



VNiVERSiDAD D SALAMANCA

TRASPLANTE DE MÉDULA ÓSEA E IDENTIFICACIÓN DE
SUS DERIVADOS NEURALES EN UN MODELO ANIMAL
CON NEURODEGENERACIÓN SELECTIVA, EL RATÓN
MUTANTE *PCD*. APROXIMACIÓN A LA TERAPIA
REGENERATIVA CON CÉLULAS MADRE ADULTAS

-TESIS DOCTORAL-

JAVIER SÁNCHEZ RECIO

Salamanca, octubre 2008



VNIVERSIDAD D SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y PATOLOGÍA
INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN



TRASPLANTE DE MÉDULA ÓSEA E IDENTIFICACIÓN DE SUS DERIVADOS NEURALES EN UN MODELO ANIMAL CON NEURODEGENERACIÓN SELECTIVA, EL RATÓN MUTANTE *PCD*. APROXIMACIÓN A LA TERAPIA REGENERATIVA CON CÉLULAS MADRE ADULTAS

Memoria presentada por *Javier Sánchez Recio* para optar al
grado de Doctor Europeo por la Universidad de Salamanca

Directores:

Prof. Dr. D. José Ramón Alonso Peña

Prof. Dr. D. Eduardo Weruaga Prieto

Octubre 2008



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y PATOLOGÍA
INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN**

**TRASPLANTE DE MÉDULA ÓSEA E IDENTIFICACIÓN DE
SUS DERIVADOS NEURALES EN UN MODELO ANIMAL
CON NEURODEGENERACIÓN SELECTIVA, EL RATÓN
MUTANTE *PCD*. APROXIMACIÓN A LA TERAPIA
REGENERATIVA CON CÉLULAS MADRE ADULTAS**

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'J. Sánchez Recio', with a long horizontal stroke extending to the right.

Javier Sánchez Recio

Octubre 2008



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y PATOLOGÍA
INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN

Campus Miguel de Unamuno. Avda. Alfonso X El Sabio 1
E-37007 Salamanca (España/Spain)
Tel: +34 923 294500 ext. 1854. Fax: +34 923 294549.

José Ramón Alonso Peña, Catedrático de Biología Celular, y Eduardo Weruaga Prieto, Profesor Titular de Biología Celular

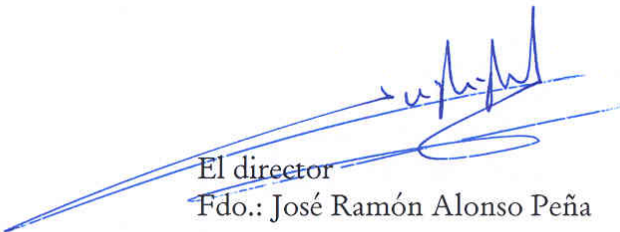
HACEN CONSTAR:

QUE el presente trabajo titulado “*Trasplante de médula ósea e identificación de sus derivados neurales en un modelo animal con neurodegeneración selectiva, el ratón mutante PCD. Una aproximación a la terapia regenerativa con células madre adultas*”, ha sido realizado por el licenciado en Biología D. Javier Sánchez Recio en el departamento de Biología Celular y Patología de la Universidad de Salamanca y en el Instituto de Neurociencias de Castilla y León.


QUE ha sido desarrollado bajo nuestra dirección y dentro del programa de doctorado *Neurociencias* de nuestra universidad.

QUE, en nuestra opinión, reúne todos los requisitos científicos y formales para ser defendido como Tesis Doctoral y así optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Para que así conste, lo firmamos en Salamanca, a doce de agosto de dos mil ocho.



El director
Fdo.: José Ramón Alonso Peña



El director
Fdo.: Eduardo Weruaga Prieto



A mis Padres

A Chus

*La utopía es el principio
de todo progreso
y el diseño de un futuro mejor.*

Anatole France (1844-1924)

AGRADECIMIENTOS

Durante la realización de esta Tesis Doctoral he colaborado, de una u otra manera, con numerosas personas de orígenes muy diversos. Independientemente del resultado científico producido, ha habido, en todos los casos, un denominador común que merece la pena ser destacado: además de trabajar con buenos investigadores, por encima de todo, he tenido la suerte de conocer a grandes personas y, además, de hacer mejores amigos. Así pues, quisiera aprovechar estas líneas para dar las gracias a todos aquellos que de una u otra manera han pasado por mi vida en estos últimos años.

En primer lugar me gustaría agradecer la inestimable labor de mis dos directores, el *Dr. José Ramón Alonso Peña* y el *Dr. Eduardo Weruaga Prieto*, sin cuyo apoyo y dirección este trabajo no habría sido posible. Gracias, *JR*, por sacar tiempo de donde no existe, y por haber confiado en mí desde el primer momento. Gracias, *Eduardo*, por todo el esfuerzo dedicado, por tus múltiples consejos y por tus oportunas correcciones. A los dos, *GRACIAS*.

A todos los *miembros del Departamento de Biología Celular y Patología* de la Universidad de Salamanca y *del Instituto de Neurociencias de Castilla y León*, con quienes he compartido “hábitat” durante estos años, y que han hecho más sencilla y agradable mi “supervivencia”. En primer lugar a sus dos directores, el *Dr. José Aijón Noguera* y el *Dr. Miguel Ángel Merchán Cifuentes*, por su ejemplar labor de dirección durante estos años. En segundo lugar, pero no menos importante, a todos aquellos profesores que han contribuido a mi formación predoctoral y que siempre han tenido un momento para ayudarme y aconsejarme en todo aquello que he necesitado; el *Dr. Juan Lara Prada*, el *Dr. Jesús M.^a García Briñón*, la *Dr.^a Rosario Arévalo Arévalo*, la *Dr.^a Almudena Velasco Arranz*, el *Dr. Ángel Porteros Herrero*, la *Dr.^a M.^a Isabel Cuadrado Rodríguez* y la *Dr.^a Carmela Gómez Rodríguez*. Asimismo, me gustaría agradecer la ayuda recibida, en numerosas ocasiones, de *D.^a María Teresa Sánchez Montero* y del *Dr. Manuel Javier Herrero Turrión*, así como de todos los becarios con los que he trabajado, codo con codo, durante estos años. Especialmente de *Azucena*, de *David*, de *Fernando* y de *Jorge (Dr. Jorge Valero)*, quienes participaron activamente en la realización de este trabajo.

Al *Dr. Manuel Álvarez Dolado*, quien ha llegado a ser, en alguna ocasión, como mi tercer director; y a todos los *miembros de su laboratorio*, quienes me hicieron sentir entre ellos como uno más. Especialmente a *Marina*, quien, junto con *Manuel*, han sido claves en la consecución de algunos de los objetivos de esta Tesis Doctoral.

Al *Dr. José Luis Rodríguez Fresnadillo*, Jefe del Servicio de Radioterapia; al *Dr. Manuel Fernández Bordes*, Jefe del Servicio de Radiofísica y Protección Radiológica, y a *D. Enrique de Sena Espinel*, especialista en Radiofísica, todos ellos del Hospital Universitario de Salamanca, quienes me permitieron la utilización de sus instalaciones durante la realización de gran parte de este trabajo.

Al *Dr. Ignacio Sánchez-Abarca Bernal*, investigador del Servicio de Cultivos y Terapia Celular de la Unidad de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca, que me

ayudó con el establecimiento de la dosis de radiación y me proporcionó en todo momento aquello que necesité: materiales específicos de laboratorio y, sobre todo, buenos consejos.

Al *Dr. Rogelio González Sarmiento*, director del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca, y a *todo su equipo*, quienes me ayudaron en la realización de los cultivos de bacterias y me permitieron la utilización de sus instalaciones siempre que lo necesité.

A todos los *miembros del Departamento de Anatomía e Histología Humanas* de la Universidad de Salamanca, quienes me permitieron la utilización de algunos de sus equipamientos durante gran parte de mi Tesis Doctoral.

A la *Dr.ª Eva Mezey*, del NIH (Bethesda, EE. UU.) quien amablemente nos proporcionó su sonda específica para el cromosoma Y de ratón, así como algunos de sus protocolos de hibridación *in situ* que me sirvieron como base para poner a punto los protocolos utilizados en este trabajo experimental.

A la *Dr.ª María José Fernández Gómez* y a la *Dr.ª Inmaculada Barrera Mellado* del Departamento de Estadística de la Universidad de Salamanca, por su ayuda y sus consejos sobre los análisis estadísticos realizados en este trabajo.

