the SVZ or along the rostral migratory stream, since these structures support the arrival of new interneurons to the adult OB (14): no positive GFP⁺ elements were found neither in wild-type animals nor in the PCD mice. Therefore, all the evidence points to differentiation as the plasticity mechanism involved in the generation of new OB interneurons from BMDC.

Contribution of BMDC to Neuronal Elements Under Neurodegenerative Conditions

Analysis of the cerebellum and OB regions in transplanted PCD mice allowed the discrimination of: a) the effect of a neurodegenerative environment on the contribution of BMDC to these regions; and b) the effect of the transplantation of healthy BM in the damaged brain. The markers and criteria used to examine these processes were identical to those employed for physiological conditions. No Purkinje cells with markers from donor BMDC were observed in the cerebellum of the transplanted PCD mice, even in the cerebellar vermal lobule X, where the neurodegenerative process starts later [(25); our own observation]. This result was similar for the three different neurodegenerative stages studied and indicates that the PCD neurodegenerative process did not modify the arrival or plasticity of the BMDC. These data contrast with findings published previously (3,23,30), in which the ability of BMDC to fuse with this neuronal population was reported to be increased after the Purkinje cells had been damaged, suggesting that differences in the nature of the injury may affect the fusion process. Moreover, histological comparison of the cerebellum from transplanted PCD animals and PCD mice not receiving treatment did not reveal any difference or improvement in the degenerative process (un-

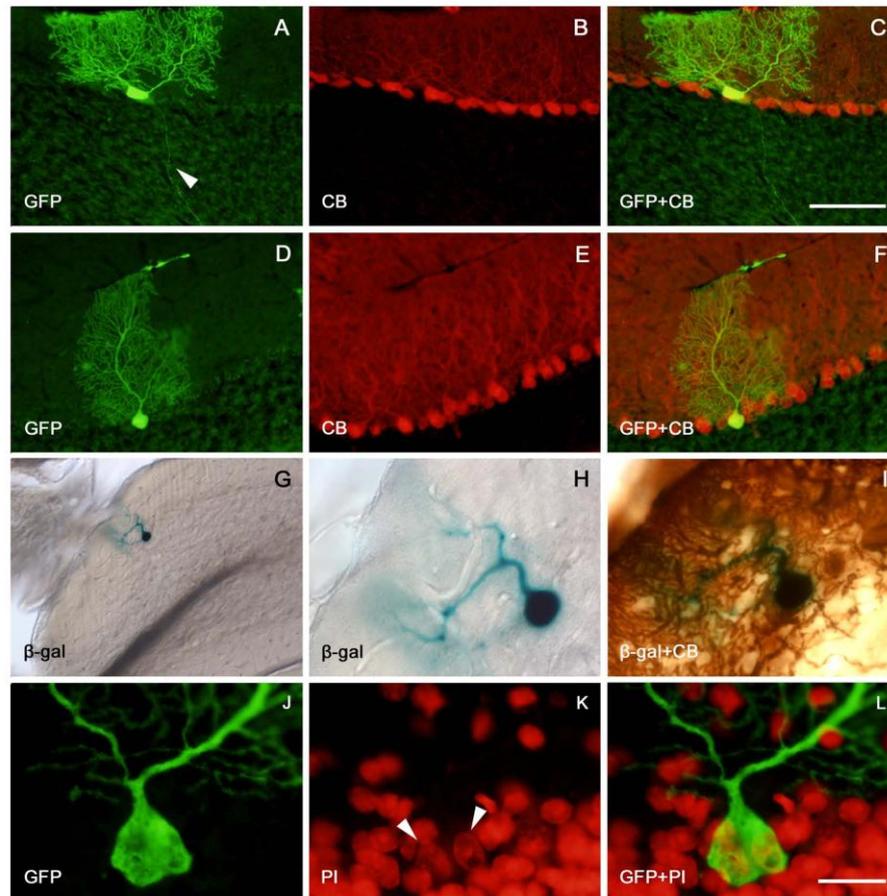


Figure 5. Fluorescence microscopy images of cerebellum sections from wild-type mice grafted with wild-type bone marrow from CRE-GFP donors showing some examples of Purkinje cells originated from the transplanted bone marrow. (A, D) Two perfectly differentiated different GFP⁺ Purkinje cells. The arrowhead in (A) indicates the axon. (B, E) The calbindin (CB) labeling for the previous images, and (C, F) the corresponding merging. Purkinje cells produced from the grafted bone marrow not only show the typical morphology of this specific cell type, but also express CB, like the other Purkinje cells. (G–I) The X-gal staining of a cerebellar section from a wild-type R26R mouse grafted with CRE-GFP bone marrow. (G) A Purkinje cell that has undergone a fusion cell event with a BMC. (H) Magnification of the fused cell in (G), and (I) the double staining of that Purkinje cell with X-gal and CB (with the DAB immunohistochemical technique). Images at the bottom (J–L) represent high magnifications of the soma from a GFP⁺ Purkinje cell (J), the staining of this region with the nuclear marker propidium iodide (PI; K), and the merging of both stainings (L). Arrowheads in (K) indicate the two nuclei belonging to the previous GFP⁺ Purkinje cell, suggesting that it is a binucleate and presumably polyploid cell. Scale bar in (C): 100 μ m for (A–F), 200 μ m for (G), and 50 μ m for (H, I). Scale bar in (L): 20 μ m for (J–L).

published data). This was confirmed by the absence of Purkinje cells (CB positive) in all the mutant mice analyzed, with or without BMDC transplantation.

Additionally, analysis of the OB of transplanted PCD mice (Fig. 6) suggested that the sparse formation of neurons from BMDC was not influenced by mitral cell de-

generation either, since the results were similar to those obtained in wild-type transplanted mice (Table 3): in normal mice mature olfactory interneurons expressing GFP were also observed in the OB of some transplanted PCD mice at similar ages (Fig. 6C, F). However, none of these newly generated cells expressed Reelin or dis-

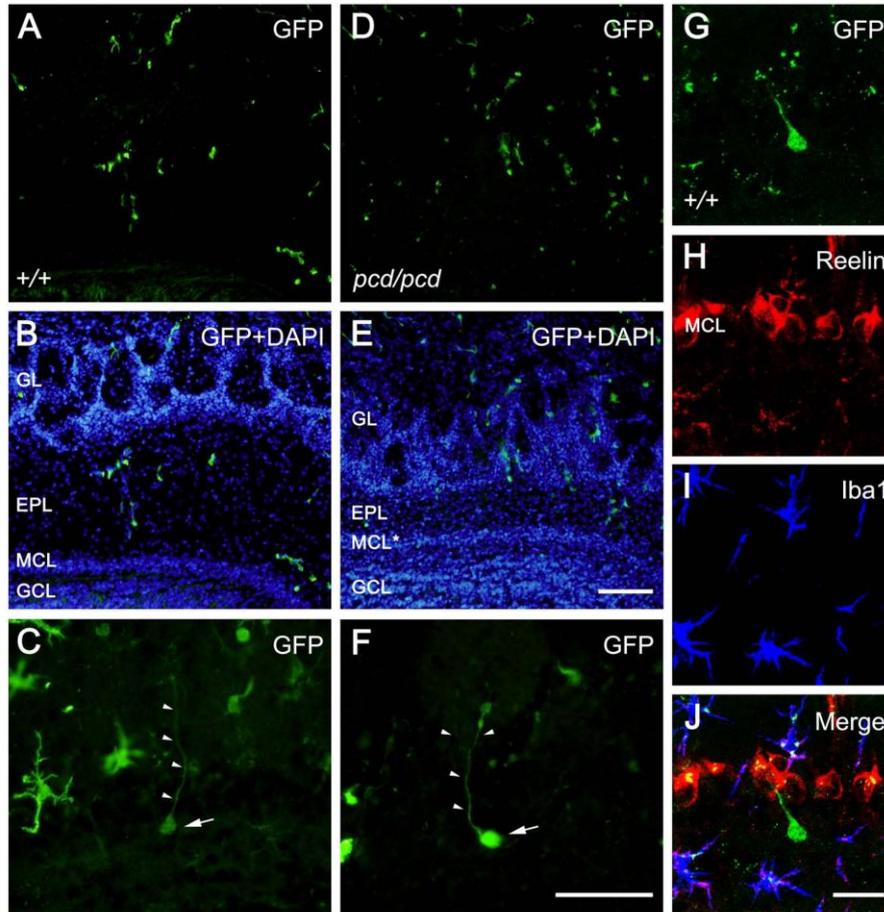


Figure 6. Fluorescence microscopy images of olfactory bulb (OB) sections from wild-type (A–C, G–J) and PCD (D–F) mice grafted with wild-type bone marrow from a CRE-GFP donor showing some examples of the typical neuronal types of this region originated from the transplanted bone marrow. (A, D) The newly generated cells (GFP⁺) in the different OB layers in both wild-type (A) and PCD (D) recipients. (B, E) The same sections counterstained with DAPI to display the location of GFP⁺ cells and the laminar organization of this region in both experimental groups. (C) A GFP⁺ cell from a grafted wild-type mouse that can be classified as a granule cell, considering its typical morphology and location in the OB. The white arrow points to its soma and the white arrowheads to its typical prolongation. (F) A GFP⁺ cell from a grafted PCD mouse that can be sorted, by its location and morphology in the OB, as a juxtglomerular cell. The white arrow points to its soma and the white arrowheads to its typical prolongation towards an olfactory glomerulus. (G–J) Laser scanning confocal images from the OB of a mouse grafted with GFP bone marrow. (G) The GFP labeling to identify donor cells. (H) The mitral cell layer (Reelin positive). (I) The Iba1 labeling to show the microglial cells. (J) The merging of the previous confocal images. Taking into account its characteristics, this newly generated cell can be classified as a granule cell. MCL: mitral cell layer, GL: glomerular layer, GCL: granule cell layer, EPL: external plexiform layer. Scale bars: 100 μ m (A, B, D, E), 50 μ m (C, F), 25 μ m (G–J).

played the typical mitral cell morphology. Therefore, despite the mitral cell degeneration in the OB of the PCD mice, BMDC did not contribute to this neuronal population under either normal or degenerative conditions.