Del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca, me gustaría agradecer la colaboración de *D.ª Ruth Rodríguez Barrueco*, quien me ayudó con los procesos de cuantificación del ADN y, como no, la inestimable ayuda prestada por *D. Ángel Prieto Martín*, excelente profesional y mejor amigo, con los experimentos de citometría de flujo.

A *Trini* y a *Jesús*, por sus enriquecedoras correcciones, que me han permitido incrementar la calidad de esta Tesis Doctoral.

A mi *Familia* y *Amigos*, pilares fundamentales de mi vida, sin quienes yo, no sería quien soy. Especialmente a mis *Padres*, para quienes sólo puedo tener palabras de agradecimiento por su infinito cariño y su apoyo incondicional en todo momento. Porque todo lo que soy, y todo lo que pueda llegar a ser, se lo debo a ellos. Sois los mejores padres que habría podido desear. Os quiero.

Y como no, a *Chus*, por haber estado siempre ahí, siempre: disfrutando juntos de los buenos momentos y superando unidos los menos buenos. Gracias, por tirar de mí cuando más lo necesito. Me siento muy afortunado de poder compartir la vida contigo. *TQT*.

A todos los que formáis parte de mí,

GRACIAS

Este trabajo de Tesis Doctoral ha sido financiado por el Centro en Red de Medicina Regenerativa y Terapia Celular de Castilla y León, la Federación de Cajas de Ahorros de Castilla y León, el MEC (SAF 2006-05705), el MSC (PNSD SA002A07), la Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña Automovilística y la Junta de Castilla y León.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| ABREVIATURAS | 7 |
| INTRODUCCIÓN..... | 11 |
| <i>Las células madre</i> | 15 |
| ¿Qué son las células madre? | 15 |
| Tipos de células madre | 16 |
| <i>Células madre embrionarias</i> | 16 |
| <i>Células madre del cordón umbilical.....</i> | 16 |
| <i>Células madre adultas.....</i> | 17 |
| La importancia del nicho | 18 |
| Equilibrio autorrenovación-diferenciación | 19 |
| Plasticidad de las células madre adultas | 19 |
| Las células madre de la médula ósea | 20 |
| <i>Las células madre hematopoyéticas</i> | 21 |
| <i>Las células estromales de la médula ósea.....</i> | 22 |
| <i>Plasticidad de las células madre de la médula ósea</i> | 23 |
| De la médula ósea al músculo | 24 |
| De la médula ósea al corazón | 25 |
| De la médula ósea al hígado..... | 25 |
| De la médula ósea al cerebro | 26 |
| Las células de la médula ósea y las células de Purkinje del cerebelo | 27 |
| <i>Células de Purkinje poliploides.....</i> | 29 |
| <i>Efecto de un microambiente neurodegenerativo.....</i> | 30 |
| Las células de la médula ósea y el bulbo olfatorio | 31 |
| <i>Mecanismos de plasticidad de las células madre.....</i> | 33 |
| <i>Potencial terapéutico e implicaciones clínicas</i> | 35 |
| Posibles efectos secundarios de su utilización terapéutica | 37 |
| Perspectivas de futuro..... | 38 |
| <i>El ratón mutante PCD.....</i> | 39 |
| La mutación “ <i>Purkinje Cell Degeneration</i> ” | 39 |
| Efectos generales de la mutación <i>pcd</i> | 41 |
| Efectos de la mutación <i>pcd</i> en el cerebelo | 41 |
| <i>Organización del cerebelo.....</i> | 42 |
| <i>Neurodegeneración en el cerebelo</i> | 43 |
| Alteraciones citológicas de las células de Purkinje del ratón <i>PCD</i> | 45 |
| Alteraciones sinaptológicas de las células de Purkinje del ratón <i>PCD</i>..... | 46 |
| <i>Ensayos para subsanar la pérdida de las células de Purkinje del ratón mutante <i>PCD</i>.....</i> | 47 |
| Estudios de trasplantes | 47 |
| Estudios para prevenir la neurodegeneración..... | 48 |
| Efectos de la mutación <i>pcd</i> en el bulbo olfatorio principal..... | 48 |
| <i>Organización del bulbo olfatorio principal.....</i> | 49 |
| <i>Neurodegeneración en el bulbo olfatorio principal.....</i> | 50 |
| Alteraciones en las células mitrales del bulbo olfatorio principal..... | 52 |
| <i>Ensayos para subsanar la pérdida de las células mitrales del BO del ratón mutante <i>PCD</i></i> | 53 |
| Idoneidad del mutante <i>PCD</i> en estudios de neurodegeneración..... | 54 |
| JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS | 55 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 59 |
| <i>Animal de experimentación.....</i> | 63 |
| La colonia <i>PCD</i> | 63 |
| <i>Identificación de los animales.....</i> | 64 |
| Extracción de ADN..... | 65 |
| PCR..... | 65 |
| Electroforesis..... | 66 |

| | |
|---|-----------|
| La colonia PCD-R26R..... | 67 |
| <i>Identificación de los animales</i> | 69 |
| PCR | 69 |
| Electroforesis | 70 |
| La colonia CRE-GFP..... | 70 |
| <i>Identificación de los animales</i> | 72 |
| PCR | 72 |
| Electroforesis | 73 |
| La colonia PCD-(CRE-GFP)..... | 74 |
| Trasplante de médula ósea | 74 |
| Ablación de la médula ósea de los animales receptores..... | 75 |
| <i>Irradiación con una fuente de ⁶⁰Co</i> | 75 |
| <i>Irradiación con una fuente de ¹³⁷Cs</i> | 76 |
| Extracción de la médula ósea del donante..... | 76 |
| Trasplante..... | 77 |
| <i>Vía intraperitoneal</i> | 77 |
| <i>Vía intravenosa</i> | 78 |
| <i>Comprobación de la viabilidad de las células trasplantadas</i> | 78 |
| Seguimiento del trasplante | 79 |
| Cuidados especiales de las quimeras..... | 79 |
| Análisis de la incorporación de las células trasplantadas..... | 79 |
| <i>Citometría de flujo de sangre periférica</i> | 80 |
| Pruebas fisiológicas y de comportamiento..... | 81 |
| <i>Campo abierto</i> | 81 |
| <i>Velocidad media de desplazamiento</i> | 82 |
| Análisis neurohistológico | 83 |
| Obtención y preparación del tejido..... | 83 |
| <i>Sacrificio y disección</i> | 83 |
| <i>Seccionamiento del tejido</i> | 85 |
| Corte en criostato | 85 |
| Corte en microtomo de congelación | 85 |
| Detección de las células del donante en el receptor..... | 86 |
| <i>Donantes CRE-GFP</i> | 86 |
| Inmunofluorescencia indirecta | 87 |
| Controles de especificidad..... | 88 |
| Histoquímica del X-Gal | 89 |
| Controles de especificidad..... | 90 |
| <i>Donantes machos</i> | 91 |
| Hibridación <i>in situ</i> del cromosoma Y | 91 |
| Preparación de la sonda del cromosoma Y..... | 91 |
| <i>Amplificación en bacterias competentes</i> | 92 |
| <i>Purificación del vector amplificado</i> | 93 |
| <i>Extracción de la sonda mediante PCR</i> | 93 |
| <i>Purificación de la sonda a partir del producto de la PCR</i> | 95 |
| <i>Secuenciación de la sonda y comprobación de su especificidad</i> | 96 |
| <i>Transcripción de la sonda a ARN y marcado con digoxigenina</i> | 97 |
| Protocolo de hibridación..... | 98 |
| <i>Visualización de la ribsonda hibridada</i> | 100 |
| <i>Tratamiento con negro Sudán</i> | 101 |
| <i>Controles de especificidad</i> | 101 |
| Caracterización de las células del donante en el hospedador | 101 |
| Doble inmunofluorescencia-hibridación <i>in situ</i> | 102 |
| <i>Inhibición de las peroxidasas endógenas</i> | 102 |
| <i>Anticuerpo primario de la técnica inmunofluorescente</i> | 102 |
| <i>Anticuerpo secundario de la técnica inmunofluorescente</i> | 103 |
| <i>Complejo ABC</i> | 103 |
| <i>Amplificación con tiramidas</i> | 103 |

| | |
|--|-----|
| <i>Hibridación in situ del cromosoma Y</i> | 104 |
| <i>Revelado fluorescente</i> | 104 |
| Controles de especificidad | 105 |
| Detección de células poliploides en el bulbo olfatorio | 105 |
| <i>Hibridación in situ del cromosoma 1</i> | 106 |
| Análisis estadísticos | 107 |
| RESULTADOS | 109 |
| <i>Establecimiento de las colonias de animales</i> | 111 |
| La colonia PCD-R26R..... | 112 |
| La colonia CRE-GFP | 114 |
| La colonia PCD-(CRE-GFP) | 115 |
| <i>Establecimiento de la dosis de radiación</i> | 116 |
| Fuente de ¹³⁷ Cesio | 117 |
| <i>Análisis de la incorporación de las células del donante en el hospedador</i> | 119 |
| <i>Viabilidad de las células trasplantadas</i> | 122 |
| <i>Pruebas fisiológicas y de comportamiento</i> | 123 |
| Campo abierto | 123 |
| Velocidad media de desplazamiento | 127 |
| <i>Puesta a punto de sistemas de visualización de las células trasplantadas</i> | 129 |
| Células procedentes de donantes machos | 129 |
| <i>Puesta a punto de la doble inmunofluorescencia-hibridación in situ</i> | 131 |
| <i>Análisis de la llegada de células de la médula ósea al encéfalo de los animales receptores</i> | 134 |
| Llegada al cerebelo | 134 |
| Animales silvestres | 135 |
| Tipos celulares originados..... | 135 |
| Animales mutantes PCD | 138 |
| Tipos celulares originados en un ambiente con neurodegeneración..... | 140 |
| Efecto de una médula ósea “sana” en el cerebelo de los mutantes PCD..... | 142 |
| Llegada al bulbo olfatorio | 142 |
| Animales silvestres | 143 |
| Tipos celulares originados..... | 143 |
| Poliploidías..... | 146 |
| Animales mutantes PCD | 147 |
| Tipos celulares originados en un ambiente con neurodegeneración..... | 147 |
| Efecto de una médula ósea “sana” en el bulbo olfatorio de los mutantes PCD | 148 |
| DISCUSIÓN | 151 |
| <i>Las colonias de animales</i> | 153 |
| Ausencia de problemas de consanguinidad..... | 154 |
| Posibilidad de identificar el mecanismo de plasticidad | 155 |
| Nuevas posibilidades de futuro..... | 156 |
| <i>Ablación de la médula ósea mediante irradiación</i> | 158 |
| Establecimiento de la dosis letal mínima..... | 158 |
| Influencia de la radiación en el proceso de llegada de células de la médula ósea al encéfalo | 159 |
| <i>Selección de los animales donantes</i> | 161 |
| Donantes CRE-GFP | 161 |
| Donantes machos..... | 163 |
| <i>Incorporación de las células del donante en el hospedador</i> | 165 |

| | |
|--|------------|
| Pruebas fisiológicas y de comportamiento..... | 166 |
| Campo abierto..... | 167 |
| Velocidad media de desplazamiento..... | 169 |
| Llegada de las células de la médula ósea al encéfalo de los animales receptores.... | 169 |
| Formación de elementos gliales a partir de la médula ósea trasplantada..... | 170 |
| <i>Microglía</i> | 170 |
| <i>Astroglía</i> | 171 |
| Formación de neuronas a partir de la médula ósea trasplantada | 172 |
| <i>En el cerebelo</i> | 172 |
| Células de Purkinje poliploides..... | 173 |
| Efecto del ambiente degenerativo en el proceso | 173 |
| Efecto del trasplante de una médula ósea “sana” en el cerebelo de los ratones mutantes | |
| <i>PCD</i> | 174 |
| <i>En el bulbo olfatorio</i> | 175 |
| Células mitrales poliploides | 177 |
| Efecto del ambiente degenerativo en el proceso | 177 |
| Efecto del trasplante de una médula ósea “sana” en el bulbo olfatorio de los ratones | |
| mutantes <i>PCD</i> | 178 |
| <i>Otras regiones de interés</i> | 178 |
| CONCLUSIONES | 181 |
| ABSTRACT | 185 |
| INTRODUCTION..... | 189 |
| OBJECTIVES..... | 192 |
| MATERIALS AND METHODS | 192 |
| RESULTS | 197 |
| DISCUSSION | 205 |
| CONCLUSIONS | 211 |
| BIBLIOGRAFÍA | 213 |
| APÉNDICE..... | 245 |
| <i>Soluciones de uso común</i> | 247 |
| <i>Sueros inmunológicos</i> | 249 |
| Anticuerpos primarios..... | 249 |
| Anticuerpos secundarios..... | 250 |

ABREVIATURAS

- ABC:** complejo avidina-biotina-peroxidasa (del inglés *Avidin-Biotin-Complex*)
- ADN:** ácido desoxirribonucleico
- ARN:** ácido ribonucleico
- ARNm:** ácido ribonucleico mensajero
- ARNt:** ácido ribonucleico de transferencia
- BO:** bulbo olfatorio
- CB:** calbindina D-28k
- CCM:** capa de las células mitrales
- CCP:** capa de las células de Purkinje
- CG:** capa glomerular
- CGr:** capa de los granos
- CIPF:** Centro de Investigación Príncipe Felipe
- CM:** capa molecular
- CMA:** células madre adultas
- CME:** células madre embrionarias
- CMH:** células madre hematopoyéticas
- CMM:** células madre mesenquimales
- CMO:** células de la médula ósea
- CMR:** corriente migratoria rostral
- CNO:** capa del nervio olfatorio
- CPE:** capa plexiforme externa
- CPI:** capa plexiforme interna
- DAB:** 3,3'-diaminobencidina
- DAPI:** 4', 6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato
- DIG:** digoxigenina
- EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético (del inglés *Ethylene Diamine Tetracetic Acid*)
- ESM:** error estándar de la media
- FITC:** isotiocianato de fluoresceína (del inglés *Fluorescein Isothiocyanate*)
- GFP:** proteína verde fluorescente (del inglés *Green Fluorescent Protein*)
- GFAP:** proteína ácida fibrilar glial (del inglés *Glial Fibrillary Acidic Protein*)
- Gy:** Gray (unidad de radiación)
- H₂O_{DEPC}:** agua destilada tratada con dietilpirocarbonato (DEPC)
- IGF-I:** factor de crecimiento insulínico de tipo 1 (del inglés *Insulin-like Growth Factor-1*)
- IP:** ioduro de propidio

- LacZ:** gen reportero que codifica la enzima β -galactosidasa
- MAP2:** marcador de estirpe neuronal (del inglés *Microtubule Associated Protein 2*)
- MeV:** Megaelectronvoltio (unidad de energía)
- MP:** marcador de peso molecular
- NDS:** suero normal de burro (del inglés *Normal Donkey Serum*)
- NeuN:** marcador de estirpe neuronal (del inglés *Neuronal Nuclei*)
- NFH:** marcador de estirpe neuronal (del inglés *NeuroFilament Heavy chain*)
- NGS:** suero normal de cabra (del inglés *Normal Goat Serum*)
- Nna1:** proteína 1 nuclear del sistema nervioso inducida por axotomía (del inglés *Nervous system Nuclear protein induced by Axotomy*)
- NTS:** Tiosulfato Sódico (del inglés *Sodium Thiosulphate*)
- pb:** pares de bases
- PB:** tampón fosfato (del inglés *Phosphate Buffer*)
- PBS:** solución salina tamponada con fosfato (del inglés *Phosphate Buffered Saline*)
- PCD:** degeneración de las células de Purkinje (del inglés *Purkinje Cell Degeneration*)
- PCR:** reacción en cadena de la polimerasa (del inglés *Polymerase Chain Reaction*)
- Pm:** peso molecular
- RNAsas:** ribonucleasas
- rpm:** revoluciones por minuto
- SBPE:** sustancia blanca periependimaria
- SDS:** Dodecil Sulfato Sódico (del inglés *Sodium Dodecyl Sulphate*)
- SEA:** Servicio de Experimentación Animal (Universidad de Salamanca)
- SNC:** sistema nervioso central
- SSC:** tampón citrato sódico salino (del inglés *Sodium Chloride-Sodium Citrate*)
- SSR:** repetición de secuencias discretas (del inglés *Short Sequence Repeat*)
- TA:** temperatura ambiente
- TAE:** tampón Tris-ácido acético-EDTA
- TBE:** tampón Tris-Borato-EDTA
- TGF- β :** factor de crecimiento transformante β (del inglés *Transforming Growth Factor- β*)
- TSA:** amplificación de la señal mediante tiramidas (del inglés *Tyramide Signal Amplification*)
- Tuj1:** marcador neuronal β tubulina III

INTRODUCCIÓN

En los últimos años los medios de comunicación no especializados se han ido haciendo eco de los distintos avances científicos relacionados con las células madre, lo que ha permitido la difusión de numerosa información sobre este campo al público en general. Por desgracia, gran parte ha sido publicada de manera bastante confusa, en muchas ocasiones desvirtuada, sobre todo cuando se pronostican las perspectivas de aplicación clínica de las células madre. Es por ello por lo que las células madre han llegado a ser consideradas de una forma bastante imprudente como una fuente de recambios, de potencial ilimitado, de las distintas partes del cuerpo humano. Dejando a un lado su impacto mediático, las células madre constituyen una de las áreas más fascinantes de la Biología actual. No obstante, como en la mayoría de los campos de investigación científica en expansión, la investigación con células madre plantea nuevas cuestiones científicas y éticas conforme se van generando nuevos descubrimientos.