Similar to the results observed in wild-type grafted animals, none of the newly generated GFP⁺ OB cells had two nuclei nor expressed the *lacZ* reporter gene, supporting their origin through a differentiation mecha-

nism. Finally, histological comparison of the OB of transplanted PCD mice and PCD mice not receiving treatment revealed no difference in the remaining mitral cell population at the different ages analyzed. This suggested that the transplantation of wild-type BM had no effect on the degenerative process of the OB, as in the cerebellum.

DISCUSSION

The Formation of Microglial Cells From the Bone Marrow Is Influenced by Selective Postnatal Neurodegeneration

Analysis of the contribution of BMDC to the cerebellum and the OB of both wild-type and PCD transplanted animals clearly demonstrated a stable generation of new neural elements from donor bone marrow under normal physiological conditions and along the different stages of the selective postnatal neurodegenerative processes. The most common cell type generated from the BMDC was microglia, in accordance with previous studies (1,6,12,15,21,32,43,45,50). All the experimental groups underwent the same procedure (irradiation), were grafted with the same wild-type bone marrow, and had similar percentages of GFP⁺ cells in their peripheral blood. Along time, the number of engrafted GFP⁺ microglial cells increased in both the wild-type and PCD recipients, suggesting that donor-derived bone marrow generates permanent new microglial cells for the encephalon throughout the life span of the animals, according to previous findings (6,15,21,32).

The PCD animals showed difference in the degree of neurodegeneration in each of the encephalic regions studied (16,18,27). Interestingly, the percentage of contribution of BMDC to the microglial population was higher in the OB neurodegenerative environment of P60 PCD mice, but not later on. In contrast, this increase in the arrival of BMDC was not found in the cerebellum. This observation fits with the degenerative time course in both encephalic regions: while mitral cells in the OB undergo degeneration at P60, Purkinje cells in the cerebellum have almost completely disappeared at that age. Previous reports have claimed that microglial cells, which proliferate after injury to the CNS, do not originate from the bone marrow but are resident in the encephalon (1,32,46). Alternatively, the neurodegenerative microenvironment would also attract more BMDC increasing the resulting microglial population (21,32). Notwithstanding these observations, the significant rise of microglial cells observed in the ongoing boiling degeneration in the OB at P60 could be the result of both phenomena.

Regarding the plasticity mechanism(s) involved in the formation of microglial cells, the absence of X-gal

staining in this cell type clearly showed that this phenomenon occurred through differentiation. Nonetheless, we cannot discard a silencing or an uncompleted CRE recombination process of the conditional reporter gene in some cell types, which would mask some of the fusion events (10,29).

Finally, no astrocytes were observed expressing any marker from donor bone marrow. This absence is in accordance with most previous studies (8,32,37,42,52) and demonstrates that BMDC do not contribute to astrocyte formation under either physiological or neurodegenerative conditions.

BMDC Contribute to Different Neuronal Types Through Two Different Plasticity Mechanisms

Our results concerning the contribution of BMDC to neuronal elements under physiological conditions corroborate previous studies addressing this phenomenon in the cerebellum (2,12,23,30,38,43,50,54). The frequency of Purkinje cells expressing donor markers and their relationship with the posttransplantation time lie within the values described previously in works using a similar BMT procedure (irradiation for removing the recipient's bone marrow, intravenous graft, and no additional conditioning). In addition, here we report new anatomical information (the existence of long axons with recurrent collaterals) concerning the integration of Purkinje cells expressing BMDC markers in the cerebellum. Moreover, we can confirm that BMDC fuse with Purkinje cells (2,23,30,38,54).

To our knowledge this is the first work reporting the contribution of BMDC to the olfactory interneurons. This important result clarifies those reported in previous publications in which the contribution of BMDC to the OB appeared controversial, since the neural nature of the differentiated GFP⁺ elements remained unclear (8, 11,32,43); our observations provide a direct and consistent demonstration of the contribution of BMDC to perfectly differentiated OB neurons. Moreover, we also discard the possibility that the newly formed interneurons might be generated in the SVZ, since we did not detect GFP⁺ neural precursors in this neurogenic region or in the rostral migratory stream.

Finally, we show for the first time how BMDC contribute to the CNS in different ways in the same animal, depending on the region and cell-specific factors: cell fusion for Purkinje cells and differentiation for olfactory interneurons. Future studies should clarify whether the plasticity mechanism involved depends on a) the type of participating BMDC or the resulting cellular type; b) different plasticity properties of the BMDC or fusing partner; and/or c) the niche where the phenomenon occurs.

*Despite Their Neurodegeneration, Wild-Type BMDC Do Not Contribute to the Cellular Populations Affected by the *pcd*¹ Mutation*

We never observed Purkinje cells, either originated from grafted bone marrow or belonging to the recipients, in any of the transplanted PCD animals at the three different ages studied. However, previous work has reported that neurodegeneration has an important effect in promoting the arrival of BMDC and their fusion with Purkinje cells (3,23,30,38). This difference in the results may be the consequence of differences in the nature and time course of the neurodegenerative processes and in the transplantation system (intracranial vs. intravenous). An alternative explanation could be the early onset of Purkinje cell degeneration in PCD mice, or its high rate of progression (25,27). It is likely that when transplantation is performed (P20; earlier transplantation is not viable because it strongly increases the mortality and morbidity of PCD mutant mice and induces morphological abnormalities in the cerebellum) the neurodegenerative process is already very advanced and cannot be reversed. This is similar to many human neurodegenerative diseases, which are often diagnosed when the degenerative process is very advanced, thus limiting possibilities for improvement. Consistent with this, and since the plasticity mechanism involved in the contribution of BMDC to the Purkinje cell population is cell fusion, the absence of one of the partners in the fusion process did not produce any fusion event. Accordingly, the therapeutic use of BMDC in neurodegenerative pathologies should be considered with caution, depending on the etiology of the disease studied, the age/stage of the disease, and the type of degenerative process to be treated. Moreover, the encephalic area affected must be taken into account. Our results concerning the OB of transplanted PCD animals, where BMDC did not contribute to the mitral cell population despite their degeneration, show that there must be region-specific factors that modulate the plasticity properties of BMDC.

Similarly, Purkinje cells might have a special propensity to undergo cell fusion events with BMDC (38,50). Further analyses of what renders them fusogenic would provide new guidelines for exploiting this mechanism in regenerative medicine.

The results of the present study also demonstrate that the formation of new interneurons in the adult OB from the bone marrow seems not to be affected by mitral cell degeneration. Instead, it seems to be connected to the plasticity mechanism involved, and does not depend on cells other than BMDC.

In light of our observations, we conclude that BMDC do not only contribute to the cerebellar Purkinje cell population, but also to the OB interneurons. Both contri-

butions are limited but take place under physiological conditions. The former occurs through cell fusion and hence depends on the existence of the cellular type generated and its fusogenic capability (39). The latter takes place by differentiation and is not affected by the neurodegeneration of surrounding cells. Future experiments should be performed to discern the physiological importance of both processes in normal homeostasis and in cell replacement therapies for the adult CNS.

Moreover, despite the strong neurodegenerative environment in both the cerebellum and the OB of PCD mutant mice, neither Purkinje cells nor mitral cells were formed from the transplanted bone marrow. Therefore, the scarce neural elements generated from BMDC, the restriction of the neuronal and glial types formed, and the lack of response against selective neuronal loss, as is observed in many neurodegenerative diseases, recommend that further basic studies be continued with experimental models that will clearly differentiate regional- and neural-type variables before planning clinical applications.

ACKNOWLEDGMENTS: This work was supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación (BFU2010-18284), the Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad (Plan Nacional Sobre Drogas), the Junta de Castilla y León, "MMA," "Samuel Solórzano Barruso," and the "Alicia Koplowitz" Foundations, and Centre for Regenerative Medicine and Cell Therapy of Castilla y León.

REFERENCES

1. Ajami, B.; Bennett, J. L.; Krieger, C.; Tetzlaff, W.; Rossi, F. M. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat. Neurosci.* 10:1538–1543; 2007.
2. Álvarez-Dolado, M.; Pardal, R.; García-Verdugo, J. M.; Fike, J. R.; Lee, H. O.; Pfeffer, K.; Lois, C.; Morrison, S. J.; Álvarez-Buylla, A. Fusion of bone marrow derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 425:968–973; 2003.
3. Bae, J. S.; Furuya, S.; Shinoda, Y.; Endo, S.; Schuchman, E. H.; Hirabayashi, Y.; Jin, H. K. Neurodegeneration augments the ability of bone marrow derived mesenchymal stem cells to fuse with Purkinje neurons in Niemann Pick type C mice. *Hum. Gene Ther.* 16:1006–1011; 2005.
4. Baker, H.; Greer, C. A. Region specific consequences of *pcd* gene expression in the olfactory system. *J. Comp. Neurol.* 293:125–133; 1990.
5. Baltanás, F. C.; Wernaga, E.; Airado, C.; Valero, J.; Recio, J. S.; Díaz, D.; Alonso, J. R. Chemical heterogeneity of the periglomerular neurons in the olfactory bulb. A review. *Eur. J. Anat.* 11:123–147; 2007.
6. Biffi, A.; De Palma, M.; Quattrini, A.; Del Carro, U.; Amadio, S.; Visigalli, I.; Sessa, M.; Fasano, S.; Brambilla, R.; Marchesini, S.; Bordignon, C.; Naldini, L. Correction of metachromatic leukodystrophy in the mouse model by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *J. Clin. Invest.* 113:1118–1129; 2004.
7. Bittner, R. E.; Schofer, C.; Weipoltshammer, K.; Ivanova, S.; Streubel, B.; Hauser, E.; Freilinger, M.; Hoger, H.; Elbe-Burger, A.; Wachtler, F. Recruitment of bone mar-