Uno de los avances más significativos e importantes de las últimas décadas en el campo de las células madre, y por extensión en el de la Neurociencia, tuvo lugar en el año 1962, cuando Joseph Altman sugirió la posibilidad de formación de nuevas neuronas en el encéfalo de mamíferos adultos (Altman, 1962). Este trabajo constituyó toda una revolución frente a las teorías previamente establecidas en las que se consideraba al cerebro adulto como una estructura sin capacidad de renovación estructural y con una plasticidad muy

limitada (Ramón y Cajal, 1914). La neurogénesis adulta, actualmente aceptada en todos los grandes grupos de vertebrados (García-Verdugo *et al.*, 2002), tiene lugar a partir de células madre situadas en regiones muy concretas del encéfalo (Altman, 1969; Eriksson *et al.*, 1998; Komuro *et al.*, 2001). Casi 40 años después de la aparición del trabajo de Altman (1962), se han publicado una serie de estudios que evidencian una nueva vía relacionada con la formación de neuronas en el encéfalo de animales adultos (Brazelton *et al.*, 2000; Mezey *et al.*, 2000; Álvarez-Dolado *et al.*, 2003; Weimann *et al.*, 2003a, b). En este caso, las células madre implicadas en el proceso se encuentran situadas fuera del sistema nervioso central (SNC), concretamente en la médula ósea. Así pues, a raíz de estos inesperados descubrimientos, ha surgido una nueva línea de investigación encaminada hacia la terapia celular y la medicina regenerativa, cuya base son las células madre de la médula ósea. Un mejor conocimiento de este tipo de células, así como de los diferentes procesos en los que se encuentran implicadas, podría permitir en un futuro el desarrollo de nuevas estrategias para su utilización en el tratamiento de enfermedades neurológicas humanas. El presente trabajo de Tesis Doctoral contribuirá a esta nueva línea de investigación mediante la puesta a punto de todos los procedimientos necesarios para poder afrontar con éxito el estudio de la llegada de células de la médula ósea al encéfalo de animales adultos con neurodegeneración posnatal selectiva.

Comenzaremos esta introducción describiendo qué son las células madre, enumerando sus diferentes tipos, haciendo especial hincapié en las células madre adultas, y más concretamente en las células madre de la médula ósea, objeto de este trabajo. A continuación, trataremos sobre la plasticidad celular. Finalizaremos este apartado de la introducción relacionado con las células madre resumiendo las principales implicaciones clínicas y terapéuticas de las células madre de la médula ósea. Posteriormente, haremos un resumen de las características del modelo experimental de neurodegeneración que vamos a utilizar, el ratón mutante *PCD* (del inglés *Purkinje Cell Degeneration*). Así, describiremos la mutación *pcd*^U, sus efectos generales y su importancia para este trabajo. Además, explicaremos más detenidamente los principales efectos de esta mutación en el cerebelo y en el bulbo olfatorio (BO), regiones en las que centraremos nuestro estudio. Concluiremos el apartado de introducción con la justificación y objetivos de esta Tesis Doctoral.

Las células madre

¿Qué son las células madre?

Una definición completa y sencilla es la realizada por Mimeault y Batra en 2006: “Las células madre son células indiferenciadas que presentan una capacidad de autorrenovación ilimitada y que pueden generar múltiples linajes celulares que contribuyen a la homeostasis de los tejidos mediante reemplazamiento de células o regeneración tisular tras un daño”. Así pues, una definición adecuada de célula madre tiene que hacer referencia, al menos, a dos propiedades fundamentales:

Autorrenovación: consiste en la habilidad para pasar por numerosos ciclos de división celular manteniendo su estado indiferenciado.

Potencialidad ilimitada: es la capacidad para diferenciarse en cualquier tipo de célula madura, de cualquier linaje celular. Así, considerando su potencial de diferenciación (Young y Black, 2004; Fortier, 2005), las células madre pueden ser clasificadas en:

Células madre totipotentes. Tienen un potencial de diferenciación máximo, es decir, son capaces de diferenciarse no sólo en cualquier célula de un organismo, sino también de tejidos extraembrionarios asociados con ese organismo. Las células madre totipotentes se producen tras la fusión de un óvulo y un espermatozoide. Las células producidas por las primeras divisiones tras la fecundación también son totipotentes. Estas células pueden, por tanto, diferenciarse en cualquier tipo celular tanto embrionario como extraembrionario.

Células madre pluripotentes. Son descendientes de células totipotentes, y pueden diferenciarse en células de cualquiera de las tres capas germinales (endodermo, mesodermo, ectodermo). Las células madre pluripotentes pueden dar lugar a cualquier tipo celular adulto o fetal. Sin embargo, por sí mismas no pueden desarrollar un feto o un animal adulto puesto que carecen del potencial para contribuir a la formación de tejidos extraembrionarios, como, por ejemplo, la placenta.

Células madre multipotentes. Son aquellas que sólo pueden producir células de su propia capa germinal (endodermo, mesodermo, ectodermo) de origen.

Células madre unipotentes. Sólo pueden dar lugar a un único tipo celular, pero presentan una capacidad de autorrenovación que las distingue del resto de células no consideradas como células madre.

En sentido estricto, según esta clasificación y considerando la definición anterior de célula madre, sólo podrían ser consideradas como tal las totipotentes y pluripotentes; sin embargo, en los últimos años se han demostrado propiedades inesperadas de las células madre multipotentes y unipotentes que permiten considerarlas como células madre, según detallaremos más adelante.

Tipos de células madre

Además de en función de su potencial de diferenciación, las células madre pueden ser clasificadas teniendo en cuenta su origen. De esta manera, se pueden considerar diferentes tipos de células madre a partir de embriones, de tejidos fetales, del cordón umbilical, así como de nichos específicos de diferentes órganos y tejidos de mamíferos adultos, tales como la médula ósea o el cerebro (Ortiz-González *et al.*, 2004; Li y Xie, 2005; Mimeault y Batra, 2006). A continuación resumiremos las principales características de las células madre embrionarias, de las células madre del cordón umbilical y de las células madre adultas.

Células madre embrionarias

Las células madre embrionarias (CME) son células madre pluripotentes derivadas de la masa celular interna del embrión en estadio de blastocisto. En los últimos años se han establecido varias líneas de CME de mamíferos, entre las que se incluyen líneas humanas (Mimeault y Batra, 2006; Trounson, 2006). Todas ellas son capaces tanto de autorrenovarse como de diferenciarse en cualquier tipo de célula madre fetal o adulta o en sus progenitores más diferenciados. Por lo tanto, no es extraño que se estén planteando terapias con CME para la reparación de tejidos tras un daño o una enfermedad. Sin embargo, debido al origen embrionario de estas células, su utilización en medicina regenerativa, así como la propia investigación básica, conllevan una enorme controversia. Puesto que la presente Tesis Doctoral trata sobre las células madre adultas de la médula ósea, y en ningún momento se han empleado CME, no abordaremos en esta introducción los problemas éticos de su utilización.