- row derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anat. Embryol.* 199:391–396; 1999.
8. Brazelton, T. R.; Rossi, F. M.; Keshet, G. I.; Blau, H. M. From marrow to brain: Expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 290:1775–1779; 2000.
 9. Cho, S. R.; Kim, Y. R.; Kang, H. S.; Yim, S. H.; Park, C. I.; Min, Y. H.; Lee, B. H.; Shin, J. C.; Lim, J. B. Functional recovery after the transplantation of neurally differentiated mesenchymal stem cells derived from bone marrow in a rat model of spinal cord injury. *Cell Transplant.* 18:1359–1368; 2009.
 10. Cohen-Tannoudji, M.; Babinet, C.; Morello, D. LacZ and ubiquitously expressed genes: Should divorce be pronounced? *Transgenic Res.* 9:233–235; 2000.
 11. Corti, S.; Locatelli, F.; Donadoni, C.; Guglieri, M.; Papadimitriou, D.; Strazzer, S.; Del Bo, R.; Comi, G. P. Wild type bone marrow cells ameliorate the phenotype of SOD1-G93A ALS mice and contribute to CNS, heart and skeletal muscle tissues. *Brain* 127:2518–2532; 2004.
 12. Corti, S.; Locatelli, F.; Strazzer, S.; Salani, S.; Del Bo, R.; Soligo, D.; Bossolasco, P.; Bresolin, N.; Scarlato, G.; Comi, G. P. Modulated generation of neuronal cells from bone marrow by expansion and mobilization of circulating stem cells with in vivo cytokine treatment. *Exp. Neurol.* 177:443–452; 2002.
 13. Crespo, C.; Alonso, J. R.; Briñón, J. G.; Weruaga, E.; Porteros, A.; Arévalo, R.; Aijón, J. Calcium-binding proteins in the periglomerular region of typical and atypical olfactory glomeruli. *Brain Res.* 745:293–302; 1997.
 14. Díaz, D.; Valero, J.; Airado, C.; Baltanás, F. C.; Weruaga, E.; Alonso, J. R. Sexual dimorphic stages affect both proliferation and serotonergic innervation in the adult rostral migratory stream. *Exp. Neurol.* 216:357–364; 2009.
 15. Eglitis, M. A.; Mezey, E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4080–4085; 1997.
 16. Fernández-González, A.; La Spada, A. R.; Treadaway, J.; Higdon, J. C.; Harris, B. S.; Sidman, R. L.; Morgan, J. I.; Zuo, J. *Purkinje cell degeneration (pcd)* phenotypes caused by mutations in the axotomy induced gene, *Nna1*. *Science* 295:1904–1906; 2002.
 17. Greer, C. A.; Halász, N. Plasticity of dendrodendritic microcircuits following mitral cell loss in the olfactory bulb of the murine mutant Purkinje cell degeneration. *J. Comp. Neurol.* 256:284–298; 1987.
 18. Greer, C. A.; Shepherd, G. M. Mitral cell degeneration and sensory function in the neurological mutant mouse *Purkinje cell degeneration (pcd)*. *Brain Res.* 235:156–161; 1982.
 19. Gussoni, E.; Soneoka, Y.; Strickland, C. D.; Buzney, E. A.; Khan, M. K.; Flint, A. F.; Kunkel, L. M.; Mulligan, R. C. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401:390–394; 1999.
 20. Hadjantonakis, A. K.; Gertsenstein, M.; Ikawa, M.; Okabe, M.; Nagy, A. Generating green fluorescent mice by germline transmission of green fluorescent ES cells. *Mech. Dev.* 76:79–90; 1998.
 21. Hess, D. C.; Abe, T.; Hill, W. D.; Studdard, A. M.; Carothers, J.; Masuya, M.; Fleming, P. A.; Drake, C. J.; Ogawa, M. Hematopoietic origin of microglial and perivascular cells in brain. *Exp. Neurol.* 186:134–144; 2004.
 22. Jackson, K. A.; Majka, S. M.; Wang, H.; Pocius, J.; Hartley, C. J.; Majesky, M. W.; Entman, M. L.; Michael, L. H.; Hirschi, K. K.; Goodell, M. A. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J. Clin. Invest.* 107:1395–1402; 2001.
 23. Johansson, C. B.; Youssef, S.; Koleckar, K.; Holbrook, C.; Doyonnas, R.; Corbel, S. Y.; Steinman, L.; Rossi, F. M.; Blau, H. M. Extensive fusion of hematopoietic cells with Purkinje neurons in response to chronic inflammation. *Nat. Cell Biol.* 10:575–583; 2008.
 24. Krause, D. S.; Theise, N. D.; Collector, M. I.; Henegariu, O.; Hwang, S.; Gardner, R.; Neutzel, S.; Sharkis, S. J. Multi organ, multi lineage engraftment by a single bone marrow derived stem cell. *Cell* 105:369–377; 2001.
 25. Kyuhou, S.; Kato, N.; Gamba, H. Emergence of endoplasmic reticulum stress and activated microglia in Purkinje cell degeneration mice. *Neurosci. Lett.* 396:91–96; 2006.
 26. Lagasse, E.; Connors, H.; Al Dhalimy, M.; Reitsma, M.; Dohse, M.; Osborne, L.; Wang, X.; Finegold, M.; Weissman, I. L.; Grompe, M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat. Med.* 6:1229–1234; 2000.
 27. Landis, S. C.; Mullen, R. J. The development and degeneration of Purkinje cells in *pcd* mutant mice. *J. Comp. Neurol.* 177:125–143; 1978.
 28. Lewandoski, M.; Meyers, E. N.; Martin, G. R. Analysis of *Fgf8* gene function in vertebrate development. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 62:159–168; 1997.
 29. Long, M. A.; Rossi, F. M. Silencing inhibits Cre-mediated recombination of the *Z/AP* and *Z/EG* reporters in adult cells. *PLoS One* 4:e5435; 2009.
 30. Magrassi, L.; Grimaldi, P.; Ibatici, A.; Corselli, M.; Ciardelli, L.; Castello, S.; Podesta, M.; Frassoni, F.; Rossi, F. Induction and survival of binucleated Purkinje neurons by selective damage and aging. *J. Neurosci.* 27:9885–9892; 2007.
 31. Mao, X.; Fujiwara, Y.; Orkin, S. H. Improved reporter strain for monitoring Cre recombinase mediated DNA excisions in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:5037–5042; 1999.
 32. Massengale, M.; Wagers, A. J.; Vogel, H.; Weissman, I. L. Hematopoietic cells maintain hematopoietic fates upon entering the brain. *J. Exp. Med.* 201:1579–1589; 2005.
 33. Matsuda, R.; Yoshikawa, M.; Kimura, H.; Ouji, Y.; Nakase, H.; Nishimura, F.; Nonaka, J.; Toriumi, H.; Yamada, S.; Nishiofuku, M.; Moriya, K.; Ishizaka, S.; Nakamura, M.; Sakaki, T. Cotransplantation of mouse embryonic stem cells and bone marrow stromal cells following spinal cord injury suppresses tumor development. *Cell Transplant.* 18:39–54; 2009.
 34. Mezey, E.; Chandross, K. J.; Harta, G.; Maki, R. A.; McKecher, S. R. Turning blood into brain: Cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 290:1779–1782; 2000.
 35. Mezey, E.; Key, S.; Vogelsang, G.; Szalayova, I.; Lange, G. D.; Crain, B. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:1364–1369; 2003.
 36. Mullen, R. J.; Eicher, E. M.; Sidman, R. L. Purkinje cell degeneration, a new neurological mutation in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:208–212; 1976.
 37. Nakano, K.; Migita, M.; Mochizuki, H.; Shimada, T. Differentiation of transplanted bone marrow cells in the adult mouse brain. *Transplantation* 71:1735–1740; 2001.
 38. Nygren, J. M.; Liuba, K.; Breitbach, M.; Stott, S.; Thoren, L.; Roell, W.; Geisen, C.; Sasse, P.; Kirik, D.; Björklund,

- A.; Nerlov, C.; Fleischmann, B. K.; Jovinge, S.; Jacobsen, S. E. Myeloid and lymphoid contribution to non haematopoietic lineages through irradiation induced heterotypic cell fusion. *Nat. Cell Biol.* 10:584–592; 2008.
39. Ogle, B. M.; Cascalho, M.; Platt, J. L. Biological implications of cell fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6:567–575; 2005.
 40. Orlic, D.; Kajstura, J.; Chimenti, S.; Jakoniuk, I.; Anderson, S. M.; Li, B.; Pickel, J.; McKay, R.; Nadal-Ginard, B.; Bodine, D. M.; Leri, A.; Anversa, P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410:701–705; 2001.
 41. Petersen, B. E.; Bowen, W. C.; Patrene, K. D.; Mars, W. M.; Sullivan, A. K.; Murase, N.; Boggs, S. S.; Greenberger, J. S.; Goff, J. P. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284:1168–1170; 1999.
 42. Priller, J.; Flugel, A.; Wehner, T.; Boentert, M.; Haas, C. A.; Prinz, M.; Fernández-Klett, F.; Prass, K.; Bechmann, I.; de Boer, B. A.; Frotscher, M.; Kreutzberg, G. W.; Persons, D. A.; Dirnagl, U. Targeting gene modified hematopoietic cells to the central nervous system: Use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nat. Med.* 7:1356–1361; 2001.
 43. Priller, J.; Persons, D. A.; Klett, F. F.; Kempermann, G.; Kreutzberg, G. W.; Dirnagl, U. Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene marked bone marrow cells in vivo. *J. Cell Biol.* 155:733–738; 2001.
 44. Recio, J. S.; Weruaga, E.; Gómez, C.; Valero, J.; Brinón, J. G.; Alonso, J. R. Changes in the connections of the main olfactory bulb after mitral cell selective neurodegeneration. *J. Neurosci. Res.* 85:2407–2421; 2007.
 45. Simard, A. R.; Rivest, S. Bone marrow stem cells have the ability to populate the entire central nervous system into fully differentiated parenchymal microglia. *FASEB J.* 18:998–1000; 2004.
 46. Solomon, J. N.; Lewis, C. A.; Ajami, B.; Corbel, S. Y.; Rossi, F. M.; Krieger, C. Origin and distribution of bone marrow derived cells in the central nervous system in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Glia* 53:744–753; 2006.
 47. Terada, N.; Hamazaki, T.; Oka, M.; Hoki, M.; Mastalerz, D. M.; Nakano, Y.; Meyer, E. M.; Morel, L.; Petersen, B. E.; Scott, E. W. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416:542–545; 2002.
 48. Theise, N. D.; Badve, S.; Saxena, R.; Henegariu, O.; Sell, S.; Crawford, J. M.; Krause, D. S. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation induced myeloablation. *Hepatology* 31:235–240; 2000.
 49. Valero, J.; Weruaga, E.; Murias, A. R.; Recio, J. S.; Curto, G. G.; Gómez, C.; Alonso, J. R. Changes in cell migration and survival in the olfactory bulb of the *pcd/pcd* mouse. *Dev. Neurobiol.* 67:839–859; 2007.
 50. Wagers, A. J.; Sherwood, R. I.; Christensen, J. L.; Weissman, I. L. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 297:2256–2259; 2002.
 51. Wang, X.; Willenbring, H.; Akkari, Y.; Torimaru, Y.; Foster, M.; Al Dhalimy, M.; Lagasse, E.; Finegold, M.; Olson, S.; Grompe, M. Cell fusion is the principal source of bone marrow derived hepatocytes. *Nature* 422:897–901; 2003.
 52. Wehner, T.; Bontert, M.; Eyupoglu, I.; Prass, K.; Prinz, M.; Klett, F. F.; Heinze, M.; Bechmann, I.; Nitsch, R.; Kirchhoff, F.; Kettenmann, H.; Dirnagl, U.; Priller, J. Bone marrow derived cells expressing green fluorescent protein under the control of the glial fibrillary acidic protein promoter do not differentiate into astrocytes in vitro and in vivo. *J. Neurosci.* 23:5004–5011; 2003.
 53. Weimann, J. M.; Charlton, C. A.; Brazelton, T. R.; Hackman, R. C.; Blau, H. M. Contribution of transplanted bone marrow cells to Purkinje neurons in human adult brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:2088–2093; 2003.
 54. Weimann, J. M.; Johansson, C. B.; Trejo, A.; Blau, H. M. Stable reprogrammed heterokaryons form spontaneously in Purkinje neurons after bone marrow transplant. *Nat. Cell Biol.* 5:959–966; 2003.
 55. Weruaga, E.; Brinón, J. G.; Barbado, V.; Aijón, J.; Alonso, J. R. A standardized model for the anatomical division of the rodent olfactory bulb. *Eur. J. Anat.* 3:27–34; 1999.
 56. Yang, T.; Tsang, K. S.; Poon, W. S.; Ng, H. K. Neurotrophism of bone marrow stromal cells to embryonic stem cells: Noncontact induction and transplantation to a mouse ischemic stroke model. *Cell Transplant.* 18:391–404; 2009.

BIBLIOGRAFÍA

- Abedi, M., D. A. Greer, et al. (2005). "Critical variables in the conversion of marrow cells to skeletal muscle." Blood **106**(4): 1488-94.
- Alaminos, M., B. Perez-Kohler, et al. "Transdifferentiation potentiality of human Wharton's jelly stem cells towards vascular endothelial cells." J Cell Physiol **223**(3): 640-7.
- Alison, M. R., R. Poulson, et al. (2000). "Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells." Nature **406**(6793): 257.
- Alvarez-Dolado, M. (2007). "Cell fusion: biological perspectives and potential for regenerative medicine." Front Biosci **12**: 1-12.
- Alvarez-Dolado, M. and M. Martinez-Losa "Cell fusion and tissue regeneration." Adv Exp Med Biol **713**: 161-75.
- Alvarez-Dolado, M., R. Pardal, et al. (2003). "Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes." Nature **425**(6961): 968-73.
- Anderson, J. M. (2000). "Multinucleated giant cells." Curr Opin Hematol **7**(1): 40-7.
- Anzalone, R., M. Lo Iacono, et al. (2010). "New emerging potentials for human Wharton's jelly mesenchymal stem cells: immunological features and hepatocyte-like differentiative capacity." Stem Cells Dev **19**(4): 423-38.
- Awatramani, R., P. Soriano, et al. (2001). "An Flp indicator mouse expressing alkaline phosphatase from the ROSA26 locus." Nat Genet **29**(3): 257-9.
- Bae, J. S., S. Furuya, et al. (2005). "Neurodegeneration augments the ability of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to fuse with Purkinje neurons in Niemann-Pick type C mice." Hum Gene Ther **16**(8): 1006-11.
- Bae, J. S., H. S. Han, et al. (2007). "Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote neuronal networks with functional synaptic transmission after transplantation into mice with neurodegeneration." Stem Cells **25**(5): 1307-16.
- Bailey, A. S., S. Jiang, et al. (2004). "Transplanted adult hematopoietic stem cells differentiate into functional endothelial cells." Blood **103**(1): 13-9.
- Bailey, A. S., H. Willenbring, et al. (2006). "Myeloid lineage progenitors give rise to vascular endothelium." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(35): 13156-61.

- Barker, M. S. S. a. J. E. (1999). Percutaneous intravenous injection in neonatal mice.
- Barski, G., S. Sorieul, et al. (1960). "[Production of cells of a "hybrid" nature in culturs in vitro of 2 cellular strains in combination.]" C R Hebd Seances Acad Sci **251**: 1825-7.
- Baum, C. M., I. L. Weissman, et al. (1992). "Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(7): 2804-8.
- Becker, A. J., C. E. Mc, et al. (1963). "Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells." Nature **197**: 452-4.
- Beech, J. S., S. C. Williams, et al. (2001). "Further characterisation of a thromboembolic model of stroke in the rat." Brain Res **895**(1-2): 18-24.
- Berná G, L.-Q. T., Fuentes E (2001). "Ingeniería celular y diabetes mellitus." Rev clin Esp **201**: 548-56.
- Bianco, P., M. Riminucci, et al. (2001). "Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications." Stem Cells **19**(3): 180-92.
- Bittner, R. E., C. Schofer, et al. (1999). "Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice." Anat Embryol (Berl) **199**(5): 391-6.
- Blau, H. M., C. P. Chiu, et al. (1983). "Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons." Cell **32**(4): 1171-80.
- Bonilla, S., P. Alarcon, et al. (2002). "Haematopoietic progenitor cells from adult bone marrow differentiate into cells that express oligodendroglial antigens in the neonatal mouse brain." Eur J Neurosci **15**(3): 575-82.
- Brittan, M. and N. A. Wright (2002). "Gastrointestinal stem cells." J Pathol **197**(4): 492-509.
- Broxmeyer, H. E., G. W. Douglas, et al. (1989). "Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(10): 3828-32.
- Burger, P. E., X. Xiong, et al. (2005). "Sca-1 expression identifies stem cells in the proximal region of prostatic ducts with high capacity to reconstitute prostatic

- tissue." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(20): 7180-5.
- Caballero, M., C. R. Reed, et al. (2010). "Osteoinduction in umbilical cord- and palate periosteum-derived mesenchymal stem cells." Ann Plast Surg **64**(5): 605-9.
- Camargo, F. D., M. Finegold, et al. (2004). "Hematopoietic myelomonocytic cells are the major source of hepatocyte fusion partners." J Clin Invest **113**(9): 1266-70.
- Camargo, F. D., R. Green, et al. (2003). "Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates." Nat Med **9**(12): 1520-7.
- Campagnoli, C., I. A. Roberts, et al. (2001). "Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow." Blood **98**(8): 2396-402.
- Campbell, D. B. and E. J. Hess (1996). "Chromosomal localization of the neurological mouse mutations tottering (tg), Purkinje cell degeneration (pcd), and nervous (nr)." Brain Res Mol Brain Res **37**(1-2): 79-84.
- Campion, D. R. (1984). "The muscle satellite cell: a review." Int Rev Cytol **87**: 225-51.
- Caplan, A. I. (1991). "Mesenchymal stem cells." J Orthop Res **9**(5): 641-50.
- Caplan, A. I. and S. P. Bruder (2001). "Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century." Trends Mol Med **7**(6): 259-64.
- Carmichael, S. T. (2005). "Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose." NeuroRx **2**(3): 396-409.
- Castro-Malaspina, H., R. E. Gay, et al. (1980). "Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny." Blood **56**(2): 289-301.
- Clayton, H., I. Titley, et al. (2004). "Growth and differentiation of progenitor/stem cells derived from the human mammary gland." Exp Cell Res **297**(2): 444-60.
- Condorelli, G. and C. Peschle (2005). "Stem cells for cardiac repair: state of the art." Front Biosci **10**: 3143-50.
- Cowan, C. A., J. Atienza, et al. (2005). "Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells." Science **309**(5739): 1369-73.