Células madre del cordón umbilical

Englobamos en este apartado a las células madre procedentes del cordón umbilical, tanto de su epitelio (Mizoguchi *et al.*, 2004; Sanmano *et al.*, 2005) como del tejido conectivo que lo compone, conocido como gelatina de Wharton (Can y Karahuseyinoglu, 2007), y de la sangre que contiene (Mimeault y Batra, 2006). Todos ellos constituyen una fuente de

células madre que pueden ser usadas para la obtención de diversos tipos celulares diferenciados (Cohen y Nagler, 2004; Sanmano *et al.*, 2005; Mimeault y Batra, 2006). Cabe destacar que en el caso de las células madre, tanto de la sangre del cordón umbilical (Ishikawa *et al.*, 2003; Ortiz-González *et al.*, 2004) como de la gelatina de Wharton (Conconi *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2006; Can y Karahuseyinoglu, 2007; Karahuseyinoglu *et al.*, 2007), ha sido posible diferenciarlas en diversos progenitores de células funcionales entre las que se incluyen células hematopoyéticas, progenitores de células neurales, hepatocitos, células pancreáticas y endoteliales, bajo condiciones específicas tanto *in vivo* como *in vitro*. Además, en el caso de la sangre del cordón umbilical humano existe una subpoblación de células madre mesenquimales más primitiva que las de la médula ósea adulta (Erices *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2006). Estas células madre mesenquimales de la sangre del cordón umbilical pueden, asimismo, diferenciarse *in vitro* en múltiples linajes celulares bajo condiciones específicas (Mimeault y Batra, 2006). De este modo, la diferenciación de las células madre de la sangre del cordón umbilical en progenitores de células madre adultas específicas de tejido se presenta como una posible estrategia alternativa para terapias celulares (Mimeault y Batra, 2006), que, aunque exentas de controversia ética, sí presentan problemas prácticos.

Células madre adultas

Las células madre adultas (CMA) muestran generalmente un potencial de diferenciación más restringido que las CME y que las células madre del cordón umbilical, y dan lugar a un número más limitado de progenitores celulares diferentes. Numerosos estudios han mostrado la existencia de poblaciones de CMA y células acompañantes en áreas específicas denominadas nichos, situados en la mayoría de órganos y tejidos de mamíferos adultos, entre los que se incluyen: el tracto gastrointestinal (Brittan y Wright, 2002; Modlin *et al.*, 2003), el cerebro (Doetsch, 2003), los ojos (Sun y Lavker, 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 y Trumpp, 2006). De hecho, las CMA parecen originarse durante la ontogenia y mantenerse en nichos especializados de órganos y tejidos donde podrían permanecer quiescentes durante periodos de tiempo de diversa duración. Las CMA y sus células acompañantes parecen interactuar recíprocamente mediante diferentes tipos de conexiones intercelulares, tales como uniones *gap* o uniones adherentes que permiten el mantenimiento de la integridad del nicho (Fuchs *et al.*, 2004; Hirao *et al.*, 2004). Así pues, las CMA latentes parecen

ser activadas durante el reabastecimiento celular para repoblar compartimentos tisulares bajo condiciones tanto fisiológicas como patológicas (Li y Xie, 2005; Mimeault y Batra, 2006). De todos los tipos de CMA mencionados anteriormente, desarrollaremos en mayor profundidad las CMA de la médula ósea, ya que son las utilizadas en este trabajo.

La importancia del nicho

Como hemos apuntado anteriormente, el nicho de una célula madre es un microambiente que permite el mantenimiento indiferenciado de las células madre en la mayoría de órganos y tejidos de mamíferos adultos. Sin embargo, un nicho es mucho más que un simple emplazamiento anatómico, puesto que, como se ha puesto de manifiesto en estudios previos (Fuchs *et al.*, 2004), la interacción física directa entre las células madre y sus vecinas es crítica en el mantenimiento del potencial y las propiedades de las primeras. Un ejemplo lo tenemos precisamente en la médula ósea, donde las células madre hematopoyéticas (CMH) se localizan a lo largo de la superficie más interna del hueso, que se encuentra parcialmente recubierta de osteoblastos. A medida que las CMH van madurando, van perdiendo sus contactos con las células vecinas del estroma, haciéndose cada vez más proliferativas. Al parecer, la capacidad de las CMH de mantenerse en un ciclo celular lento depende de su capacidad para adherirse directamente a los osteoblastos a través de uniones adherentes mediadas por N-cadherina (Zhang *et al.*, 2003) y de su adhesión a la lámina basal mediante integrinas (Fuchs *et al.*, 2004). Tanto integrinas como uniones adherentes juegan un papel crítico en el mantenimiento de la localización, la adherencia y el estatus proliferativo de estas células (Watt y Hogan, 2000).

La capacidad del nicho para retener a sus células madre parece estar también relacionada con el proceso de reclutamiento de células madre, un proceso conocido como “homing” (Whetton y Graham, 1999; Fuchs *et al.*, 2004). Así pues, los nichos pueden comportarse como puntos hacia los que son atraídas las células madre. De este modo, las CMH trasplantadas desde un animal donante a otro animal al que se le ha eliminado la médula ósea son capaces de encontrar su destino en el animal receptor, en el que reconstituyen la médula ósea.

La regulación de la autorrenovación de las células madre es una característica esencial de un nicho; el equilibrio entre autorrenovación y diferenciación de sus células madre llega a ser crítico en el mantenimiento de un número adecuado de células madre en el interior del nicho y en satisfacer la demanda de células diferenciadas en sus tejidos adyacentes (Fuchs *et al.*, 2004).

Equilibrio autorrenovación-diferenciación

La idea más aceptada para explicar el equilibrio entre autorrenovación y diferenciación de las CMA se basa en la posibilidad de que haya divisiones simétricas y asimétricas. Durante la autorrenovación, la expansión de cada célula madre parece implicar su división simétrica en dos células madre hijas idénticas. Por el contrario, la división asimétrica de las células madre durante la diferenciación conlleva que cada célula madre en división produzca una célula madre hija y una célula hija en un paso intermedio de su desarrollo. Este segundo tipo de célula, generada durante una división asimétrica, se caracteriza generalmente por sus propiedades migratorias y por una elevada capacidad de proliferación (Mimeault y Batra, 2006). Además, estas células hijas podrían dar lugar a otros progenitores celulares intermedios y, en último término, a células más diferenciadas, constituyendo órganos y tejidos en la misma región en donde se han originado o bien en otras regiones más distantes. De hecho, la migración de estas células a regiones más alejadas, así como los cambios en su microambiente local durante la amplificación, podrían dar lugar a su diferenciación o transdiferenciación en progenitores de diferentes linajes celulares. Muchos trabajos previos han mostrado cómo las CMA, y más particularmente las de la médula ósea, pueden redistribuirse bajo ciertas condiciones fisiológicas o patológicas por otros tejidos distantes a través del sistema circulatorio (Kopen *et al.*, 1999; Blau *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2002; de Vries *et al.*, 2004). En realidad, el nuevo microambiente al que se ven expuestas, que es predominante en el nuevo tejido, podría contribuir a su determinación y diferenciación en progenitores celulares específicos de ese tejido.

Plasticidad de las células madre adultas

Tradicionalmente se ha considerado que las CMA están restringidas en su potencial de diferenciación y regeneración a los tejidos en los que residen, jugando un papel clave en la continua homeostasis de estos tejidos. A modo de ejemplo, cabe destacar las células madre hematopoyéticas –que pueden reconstituir la sangre tras una irradiación letal– las células madre hepáticas que proliferan después de una hepatectomía parcial o los precursores de queratinocitos que participan en el proceso de cicatrización de una herida (Blau *et al.*, 2001). Sin embargo, en los últimos años se está poniendo en duda esta visión tan restringida del potencial de las CMA. Ello se debe a trabajos que han mostrado cómo células derivadas de la médula ósea son capaces no sólo de reconstituir la sangre, sino también de contribuir al músculo (Bittner *et al.*, 1999; Gussoni *et al.*, 1999), al cerebro (Brazelton *et al.*, 2000; Mezey *et al.*, 2000), al hígado (Petersen *et al.*, 1999; Theise *et al.*, 2000a, b), al corazón

(Orlic *et al.*, 2001) y al endotelio vascular (Jackson *et al.*, 2001). Algunos estudios evidencian incluso el movimiento de células madre en sentido inverso, sugiriendo que células musculares (Jackson *et al.*, 1999) o derivadas del SNC (Bjornson *et al.*, 1999) podrían dar lugar a sangre. Aunque muchos de estos cambios en el destino celular han sido observados después de un daño tisular, en algunos casos estas transiciones entre distintos compartimentos celulares han sido demostradas en ausencia de lesión aparente. El descubrimiento de que las CMA puedan inicialmente residir en un tejido y luego contribuir a otro sugiere un grado de plasticidad de las células madre previamente desconocido. De hecho, actualmente se está empezando a considerar que los cambios en el destino celular son una propiedad natural de las células madre, que podría estar implicada en la reparación fisiológica de los tejidos dañados a lo largo de la vida. Aunque la frecuencia en cada caso es todavía relativamente baja, los numerosos, recientes e inesperados descubrimientos sugieren que la biología de las células madre podría ser más compleja de lo que originariamente se pronosticó (Blau *et al.*, 2001).