- Chakrabarti, L., J. T. Neal, et al. (2006). "The Purkinje cell degeneration 5J mutation is a single amino acid insertion that destabilizes Nna1 protein." Mamm Genome **17**(2): 103-10.
- Chang, A. C. and B. Ghetti (1993). "Embryonic cerebellar graft development during acute phase of gliosis in the cerebellum of pcd mutant mice." Chin J Physiol **36**(3): 141-9.
- Chen, J. and M. Chopp (2006). "Neurorestorative treatment of stroke: cell and pharmacological approaches." NeuroRx **3**(4): 466-73.
- Chen, J., Y. Li, et al. (2003). "Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat." J Neurosci Res **73**(6): 778-86.
- Chen, J., Y. Li, et al. (2001). "Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats." Stroke **32**(4): 1005-11.
- Chen, J., Z. G. Zhang, et al. (2003). "Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats." Circ Res **92**(6): 692-9.
- Chiang, C. S., W. H. McBride, et al. (1993). "Radiation-induced astrocytic and microglial responses in mouse brain." Radiother Oncol **29**(1): 60-8.
- Chopp, M., Y. Li, et al. (2008). "Plasticity and remodeling of brain." J Neurol Sci **265**(1-2): 97-101.
- Danet, G. H., J. L. Luongo, et al. (2002). "C1qRp defines a new human stem cell population with hematopoietic and hepatic potential." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(16): 10441-5.
- Davies, P. S., A. E. Powell, et al. (2009). "Inflammation and proliferation act together to mediate intestinal cell fusion." PLoS One **4**(8): e6530.
- Dawn, B. and R. Bolli (2005). "Adult bone marrow-derived cells: regenerative potential, plasticity, and tissue commitment." Basic Res Cardiol **100**(6): 494-503.
- De Bari, C., F. Dell'Accio, et al. (2003). "Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane." J Cell Biol **160**(6): 909-18.
- De Coppi, P., G. Bartsch, Jr., et al. (2007). "Isolation of amniotic stem cell lines with

- potential for therapy." Nat Biotechnol **25**(1): 100-6.
- Deb, A., S. Wang, et al. (2003). "Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: A study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients." Circulation **107**(9): 1247-9.
- Deng, W., M. Obrocka, et al. (2001). "In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP." Biochem Biophys Res Commun **282**(1): 148-52.
- Doetsch, F. (2003). "A niche for adult neural stem cells." Curr Opin Genet Dev **13**(5): 543-50.
- Doyonnas, R., M. A. LaBarge, et al. (2004). "Hematopoietic contribution to skeletal muscle regeneration by myelomonocytic precursors." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(37): 13507-12.
- Duelli, D. and Y. Lazebnik (2003). "Cell fusion: a hidden enemy?" Cancer Cell **3**(5): 445-8.
- Duelli, D. and Y. Lazebnik (2007). "Cell-to-cell fusion as a link between viruses and cancer." Nat Rev Cancer **7**(12): 968-76.
- Duelli, D. M., S. Hearn, et al. (2005). "A primate virus generates transformed human cells by fusion." J Cell Biol **171**(3): 493-503.
- Duncan, A. W., R. D. Hickey, et al. (2009). "Ploidy reductions in murine fusion-derived hepatocytes." PLoS Genet **5**(2): e1000385.
- Eglitis, M. A. and E. Mezey (1997). "Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(8): 4080-5.
- Espejel, S., R. Romero, et al. (2009). "Radiation damage increases Purkinje neuron heterokaryons in neonatal cerebellum." Ann Neurol **66**(1): 100-9.
- Evans, M. J. and M. H. Kaufman (1981). "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos." Nature **292**(5819): 154-6.
- Fernandez-Gonzalez, A., A. R. La Spada, et al. (2002). "Purkinje cell degeneration (pcd) phenotypes caused by mutations in the axotomy-induced gene, Nna1." Science **295**(5561): 1904-6.

- Ferrari, G., G. Cusella-De Angelis, et al. (1998). "Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors." Science **279**(5356): 1528-30.
- Ferrari, G., A. Stornaiuolo, et al. (2001). "Failure to correct murine muscular dystrophy." Nature **411**(6841): 1014-5.
- Forraz, N. and C. P. McGuckin (2011). "The umbilical cord: a rich and ethical stem cell source to advance regenerative medicine." Cell Prolif **44 Suppl 1**: 60-9.
- Friedenstein, A. J. (1976). "Precursor cells of mechanocytes." Int Rev Cytol **47**: 327-59.
- Friedenstein, A. J., R. K. Chailakhjan, et al. (1970). "The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells." Cell Tissue Kinet **3**(4): 393-403.
- Friedenstein, A. J., S. Piatetzky, II, et al. (1966). "Osteogenesis in transplants of bone marrow cells." J Embryol Exp Morphol **16**(3): 381-90.
- Friedrich, G. and P. Soriano (1991). "Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice." Genes Dev **5**(9): 1513-23.
- Fuchs, S., L. F. Satler, et al. (2003). "Catheter-based autologous bone marrow myocardial injection in no-option patients with advanced coronary artery disease: a feasibility study." J Am Coll Cardiol **41**(10): 1721-4.
- Fujino, H., H. Hiramatsu, et al. (2007). "Human cord blood CD34+ cells develop into hepatocytes in the livers of NOD/SCID/gamma(c) null mice through cell fusion." Faseb J **21**(13): 3499-510.
- Fujiwara, T., M. Bandi, et al. (2005). "Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells." Nature **437**(7061): 1043-7.
- Fulop, T., G. Dupuis, et al. (2015). "From inflamm-aging to immune-paralysis: a slippery slope during aging for immune-adaptation." Biogerontology.
- Gage, F. H. (2000). "Mammalian neural stem cells." Science **287**(5457): 1433-8.
- Gerhardt, H. and C. Betsholtz (2003). "Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis." Cell Tissue Res **314**(1): 15-23.
- Gibson, A. J., J. Karasinski, et al. (1995). "Dermal fibroblasts convert to a myogenic

- lineage in mdx mouse muscle." J Cell Sci **108 (Pt 1)**: 207-14.
- Gnecchi, M., Z. Zhang, et al. (2008). "Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy." Circ Res **103**(11): 1204-19.
- Grewal, S. S., J. P. Kahn, et al. (2004). "Successful hematopoietic stem cell transplantation for Fanconi anemia from an unaffected HLA-genotype-identical sibling selected using preimplantation genetic diagnosis." Blood **103**(3): 1147-51.
- Griffiths, M. J., D. Bonnet, et al. (2005). "Stem cells of the alveolar epithelium." Lancet **366**(9481): 249-60.
- Grove, J. E., E. Bruscia, et al. (2004). "Plasticity of bone marrow-derived stem cells." Stem Cells **22**(4): 487-500.
- Guettier, C. (2005). "[Which stem cells for adult liver?]." Ann Pathol **25**(1): 33-44.
- Guo, Z., H. Li, et al. (2006). "In vitro characteristics and in vivo immunosuppressive activity of compact bone-derived murine mesenchymal progenitor cells." Stem Cells **24**(4): 992-1000.
- Gussoni, E., R. R. Bennett, et al. (2002). "Long-term persistence of donor nuclei in a Duchenne muscular dystrophy patient receiving bone marrow transplantation." J Clin Invest **110**(6): 807-14.
- Gussoni, E., Y. Soneoka, et al. (1999). "Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation." Nature **401**(6751): 390-4.
- Hao, H. N., J. Zhao, et al. (2003). "Fetal human hematopoietic stem cells can differentiate sequentially into neural stem cells and then astrocytes in vitro." J Hematother Stem Cell Res **12**(1): 23-32.
- Harris, A., J. I. Morgan, et al. (2000). "Regenerating motor neurons express Nna1, a novel ATP/GTP-binding protein related to zinc carboxypeptidases." Mol Cell Neurosci **16**(5): 578-96.
- Harris, H. (1965). "Behaviour of differentiated nuclei in heterokaryons of animal cells from different species." Nature **206**(984): 583-8.
- Harris, H., J. F. Watkins, et al. (1965). "Mitosis in hybrid cells derived from mouse and man." Nature **207**(997): 606-8.

- Hayakawa, J., M. Migita, et al. (2003). "Generation of a chimeric mouse reconstituted with green fluorescent protein-positive bone marrow cells: a useful model for studying the behavior of bone marrow cells in regeneration in vivo." Int J Hematol **77**(5): 456-62.
- Hellstrom, M., M. Kalen, et al. (1999). "Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse." Development **126**(14): 3047-55.
- Hess, D. C., W. D. Hill, et al. (2002). "Bone marrow as a source of endothelial cells and NeuN-expressing cells After stroke." Stroke **33**(5): 1362-8.
- Hoffmann, A., G. Pelled, et al. (2006). "Neotendon formation induced by manipulation of the Smad8 signalling pathway in mesenchymal stem cells." J Clin Invest **116**(4): 940-52.
- Hofstetter, C. P., E. J. Schwarz, et al. (2002). "Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(4): 2199-204.
- Huo, W., X. Liu, et al. (2014). "Stem cell transplantation for treating stroke: status, trends and development." Neural Regen Res **9**(17): 1643-8.
- In 't Anker, P. S., S. A. Scherjon, et al. (2003). "Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation." Blood **102**(4): 1548-9.
- Jiang, Y., B. N. Jahagirdar, et al. (2002). "Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow." Nature **418**(6893): 41-9.
- Jiang, Y., B. Vaessen, et al. (2002). "Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain." Exp Hematol **30**(8): 896-904.
- Jin, H. K. and E. H. Schuchman (2003). "Ex vivo gene therapy using bone marrow-derived cells: combined effects of intracerebral and intravenous transplantation in a mouse model of Niemann-Pick disease." Mol Ther **8**(6): 876-85.
- Johansson, C. B., S. Youssef, et al. (2008). "Extensive fusion of haematopoietic cells with Purkinje neurons in response to chronic inflammation." Nat Cell Biol **10**(5): 575-83.