Las células madre de la médula ósea

La médula ósea es una región compleja y bien organizada, localizada en las cavidades cilíndricas de los huesos largos y en los intersticios de las porciones esponjosas de la mayoría de los huesos (Fawcett, 1987). Su función principal es la de promover la hematopoyesis. Está constituida por varios tipos celulares, entre los que se incluyen los elementos básicos del estroma y del sistema hematopoyético. Contiene **células madre hematopoyéticas** y **células estromales** que colaboran recíprocamente en los diferentes procesos de formación de todos los linajes celulares, tanto sanguíneos como de la propia médula ósea (Heissig *et al.*, 2005; Wilson y Trumpp, 2006). Las células madre hematopoyéticas son las responsables de la formación de todos los tipos de células sanguíneas del organismo y fueron identificadas como células madre hace más de 40 años (Becker *et al.*, 1963). Las células estromales de la médula ósea fueron descritas como una población celular altamente heterogénea, compuesta por múltiples tipos celulares con diferentes potenciales de proliferación y diferenciación, y que generaban hueso, cartílago, grasa, tejido conjuntivo fibroso y la red reticular que sustentaba la formación de células sanguíneas (Friedenstein *et al.*, 1966; Owen, 1988). Entre los diferentes tipos de células estromales, destaca la presencia de las células madre mesenquimales (CMM). Hay que resaltar que, pese a no ser exclusivas de la médula ósea, las CMM han sido clásicamente obtenidas de ésta, por lo que muchos trabajos hacen referencia a ellas como “células estromales”. Sin embargo, es importante reseñar que

ambos términos no son equivalentes y que hacen referencia a dos entidades reconocidas cada vez más como diferentes. A diferencia de las células estromales, descritas anteriormente, las CMM de la médula ósea representan una subpoblación más homogénea de células con características y marcadores de superficie celular específicos de las células madre. Puesto que en el presente trabajo no hemos realizado una purificación de los distintos componentes celulares de la médula ósea, nos referiremos a las células madre procedentes de ella como “células madre de la médula ósea”. Pese a ello, hemos creído oportuno dedicar una parte de esta introducción para describir los dos tipos principales de células encontradas en la médula ósea.

Las células madre hematopoyéticas

El elevado potencial regenerativo de las células sanguíneas tras una pérdida grave de sangre, así como la continua producción y renovación de linfocitos, son poderosos indicadores del potencial regenerativo de las células madre hematopoyéticas (CMH). En 1867, el patólogo alemán Julius Cohnheim fue el primero en describir que la médula ósea daba lugar a células circulantes, entre las que se incluían fibroblastos implicados en procesos inflamatorios y de cicatrización (ver Tögel y Westenfelder, 2007). Sin embargo, no es hasta 1963 cuando se acepta la clonogenicidad de los linajes de células sanguíneas y el concepto de célula madre hematopoyética (Becker *et al.*, 1963; Siminovitch *et al.*, 1963). Las CMH son células indiferenciadas capaces de autorrenovarse y de diferenciarse paso a paso en células sanguíneas completamente especializadas como, por ejemplo, eritrocitos, trombocitos o leucocitos. A pesar del *corpus documental* que se ha ido generando acerca de la identidad de estas células, su completa identificación es todavía objeto de debate, y aún no se ha conseguido caracterizar un marcador único que permita identificar con seguridad este tipo de célula (Orlic y Bodine, 1994; Tögel y Westenfelder, 2007). No obstante, su capacidad de autorrenovación y su potencialidad quedaron puestas de manifiesto sin ningún tipo de duda tras demostrarse cómo una única CMH era capaz de implantarse y regenerar tanto la línea sanguínea mieloide como la linfoide de un animal previamente irradiado (Smith *et al.*, 1991).

Las CMH son las células madre mejor 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. Con todo, a finales de la década de los 90, varios laboratorios descubrieron propiedades sorprendentes y previamente desconocidas de las CMH que cuestionaban los dogmas aceptados durante mucho tiempo relativos a la irreversibilidad de la diferenciación y al mante-

nimiento del compromiso del linaje celular (Raff, 2003). Algunos de estos grupos demostraron que las células derivadas de la médula ósea no estaban sólo comprometidas a su linaje natural, sino que también eran capaces de diferenciarse en hepatocitos o células musculares (Ferrari *et al.*, 1998; Gussoni *et al.*, 1999; Petersen *et al.*, 1999). Puesto que en estos experimentos se emplearon poblaciones de médula ósea sin fraccionar, la célula responsable de estos inesperados resultados no pudo ser identificada hasta que finalmente se pudo demostrar que CMH altamente purificadas eran capaces de diferenciarse en células constituyentes de la mayoría de los tejidos tras su trasplante (Krause *et al.*, 2001). No obstante, estos resultados no han sido aceptados inequívocamente, pues podrían ser debidos a otros mecanismos distintos de la plasticidad celular o de la transdiferenciación. Se han planteado explicaciones alternativas para esta supuesta plasticidad entre las que se incluyen la fusión celular (Terada *et al.*, 2002; Ying *et al.*, 2002), los problemas metodológicos (Raff, 2003) y la restricción a modelos patológicos (Tögel y Westenfelder, 2007). Sin embargo, además de la diferenciación, hay otros mecanismos potenciales de acción de las CMH en tejidos dañados. Entre estos mecanismos destacan: a) la secreción de diversas quimioquinas y citoquinas, que estimulan la regeneración inhibiendo la apoptosis, suprimiendo reacciones inmunes y aumentando la angiogénesis; b) el incremento de la proliferación de células madre endógenas del tejido, y c) el rescate celular mediante fusión celular o, incluso, transferencia mitocondrial (Prockop y Olson, 2007; Spees *et al.*, 2006).

Las células estromales de la médula ósea

El estroma de la médula ósea es una estructura compleja altamente vascularizada que contiene células estromales y elementos de la matriz extracelular que mantienen la hematopoyesis (Neiva *et al.*, 2005). Entre las células estromales de la médula ósea destaca la presencia de células madre, descubiertas gracias a un trabajo revolucionario llevado a cabo en los años 70 por Friedenstein y colaboradores (1970, 1974a, b). En este estudio se caracterizaron las células de tipo fibroblasto que formaban colonias y que se habían adherido a la placa de cultivo tras la siembra de médula ósea intacta. Estas células de crecimiento rápido, que podían ser estimuladas mediante cambios en las condiciones del medio o trasplantándolas en animales, se diferenciaban en osteocitos, condrocitos y adipocitos. Este trabajo ha sido corroborado por numerosos grupos, y estas células han sido denominadas de muy diversas formas, como, por ejemplo, unidades formadoras de colonias de fibroblastos, células madre mesenquimales o células del estroma medular (Tögel y Westenfelder, 2007). Debido a su multipotencialidad, uno de los términos más aceptados en la actualidad es el de

“células estromales mesenquimáticas multipotentes” (Dominici *et al.*, 2006). Estas células se caracterizan por sus propiedades de adhesión a la materia plástica; la expresión de marcadores de superficie CD73, CD90, CD105; la ausencia de CD34, CD45, HLADR, y la diferenciación en adipocitos, osteocitos y condrocitos bajo condiciones específicas de cultivo. Algunos trabajos recientes (Grove *et al.*, 2004; Mimeault y Batra, 2006) las subdividen en: células progenitoras del mesoderma primitivo, células progenitoras multipotentes adultas y células madre mesenquimales. No obstante, los tres tipos pueden diferenciarse en los diferentes tipos celulares que participan activamente en la formación de moléculas de la matriz extracelular calcificada (Reyes *et al.*, 2001). Además, también podrían diferenciarse en otros tipos celulares de distintos linajes bajo condiciones específicas de cultivo (Pittenger *et al.*, 1999; Sánchez-Ramos *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2002).