- Jones, E. A., A. English, et al. (2004). "Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis." Arthritis Rheum **50**(3): 817-27.
- Jones, E. A., S. E. Kinsey, et al. (2002). "Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells." Arthritis Rheum **46**(12): 3349-60.
- Jones, J., J. Jaramillo-Merchan, et al. "Mesenchymal stem cells rescue Purkinje cells and improve motor functions in a mouse model of cerebellar ataxia." Neurobiol Dis **40**(2): 415-23.
- Kanazawa, Y. and I. M. Verma (2003). "Little evidence of bone marrow-derived hepatocytes in the replacement of injured liver." Proc Natl Acad Sci U S A **100** **Suppl 1**: 11850-3.
- Kashofer, K., E. K. Siapati, et al. (2006). "In vivo formation of unstable heterokaryons after liver damage and hematopoietic stem cell/progenitor transplantation." Stem Cells **24**(4): 1104-12.
- Kemp, K., A. Wilkins, et al. (2014). "Cell fusion in the brain: two cells forward, one cell back." Acta Neuropathol **128**(5): 629-38.
- Kohler, G. and C. Milstein (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." Nature **256**(5517): 495-7.
- Kokovay, E., L. Li, et al. (2006). "Angiogenic recruitment of pericytes from bone marrow after stroke." J Cereb Blood Flow Metab **26**(4): 545-55.
- Kopen, G. C., D. J. Prockop, et al. (1999). "Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(19): 10711-6.
- Kumar, H., T. Kawai, et al. (2009). "Toll-like receptors and innate immunity." Biochem Biophys Res Commun **388**(4): 621-5.
- Kumar, V. (2009). Acute and chronic inflammation. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Elsevier.
- Kurozumi, K., K. Nakamura, et al. (2005). "Mesenchymal stem cells that produce neurotrophic factors reduce ischemic damage in the rat middle cerebral artery occlusion model." Mol Ther **11**(1): 96-104.

- Kyuhou, S., N. Kato, et al. (2006). "Emergence of endoplasmic reticulum stress and activated microglia in Purkinje cell degeneration mice." Neurosci Lett **396**(2): 91-6.
- LaBarge, M. A. and H. M. Blau (2002). "Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury." Cell **111**(4): 589-601.
- Ladeby, R., M. Wirenfeldt, et al. (2005). "Proliferating resident microglia express the stem cell antigen CD34 in response to acute neural injury." Glia **50**(2): 121-31.
- Laflamme, M. A., D. Myerson, et al. (2002). "Evidence for cardiomyocyte repopulation by extracardiac progenitors in transplanted human hearts." Circ Res **90**(6): 634-40.
- Lagasse, E., H. Connors, et al. (2000). "Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo." Nat Med **6**(11): 1229-34.
- Leri, A., J. Kajstura, et al. (2005). "Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration." Physiol Rev **85**(4): 1373-416.
- Lescaudron, L., D. Unni, et al. (2003). "Autologous adult bone marrow stem cell transplantation in an animal model of huntington's disease: behavioral and morphological outcomes." Int J Neurosci **113**(7): 945-56.
- Li, Y., J. Chen, et al. (2001). "Intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease." Neurosci Lett **316**(2): 67-70.
- Li, Y. and M. Chopp (2009). "Marrow stromal cell transplantation in stroke and traumatic brain injury." Neurosci Lett **456**(3): 120-3.
- Li, Y., M. Chopp, et al. (2000). "Intrastriatal transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice." J Cereb Blood Flow Metab **20**(9): 1311-9.
- Liao, R., O. Pfister, et al. (2007). "The bone marrow--cardiac axis of myocardial regeneration." Prog Cardiovasc Dis **50**(1): 18-30.
- Lim, F., G. M. Palomo, et al. (2007). "Functional recovery in a Friedreich's ataxia mouse model by frataxin gene transfer using an HSV-1 amplicon vector." Mol

Ther **15**(6): 1072-8.

Lindahl, P., B. R. Johansson, et al. (1997). "Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice." Science **277**(5323): 242-5.

Lu, X. and Y. Kang (2009). "Cell fusion as a hidden force in tumor progression." Cancer Res **69**(22): 8536-9.

Magrassi, L., P. Grimaldi, et al. (2007). "Induction and survival of binucleated Purkinje neurons by selective damage and aging." J Neurosci **27**(37): 9885-92.

Mahmood, A., D. Lu, et al. (2001). "Treatment of traumatic brain injury in female rats with intravenous administration of bone marrow stromal cells." Neurosurgery **49**(5): 1196-203; discussion 1203-4.

Makino, S., K. Fukuda, et al. (1999). "Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro." J Clin Invest **103**(5): 697-705.

Mao, X., Y. Fujiwara, et al. (1999). "Improved reporter strain for monitoring Cre recombinase-mediated DNA excisions in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(9): 5037-42.

Martin-Padura, I., P. Marighetti, et al. "Spontaneous cell fusion of acute leukemia cells and macrophages observed in cells with leukemic potential." Neoplasia **14**(11): 1057-66.

Martin, G. M. and C. A. Sprague (1970). "Vinblastine induces multipolar mitoses in tetraploid human cells." Exp Cell Res **63**(2): 466-7.

Martin, G. R. (1981). "Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(12): 7634-8.

Massengale, M., A. J. Wagers, et al. (2005). "Hematopoietic cells maintain hematopoietic fates upon entering the brain." J Exp Med **201**(10): 1579-89.

Mathur, A. and J. F. Martin (2004). "Stem cells and repair of the heart." Lancet **364**(9429): 183-92.

Matsuura, K., H. Wada, et al. (2004). "Cardiomyocytes fuse with surrounding noncardiomyocytes and reenter the cell cycle." J Cell Biol **167**(2): 351-63.

- McCune, J. M., L. B. Rabin, et al. (1988). "Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus." Cell **53**(1): 55-67.
- McElreavey, K. D., A. I. Irvine, et al. (1991). "Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord." Biochem Soc Trans **19**(1): 29S.
- Mekler, L. B. (1971). "[Hybridization of transformed cells with lymphocytes as 1 of the probable causes of the progression leading to the development of metastatic malignant cells]." Vestn Akad Med Nauk SSSR **26**(8): 80-9.
- Mekler, L. B., O. B. Drize, et al. (1971). "[Transformation of a normal differentiated cell of an adult organism, induced by the fusion of this cell with another normal cell of the same organism but with different organ or tissue specificity]." Vestn Akad Med Nauk SSSR **26**(4): 75-80.
- Miller, F. R., A. N. Mohamed, et al. (1989). "Production of a more aggressive tumor cell variant by spontaneous fusion of two mouse tumor subpopulations." Cancer Res **49**(15): 4316-21.
- Mimeault, M. and S. K. Batra (2006). "Concise review: recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies." Stem Cells **24**(11): 2319-45.
- Modlin, I. M., M. Kidd, et al. (2003). "Gastric stem cells: an update." Keio J Med **52**(2): 134-7.
- Mullen, R. J., E. M. Eicher, et al. (1976). "Purkinje cell degeneration, a new neurological mutation in the mouse." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **73**(1): 208-12.
- Mullis, K., F. Faloona, et al. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 263-73.
- Nygren, J. M., S. Jovinge, et al. (2004). "Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation." Nat Med **10**(5): 494-501.
- Nygren, J. M., K. Liuba, et al. (2008). "Myeloid and lymphoid contribution to non-haematopoietic lineages through irradiation-induced heterotypic cell fusion." Nat Cell Biol **10**(5): 584-92.

- O'Gorman, S. and R. L. Sidman (1985). "Degeneration of thalamic neurons in "Purkinje cell degeneration" mutant mice. I. Distribution of neuron loss." J Comp Neurol **234**(3): 277-97.
- Ogle, B. M., M. Cascalho, et al. (2005). "Biological implications of cell fusion." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(7): 567-75.
- Okamoto, R., T. Yajima, et al. (2002). "Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract." Nat Med **8**(9): 1011-7.
- Orlic, D. and D. M. Bodine (1994). "What defines a pluripotent hematopoietic stem cell (PHSC): will the real PHSC please stand up!" Blood **84**(12): 3991-4.
- Orlic, D., J. Kajstura, et al. (2001). "Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium." Nature **410**(6829): 701-5.
- Orlic, D., J. Kajstura, et al. (2001). "Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(18): 10344-9.
- Owen, M. (1988). "Marrow stromal stem cells." J Cell Sci Suppl **10**: 63-76.
- Ozerdem, U. and W. B. Stallcup (2003). "Early contribution of pericytes to angiogenic sprouting and tube formation." Angiogenesis **6**(3): 241-9.
- Pachter, J. S., H. E. de Vries, et al. (2003). "The blood-brain barrier and its role in immune privilege in the central nervous system." J Neuropathol Exp Neurol **62**(6): 593-604.
- Paradells, S., I. Zipancic, et al. (2014). "Lipoic acid and bone marrow derived cells therapy induce angiogenesis and cell proliferation after focal brain injury." Brain Inj **29**(3): 380-95.
- Pawelek, J. M. (2000). "Tumour cell hybridization and metastasis revisited." Melanoma Res **10**(6): 507-14.
- Perin, E. C., H. F. Dohmann, et al. (2003). "Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure." Circulation **107**(18): 2294-302.
- Petersen, B. E., W. C. Bowen, et al. (1999). "Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells." Science **284**(5417): 1168-70.

- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, et al. (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." Science **284**(5411): 143-7.
- Pomerantz, J. and H. M. Blau (2004). "Nuclear reprogramming: a key to stem cell function in regenerative medicine." Nat Cell Biol **6**(9): 810-6.
- Potgens, A. J., U. Schmitz, et al. (2002). "Mechanisms of syncytial fusion: a review." Placenta **23 Suppl A**: S107-13.
- Prasad, V. K. and J. Kurtzberg (2010). "Cord blood and bone marrow transplantation in inherited metabolic diseases: scientific basis, current status and future directions." Br J Haematol **148**(3): 356-72.
- Priller, J., A. Flugel, et al. (2001). "Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment." Nat Med **7**(12): 1356-61.
- Priller, J., D. A. Persons, et al. (2001). "Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo." J Cell Biol **155**(5): 733-8.
- Prockop, D. J. (1997). "Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues." Science **276**(5309): 71-4.
- Prockop, D. J. and S. D. Olson (2007). "Clinical trials with adult stem/progenitor cells for tissue repair: let's not overlook some essential precautions." Blood **109**(8): 3147-51.
- Rajantie, I., M. Ilmonen, et al. (2004). "Adult bone marrow-derived cells recruited during angiogenesis comprise precursors for periendothelial vascular mural cells." Blood **104**(7): 2084-6.
- Ringertz, N. R. and R. E. Savage (1976). Cell Hybrids. New York, Academic Press.
- Rizvi, A. Z., J. R. Swain, et al. (2006). "Bone marrow-derived cells fuse with normal and transformed intestinal stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(16): 6321-5.
- Rosser, A. E., R. Zietlow, et al. (2007). "Stem cell transplantation for neurodegenerative diseases." Curr Opin Neurol **20**(6): 688-92.
- Sanchez-Ramos, J., S. Song, et al. (2000). "Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro." Exp Neurol **164**(2): 247-56.

- Sarugaser, R., D. Lickorish, et al. (2005). "Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors." Stem Cells **23**(2): 220-9.
- Sauer, B. and N. Henderson (1988). "Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(14): 5166-70.
- Schmid-Elsaesser, R., S. Zausinger, et al. (1998). "A critical reevaluation of the intraluminal thread model of focal cerebral ischemia: evidence of inadvertent premature reperfusion and subarachnoid hemorrhage in rats by laser-Doppler flowmetry." Stroke **29**(10): 2162-70.
- Schneider, R. K., A. Pullen, et al. (2010). "Long-term survival and characterisation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on dermal equivalents." Differentiation **79**(3): 182-93.
- Schroeter, M., S. Jander, et al. (2002). "Non-invasive induction of focal cerebral ischemia in mice by photothrombosis of cortical microvessels: characterization of inflammatory responses." J Neurosci Methods **117**(1): 43-9.
- Seaberg, R. M., S. R. Smukler, et al. (2004). "Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages." Nat Biotechnol **22**(9): 1115-24.
- Shan, Y. X., S. Z. Jin, et al. (2007). "Ionizing radiation stimulates secretion of pro-inflammatory cytokines: dose-response relationship, mechanisms and implications." Radiat Environ Biophys **46**(1): 21-9.
- Sharma, A., H. Sane, et al. (2014). "Autologous bone marrow mononuclear cells intrathecal transplantation in chronic stroke." Stroke Res Treat **2014**: 234095.
- Shimomura, O. (2005). "The discovery of aequorin and green fluorescent protein." J Microsc **217**(Pt 1): 1-15.
- Sims, N. R. and H. Muyderman "Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke." Biochim Biophys Acta **1802**(1): 80-91.
- Skinner, A. M., M. Grompe, et al. (2015). "Intra-hematopoietic cell fusion as a source of somatic variation in the hematopoietic system." J Cell Sci **125**(Pt 12): 2837-43.
- Smith, L. G., I. L. Weissman, et al. (1991). "Clonal analysis of hematopoietic stem-cell

- differentiation in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(7): 2788-92.
- Soriano, P. (1999). "Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain." Nat Genet **21**(1): 70-1.
- Spangrude, G. J., S. Heimfeld, et al. (1988). "Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells." Science **241**(4861): 58-62.
- Spees, J. L., S. D. Olson, et al. (2006). "Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(5): 1283-8.
- Sternberg, N., D. Hamilton, et al. (1981). "Bacteriophage P1 site-specific recombination. II. Recombination between loxP and the bacterial chromosome." J Mol Biol **150**(4): 487-507.
- Storchova, Z. and C. Kuffer (2008). "The consequences of tetraploidy and aneuploidy." J Cell Sci **121**(Pt 23): 3859-66.
- Strathdee, D., H. Ibbotson, et al. (2006). "Expression of transgenes targeted to the Gt(ROSA)26Sor locus is orientation dependent." PLoS One **1**: e4.
- Sturrock, R. R. (1989). "Age related changes in Purkinje cell number in the cerebellar nodulus of the mouse." J Hirnforsch **30**(6): 757-60.
- Sun, T. T. and R. M. Lavker (2004). "Corneal epithelial stem cells: past, present, and future." J Invest Dermatol Symp Proc **9**(3): 202-7.
- Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." Cell **126**(4): 663-76.
- Tanaka, K. and M. Sata (2009). "Role of vascular progenitor cells in cardiovascular disease." Curr Pharm Des **15**(24): 2760-8.
- Tang, Y., T. Yasuhara, et al. (2007). "Transplantation of bone marrow-derived stem cells: a promising therapy for stroke." Cell Transplant **16**(2): 159-69.
- Temple, S. (2001). "The development of neural stem cells." Nature **414**(6859): 112-7.
- Terada, N., T. Hamazaki, et al. (2002). "Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion." Nature **416**(6880): 542-5.

- Theise, N. D., M. Nimmakayalu, et al. (2000). "Liver from bone marrow in humans." Hepatology **32**(1): 11-6.
- Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, et al. (1998). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." Science **282**(5391): 1145-7.
- Tigges, U., E. G. Hyer, et al. (2008). "FGF2-dependent neovascularization of subcutaneous Matrigel plugs is initiated by bone marrow-derived pericytes and macrophages." Development **135**(3): 523-32.
- Tilton, R. G. (1991). "Capillary pericytes: perspectives and future trends." J Electron Microsc Tech **19**(3): 327-44.
- Till, J. E. and C. E. Mc (1961). "A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells." Radiat Res **14**: 213-22.
- Togel, F. and C. Westenfelder (2007). "Adult bone marrow-derived stem cells for organ regeneration and repair." Dev Dyn **236**(12): 3321-31.
- Tomita, S., R. K. Li, et al. (1999). "Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function." Circulation **100**(19 Suppl): II247-56.
- Trounson, A. (2006). "The production and directed differentiation of human embryonic stem cells." Endocr Rev **27**(2): 208-19.
- Tumbar, T., G. Guasch, et al. (2004). "Defining the epithelial stem cell niche in skin." Science **303**(5656): 359-63.
- Vannucci, S. J., L. B. Willing, et al. (2001). "Experimental stroke in the female diabetic, db/db, mouse." J Cereb Blood Flow Metab **21**(1): 52-60.
- Vassilopoulos, G. and D. W. Russell (2003). "Cell fusion: an alternative to stem cell plasticity and its therapeutic implications." Curr Opin Genet Dev **13**(5): 480-5.
- Vassilopoulos, G., P. R. Wang, et al. (2003). "Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion." Nature **422**(6934): 901-4.
- Vieyra, D. S., K. A. Jackson, et al. (2005). "Plasticity and tissue regenerative potential of bone marrow-derived cells." Stem Cell Rev **1**(1): 65-9.
- Vignery, A. (2000). "Osteoclasts and giant cells: macrophage-macrophage fusion mechanism." Int J Exp Pathol **81**(5): 291-304.

- Vignery, A. (2005). "Macrophage fusion: the making of osteoclasts and giant cells." J Exp Med **202**(3): 337-40.
- Vignery, A. (2008). "Macrophage fusion: molecular mechanisms." Methods Mol Biol **475**: 149-61.
- Vintersten, K., C. Monetti, et al. (2004). "Mouse in red: red fluorescent protein expression in mouse ES cells, embryos, and adult animals." Genesis **40**(4): 241-6.
- von Schalburg, K. R., S. P. McCarthy, et al. (2006). "Expression of morphogenic genes in mature ovarian and testicular tissues: potential stem-cell niche markers and patterning factors." Mol Reprod Dev **73**(2): 142-52.
- Wagers, A. J., R. I. Sherwood, et al. (2002). "Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells." Science **297**(5590): 2256-9.
- Wagers, A. J. and I. L. Weissman (2004). "Plasticity of adult stem cells." Cell **116**(5): 639-48.
- Wakitani, S., T. Saito, et al. (1995). "Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine." Muscle Nerve **18**(12): 1417-26.
- Wan, H., F. Li, et al. "Update on therapeutic mechanism for bone marrow stromal cells in ischemic stroke." J Mol Neurosci **52**(2): 177-85.
- Wang, J. S., D. Shum-Tim, et al. (2000). "Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages." J Thorac Cardiovasc Surg **120**(5): 999-1005.
- Wang, X., H. Willenbring, et al. (2003). "Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes." Nature **422**(6934): 897-901.
- Warner, T. F. (1975). "Cell hybridization: an explanation for the phenotypic diversity of certain tumours." Med Hypotheses **1**(1): 51-7.
- Wehner, T., M. Bontert, et al. (2003). "Bone marrow-derived cells expressing green fluorescent protein under the control of the glial fibrillary acidic protein promoter do not differentiate into astrocytes in vitro and in vivo." J Neurosci **23**(12): 5004-11.

- Weimann, J. M., C. A. Charlton, et al. (2003). "Contribution of transplanted bone marrow cells to Purkinje neurons in human adult brains." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(4): 2088-93.
- Weimann, J. M., C. B. Johansson, et al. (2003). "Stable reprogrammed heterokaryons form spontaneously in Purkinje neurons after bone marrow transplant." Nat Cell Biol **5**(11): 959-66.
- Wernig, M., A. Meissner, et al. (2007). "In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state." Nature **448**(7151): 318-24.
- Wiersema, A., F. Dijk, et al. (2007). "Cerebellar heterokaryon formation increases with age and after irradiation." Stem Cell Res **1**(2): 150-4.
- Wilson, A. and A. Trumpp (2006). "Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches." Nat Rev Immunol **6**(2): 93-106.
- Willenbring, H., A. S. Bailey, et al. (2004). "Myelomonocytic cells are sufficient for therapeutic cell fusion in liver." Nat Med **10**(7): 744-8.
- Woodbury, D., E. J. Schwarz, et al. (2000). "Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons." J Neurosci Res **61**(4): 364-70.
- Wu, H. Y., Y. Rong, et al. (2015). "Comparison of the enzymatic and functional properties of three cytosolic carboxypeptidase family members." J Biol Chem **290**(2): 1222-32.
- Xu, H. H., L. Zhao, et al. (2010). "Umbilical cord stem cell seeding on fast-resorbable calcium phosphate bone cement." Tissue Eng Part A **16**(9): 2743-53.
- Xu, L. P., X. J. Huang, et al. (2006). "[Allogenic stem cell transplantation from genotypically HLA-identical siblings for 30 patients with myelodysplastic syndromes]." Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi **27**(8): 518-21.
- Xu, Y., S. Du, et al. (2014). "Human bone marrow mesenchymal stem cell transplantation attenuates axonal injury in stroke rats." Neural Regen Res **9**(23): 2053-8.
- Yamanaka, N., C. J. Wong, et al. (2009). "Bone marrow transplantation results in human donor blood cells acquiring and displaying mouse recipient class I MHC and CD45 antigens on their surface." PLoS One **4**(12): e8489.

- Yamanaka, S. and H. M. Blau (2010). "Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches." Nature **465**(7299): 704-12.
- Ying, Q. L., J. Nichols, et al. (2002). "Changing potency by spontaneous fusion." Nature **416**(6880): 545-8.
- Yoder, M. C., J. G. Cumming, et al. (1996). "A novel method of myeloablation to enhance engraftment of adult bone marrow cells in newborn mice." Biol Blood Marrow Transplant **2**(2): 59-67.
- Zambrowicz, B. P., A. Imamoto, et al. (1997). "Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(8): 3789-94.
- Zarranz, J. J. neurología, Elsevier España.
- Zhang, H. T., J. Fan, et al. (2009). "Human Wharton's jelly cells can be induced to differentiate into growth factor-secreting oligodendrocyte progenitor-like cells." Differentiation **79**(1): 15-20.
- Zhang, H. T., J. Fan, et al. (2010). "Human Wharton's jelly cells can be induced to differentiate into growth factor-secreting oligodendrocyte progenitor-like cells." Differentiation **79**(1): 15-20.
- Zhao, L. R., W. M. Duan, et al. (2002). "Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats." Exp Neurol **174**(1): 11-20.
- Zhao, Y., Z. Jiang, et al. (2010). "Reversal of type 1 diabetes via islet beta cell regeneration following immune modulation by cord blood-derived multipotent stem cells." BMC Med **10**: 3.
- Zhong, R. K., C. M. Astle, et al. (1996). "Distinct developmental patterns of short-term and long-term functioning lymphoid and myeloid precursors defined by competitive limiting dilution analysis in vivo." J Immunol **157**(1): 138-45.
- Zhou, P., L. Wirthlin, et al. (2009). "Contribution of human hematopoietic stem cells to liver repair." Semin Immunopathol **31**(3): 411-9.
- Zuk, P. A., M. Zhu, et al. (2002). "Human adipose tissue is a source of multipotent stem

cells." Mol Biol Cell **13**(12): 4279-95.

APENDICE

1 Soluciones

Solución de lisis de eritrocitos para médula ósea: compuesta por 140 mM de cloruro de amonio en Tris-base 17mM. Hay que ajustar su pH a 7,4. Se puede guardar en alícuotas a -20 °C.

Solución de lisis de eritrocitos para sangre periférica: para preparar 1 litro de solución, hay que disolver 8,3 g de NH₄Cl, 1 g de KHCO₃ y 3,72 g de EDTA en agua destilada. Se ajusta el pH a 7,4 y se enrasa hasta 1 litro. Es conveniente prepararlo nuevo cada vez.

Solución de Nissl: se disuelven 0.1 g de violeta de cresilo en 100 ml de agua destilada, más 0,25ml de ácido acético glacial. Disolver a 60 °C hasta la disolución del violeta de cresilo. Guardar en oscuridad y filtrar antes de usar.

Solución de sorter: disolver BSA al 2% en PBS y filtrar. Preparar en el momento de su uso, se contamina con facilidad.

Tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4 (25 °C, PB): se prepara diluyendo 1:1 una solución de tampón fosfato 0,2 M en H₂O destilada.

Tampón fosfato 0,2 M, pH 7,4 (25 °C): se obtiene mezclando soluciones 0,2 M de Na₂HPO₄ y NaH₂PO₄ hasta alcanzar el pH deseado. Se conserva a temperatura ambiente.

Tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4 (25 °C, PBS): se han de mezclar en agua destilada: 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na₂HPO₄ y 0,21 g de KH₂PO₄. Se ajusta el pH a 7,4 con HCl y se enrasa a 1 litro.

Tampón Tris-HCl 0,2 M, pH 7,6 a 25° C: se obtiene mezclando 24,24 g de Trizma-HCl y 5,56 g de Trizma-base en 1 litro de H₂O.

Tampón Tris-Borato-EDTA (TBE): para preparar 1 litro 10x, hay que disolver 108 g de Tris base (890 mM) y 55 g de ácido bórico (890 mM) en 40 ml de EDTA 0,5 M pH 8,0 (20 mM). Se conserva a temperatura ambiente. Para su uso (1x), se disuelve en la cantidad correspondiente de H₂O DEPC.

Tampón X-Gal: compuesto por 100 µl de una solución de MgCl₂ 1 M, 2,5 ml de una solución K3, 2,5 ml de una solución K4 y 0,6 ml de una solución de X-Gal. El

volumen se ajusta a 50 ml con PB 0,1 M. Las soluciones anteriores se tienen preparadas con anterioridad y son estables durante varios meses. La solución de MgCl₂ 1 M se prepara disolviendo 0,9521 g de MgCl₂ en 10 ml de H₂O destilada. La solución K₄ (0,1 M) se prepara disolviendo 2,112 g de ferrocianuro potásico en 50 ml de PB 0,1 M. La solución K₃ (0,1 M) se prepara disolviendo 1,646 g de ferricianuro potásico en 50 ml de PB 0,1 M. Estas tres soluciones se almacenan a TA y en oscuridad. La solución de X-Gal (40 mg/ml) se prepara disolviendo 40 mg de X-Gal en 1 ml de dimetilformamida, y se guarda en oscuridad a -20 °C.

2 Anticuerpos

	Origen	Antígeno	Dilución de uso	Referencia	Casa comercial
Anticuerpos Primarios	Conejo	CR	1:200	7699/3H	Swant, Switzerland
	Conejo	GABA	1:1000	A2052	Sigma-Aldrich, USA
	Conejo	GFAP	1:500	AB1540	Chemicon, Temecula, USA
	Ratón	GFAP	1:500	MAB3402	Chemicon, Temecula, USA
	Conejo	GFP	1:200	Ab290	Abcam Ltd., Cambridge, UK
	Conejo	Iba1	1:200	019-19741	Wako Ltd., Japan
	Conejo	NK1	1:1000	AB5060	Chemicon, Temecula, USA
	Conejo	NPY	1:300	22940	ImmunoStar, Hudson, USA
	Ratón	PV	1:4000	P3088	Sigma-Aldrich, USA
	Conejo	SOM	1:2000	AB1752	Chemicon, Temecula, USA
	Conejo	B220/Cy5	1:500	AB25526	Abcam Ltd., Cambridge, UK
	Cabra	IgM-HRP	1:250	AB5930	Abcam Ltd., Cambridge, UK
	Rata	MAC1/Cy5	1:500	AB25268	Abcam Ltd., Cambridge, UK
	Rata	GR1-HRP	1:300	AB53457	Abcam Ltd., Cambridge, UK
	Rata	CD4-PE/Cy7	1:300	AB41467	Abcam Ltd., Cambridge, UK
	Rata	CD8-Cy5	1:300	AB39850	Abcam Ltd., Cambridge, UK
	Conejo	Desmina	1:300	Sc-14026	Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA
	Ratón	Vimentina	1:200	AB8978	Abcam Ltd., Cambridge, UK
	Ratón	NG2	1:300	N8912	Sigma-aldrich, USA
	Conejo	CD45	1:300	Ab15508	Abcam Ltd., Cambridge, UK
	Pollo	β-galactidase	1:500	Ab9361	Abcam Ltd., Cambridge, UK

Tabla 13.- Lista de anticuerpos utilizados. Se detallan su origen, su nombre comercial o antígeno que reconoce, la dilución a la que se ha usado, su referencia del catálogo y su casa comercial.

Anticuerpos Secundarios	Origen	Antígeno	Dilución de uso	Referencia	Casa comercial
	Cabra	Cy3-anti ratón	1:400	111-165- 144	Jackson ImmunoResearch, USA
	Cabra	Cy3-anti conejo	1:400	111-165- 144	Jackson ImmunoResearch, USA
	Cabra	Biotinilado- anti ratón	1:400	115-065- 146	Jackson ImmunoResearch, USA
	Cabra	Biotinilado- anti conejo	1:400	211-065- 109	Jackson ImmunoResearch, USA
	Cabra	Cy5-anti rata	1:400	112-175- 167	Jackson ImmunoResearch, USA
	Burro	Cy5-anti pollo	1:400	703-175- 155	Jackson ImmunoResearch, USA

Tabla 14.- Lista de anticuerpos utilizados. Se detallan su origen, su nombre comercial o antígeno que reconoce, la dilución a la que se ha usado, su referencia del catálogo y su casa comercial.