Mientras que su capacidad para dar lugar a tejidos mesenquimáticos es inherente, muchos grupos de investigación han descrito también su inesperada diferenciación en cardiomiocitos (Pittenger y Martin, 2004), células neurales (Cho *et al.*, 2005) y pneumocitos (Rojas *et al.*, 2005). Aunque algunos de estos resultados fueron obtenidos *in vitro* y, por tanto, están sujetos a críticas de tipo metodológico (Chen *et al.*, 2006), se ha demostrado que estas células llegan a formar parte, en mayor o en menor medida, de todos los órganos, tras su inyección sistémica (Devine *et al.*, 2003; Anjos-Afonso *et al.*, 2004).

Por último, las células estromales mesenquimáticas multipotentes son fáciles de mantener y de expandir *in vitro*, y pueden ser alteradas genéticamente con vectores virales, lo que las convierte en un posible vehículo para la terapia génica celular (Caplan, 2000).

Plasticidad de las células madre de la médula ósea

Como hemos venido introduciendo hasta este punto, en la última década se han realizado una serie de trabajos que ponen de manifiesto la capacidad de las células madre de la médula ósea para dar lugar a células propias de otros órganos, entre los que se incluyen: los pulmones, el corazón, el músculo, el intestino, los riñones, la retina, el hígado, el páncreas, el bazo, la piel y el cerebro (ver revisión de Grove *et al.*, 2004). En estos estudios, las células madre de la médula ósea pueden tener un origen hematopoyético o estromal. Es importante señalar que, puesto que no se ha llegado a determinar con exactitud si las células implicadas en este proceso son directamente las células madre de la médula ósea o células originadas a partir de éstas, de aquí en adelante nos referiremos a ellas como células de la médula ósea (CMO).

A continuación, presentaremos brevemente algunos de estos estudios en los que se muestran claras evidencias de este proceso, hasta hace poco tiempo inimaginable. No obstante, puesto que la sangre tiene acceso a todos los tejidos corporales, estos descubrimientos podrían resultar menos sorprendentes de lo que parecen inicialmente. De hecho, los cambios en el destino celular podrían ser una propiedad fisiológica corriente en animales adultos, puesto que muchos de los trabajos citados a continuación implicaron el trasplante directo de células adultas sin haber sido manipuladas experimentalmente.

En la mayoría de estos experimentos, en los que se demuestra que CMO dan lugar a tipos celulares propios de otros órganos y tejidos, se ha utilizado un procedimiento bastante similar. En ellos, la identificación de los cambios en el destino celular se consigue mediante el trasplante intravenoso o intraperitoneal de CMO de un ratón adulto, identificable genéticamente, en hospedadores normales adultos y letalmente irradiados. Ante elevadas dosis de radiación, los ratones mueren si no reciben un trasplante de médula ósea que permita la reconstrucción de todos los linajes celulares de la sangre. Asimismo, el éxito del trasplante puede ser confirmado por medio de la supervivencia de los animales receptores y del grado de quimerismo sanguíneo. Para la identificación de las células del donante, la médula ósea procede de ratones donantes transgénicos que expresan constitutivamente en sus células la proteína verde fluorescente (GFP, del inglés *Green Fluorescent Protein*) o la enzima β -galactosidasa. Alternativamente, también se usan células procedentes de un ratón macho, que, tras su trasplante en hembras receptoras, pueden ser detectadas mediante un marcaje específico para el cromosoma Y. En todos estos casos, los resultados sugieren que células de la médula ósea pueden experimentar un proceso gradual que lleva consigo una migración, una conversión a un nuevo fenotipo y la adquisición de funciones características del tejido en el que finalmente se encuentran.

De la médula ósea al músculo

El primer estudio que demostró que las CMO llegaban a incorporarse estructural y funcionalmente en el músculo esquelético en regeneración fue llevado a cabo por Ferrari y colaboradores (1998). En este trabajo, en el que no entraron a detallar el tipo celular responsable de este fenómeno, sugerían que, tras el trasplante de médula ósea, las células derivadas de ésta daban lugar a miocitos en aquellas regiones que habían estado expuestas a un daño químico, inducido por la inyección intramuscular de cardiotoxina. Para ello utilizaron como donantes una línea de ratones transgénicos en la que *lacZ* (gen reportero que codifica la enzima β -galactosidasa) se expresaba bajo el control de un promotor específico de la miosina muscular. Estudios posteriores demostraron que las lesiones genéticas caracteriza-

das por una degeneración muscular crónica, como es el caso de la distrofia muscular de Duchenne, también provocaban una llegada de CMO a las fibras musculares. En este caso, los animales receptores fueron hembras irradiadas de ratón *mdx* (modelo animal de dicha enfermedad) y los donantes fueron ratones silvestres machos. Tras el trasplante de médula ósea, las hembras *mdx* trasplantadas presentaban células musculares originadas a partir del donante, que producían los factores de transcripción musculares específicos myf5 y miogenina, así como la proteína distrofina, ausente en la distrofia muscular de Duchenne (Bittner *et al.*, 1999; Gussoni *et al.*, 1999). Es importante destacar que en estos estudios la frecuencia de aparición de las células originadas a partir de la médula ósea trasplantada en los animales receptores fue siempre muy baja (Vieyra *et al.*, 2005). Pese a ello, quedaba demostrado que CMO eran capaces de migrar y convertirse en miocitos en respuesta a un daño muscular inducido química o genéticamente.

De la médula ósea al corazón

A tenor de los resultados observados para el músculo esquelético, varios trabajos (Jackson *et al.*, 2001; Orlic *et al.*, 2001) sugirieron que la conversión de células de la médula ósea en células musculares podría estar ocurriendo también en el corazón. En estos ensayos, CMO marcadas con GFP fueron inyectadas directamente en la región próxima a una zona infartada del ventrículo izquierdo de ratones, dando como resultado la sustitución del tejido muerto por células que expresaron proteínas específicas del músculo cardíaco tras llegar al órgano diana (Orlic *et al.*, 2001). Posteriormente, también se comprobó cómo la inyección intravenosa de células de la médula ósea en ratones letalmente irradiados no sólo reconstituía la sangre de los animales receptores, sino que, además, conllevaba la incorporación de estas células en el miocardio lesionado por isquemia, expresando, además, proteínas típicas de cardiomiocitos, como, por ejemplo, la α -actinina (Jackson *et al.*, 2001). Sin embargo, aunque estos trabajos demostraron la llegada de CMO al corazón, la frecuencia de este proceso era también muy baja (Vieyra *et al.*, 2005). No obstante, muchos de los recientes avances científicos en el campo de la regeneración cardiovascular, tanto en animales como en seres humanos, se están llevando a cabo mediante la utilización de células madre de la médula ósea (Liao *et al.*, 2007).

De la médula ósea al hígado

Una de las demostraciones más contundentes de la regeneración de tejidos no hematopoyéticos a partir de la médula ósea es la relacionada con el hígado. En este sentido, se ha demostrado cómo las CMO son capaces no sólo de regenerar grandes porciones de

este órgano, sino también de llevar a cabo su función, rescatando de la muerte a ratones con enfermedades hepáticas de origen genético (Lagasse *et al.*, 2000). En estudios de este tipo, tras recibir el trasplante de médula ósea, los ratones eran tratados con drogas que inducían daño hepático y bloqueaban la proliferación de los hepatocitos, y, sin embargo, presentaban en sus hígados CMO que iban madurando poco a poco y dando lugar a hepatocitos (Petersen *et al.*, 1999; Theise *et al.*, 2000a). Paralelamente, Lagasse y colaboradores (2000) utilizaron ratones deficientes en la enzima fumarilacetoacetato hidrolasa (FAH -/-; animales modelo de una enfermedad hereditaria hepática letal, la tirosinemia de tipo I). Estos ratones fueron irradiados letalmente y trasplantados con médula ósea de animales silvestres. Los hepatocitos derivados de las CMO trasplantadas no sólo constituyeron del 30 al 50% de la masa total del hígado a los 7 meses después del trasplante, sino que también restablecieron la mayoría de las funciones hepáticas, como la expresión de la hidrolasa hepática –antes ausente–, hasta niveles cercanos a la normalidad, conduciendo a su supervivencia a largo plazo (Lagasse *et al.*, 2000). A pesar de que, en este caso, el daño tisular juega probablemente un papel importante en la respuesta, la repoblación del hígado por CMO puede ocurrir también en ausencia de lesión, aunque en menor proporción (Theise *et al.*, 2000a). Incluso en humanos, se ha visto cómo las CMO son capaces de dar lugar a un número considerable de hepatocitos y de células ducturales, tanto en hígados de pacientes que habían recibido un trasplante de médula ósea procedente del sexo opuesto, como en hígados trasplantados (Alison *et al.*, 2000; Theise *et al.*, 2000b). Por ello, dada la ausencia de tratamientos para algunas enfermedades hepáticas severas, resulta de gran interés el estudio riguroso y profundo de esta regeneración del hígado por CMO (Blau *et al.*, 2001).

De la médula ósea al cerebro

A modo de anécdota, cabe destacar que los dos primeros estudios en demostrar este proceso fueron aceptados para su publicación el mismo día (31 de octubre de 2000) por la revista *Science* pese a haber sido llevados a cabo por dos grupos de investigación independientes (Brazelton *et al.*, 2000; Mezey *et al.*, 2000). En ambos trabajos se ponía de manifiesto que el trasplante de médula ósea, bien mediante inyección intravenosa (Brazelton *et al.*, 2000), bien mediante inyección intraperitoneal (Mezey *et al.*, 2000), da lugar a células con características neuronales en el SNC de ratones. En el trabajo llevado a cabo por el grupo de Brazelton, células derivadas de la médula ósea trasplantada eran detectadas en diversas regiones del cerebro de ratones adultos letalmente irradiados, entre las que se incluían el hipocampo, el cerebelo, el bulbo olfatorio y algunas áreas corticales. Estas células se encontraban integradas en el tejido nervioso y coexpresaban GFP junto con uno o más marcados-

res neuronales específicos como NeuN (del inglés “*Neuronal Nuclei*”) o β -tubulina III (Tuj1).

En el otro estudio (Mezey *et al.*, 2000) se empleó como animal receptor ratones *knock-out* PU.1, que carecen de macrófagos, neutrófilos, mastocitos, osteoclastos y linfocitos B y T en el momento de su nacimiento (Mckercher *et al.*, 1996; Tondravi *et al.*, 1997). Estos animales, cuando nacen vivos, requieren un trasplante de médula ósea antes de las 48 horas posteriores a su nacimiento para poder sobrevivir y desarrollarse correctamente. El trasplante intraperitoneal de médula ósea de machos silvestres en neonatos hembras PU.1 salvó a estos animales y conllevó la aparición de células con cromosoma Y en la mayor parte del encéfalo. Estas células, que expresaban NeuN y eran, por tanto, de estirpe neuronal, eran especialmente abundantes en la corteza cerebral, el hipotálamo, el hipocampo, la amígdala y el estriado.

Estos dos estudios pioneros, que pusieron de manifiesto un inesperado grado de plasticidad de las CMO, bien tras un pequeño daño (irradiación) o bien en ausencia de éste, dieron paso a una gran cantidad de trabajos en los que se ha intentado responder a las múltiples preguntas surgidas a raíz de estas primeras observaciones, y algunas de las cuales siguen sin poder responderse de una manera convincente aún hoy en día. Lo que sí está claro es que el posible uso terapéutico de estas células constituye una prometedora estrategia para múltiples enfermedades degenerativas, no sólo nerviosas, como es el caso del Parkinson o del Alzheimer, sino con un origen diferente, como son las distrofias musculares, los infartos de miocardio, las enfermedades hepáticas crónicas, la diabetes de tipo 1 y 2, así como alteraciones hematopoyéticas, de los ojos, de la piel o de los riñones, y que podrían ser tratadas gracias a terapias basadas en las células madre adultas (Mimeault y Batra, 2006).

Las células de la médula ósea y las células de Purkinje del cerebelo

La principal región en la que se ha estudiado la formación de neuronas a partir de células de la médula ósea es el cerebelo, y más concretamente la formación de células de Purkinje. Este fenómeno no deja de resultar extraño debido al enorme grado de diferenciación alcanzado por este tipo neuronal. Las células de Purkinje son neuronas mononucleadas que se originan durante la gestación y no se reemplazan tras su pérdida traumática o por enfermedad genética (Manuelidis y Manuelidis, 1974; Fernández-González *et al.*, 2002). La complejidad e importancia de las células de Purkinje se acentúa por el hecho de que sus axones constituyen la única eferencia del cerebelo a otras regiones, y porque en los humanos cada célula de Purkinje puede llegar a recibir más de un millón de “inputs” de otras

neuronas (Weimann *et al.*, 2003a). De hecho, estas grandes neuronas altamente especializadas son críticas para el control del equilibrio y de los movimientos finos. Una pérdida de células de Purkinje produce déficits de estas funciones en algunas enfermedades: ataxia-telangiectasia (causa más común de ataxia progresiva durante la infancia), degeneraciones cerebelares alcohólicas (particularmente en el síndrome de Wernicke-Korsakoff) y otras enfermedades del tipo Creutzfeldt-Jacob y Kuru (Graham *et al.*, 1997). Así, la renovación o el rescate de las células de Purkinje podría tener implicaciones terapéuticas muy significativas (Weimann *et al.*, 2003b). No entraremos aún (lo trataremos en posteriores apartados) en la polémica acerca del mecanismo por el que se lleva a cabo la formación de células de Purkinje del cerebelo a partir de las CMO. Sin embargo, sí mostraremos una breve recopilación de algunos de los datos publicados hasta la fecha dada su relevancia para nuestro estudio.

A raíz de las primeras publicaciones en las que se ponía de manifiesto la aparición en distintas regiones del SNC de células derivadas de la médula ósea que expresaban marcadores neuronales (Brazelton *et al.*, 2000; Mezey *et al.*, 2000), las investigaciones se dirigieron a conocer la verdadera potencialidad de estas células, y lo que es más importante, a descubrir si esos fenotipos neuronales observados en los estudios previos persistían con el tiempo y daban lugar a neuronas funcionales (Priller *et al.*, 2001a). Los primeros resultados al respecto llegaron del grupo de Priller en 2001, quien demostró la existencia de células de Purkinje completamente desarrolladas y funcionales (hasta un máximo de 10 por animal, en torno al 0,1% del total de células de Purkinje analizadas) doce meses después del trasplante intravenoso de células procedentes de animales GFP en ratones adultos letalmente irradiados (Priller *et al.*, 2001a). Evidencias similares han sido publicadas posteriormente (Wagers *et al.*, 2002; Álvarez-Dolado *et al.*, 2003; Weimann *et al.*, 2003a; Corti *et al.*, 2004; Bae *et al.*, 2005; 2007; Magrassi *et al.*, 2007; Johansson *et al.*, 2008; Nygren *et al.*, 2008), incluso en humanos (Weimann *et al.*, 2003b). En el estudio realizado con tejido humano, Weimann y colaboradores (2003b) analizaron el cerebelo de mujeres que habían recibido un trasplante de médula ósea de donantes masculinos y encontraron también que aproximadamente el 0,1% del total de las células de Purkinje analizadas presentaban cromosoma Y (Weimann *et al.*, 2003b). Es importante señalar que muchas de las células de Purkinje que expresan marcadores del donante, tanto en ratones como en humanos, son binucleadas (Álvarez-Dolado *et al.*, 2003; Weimann *et al.*, 2003a, b; Magrassi *et al.*, 2007; Johansson *et al.*, 2008). En los estudios iniciales se afirmaba que las células de Purkinje relacionadas con la médula ósea sólo eran visibles una vez cumplidos doce meses desde el trasplante (Priller *et al.*, 2001a). Pero estudios posteriores mostraron que podían encontrarse ya a los dos (Álvarez-Dolado

et al., 2003) o tres meses (Magrassi *et al.*, 2007) después de la realización del trasplante. Además, se ha demostrado también que el número de células de Purkinje relacionadas con la médula ósea trasplantada aumenta linealmente con el tiempo (Weimann *et al.*, 2003a, b; Magrassi *et al.*, 2007), y se llegan a observar hasta un total de 47 células de Purkinje (Magrassi *et al.*, 2007) e incluso 60 (Weimann *et al.*, 2003a) por cerebelo en ratones, 18 meses después de un único trasplante. Por último, se ha comprobado que las células de Purkinje originadas se mantienen estables al menos durante 7 meses, tiempo máximo al que fue llevado a cabo el estudio (Magrassi *et al.*, 2007).

Conviene señalar que el posible efecto de la radiación en todo este proceso, a la que se somete a los animales receptores antes del trasplante, quedó inicialmente descartado gracias al trabajo de Magrassi y colaboradores (2007). Estos autores no encontraron diferencias significativas al comparar el número de células de Purkinje producidas a partir de la médula ósea trasplantada en animales que recibieron una irradiación letal, frente a animales sometidos a un tratamiento de quimioterapia para la eliminación de su médula ósea, antes del correspondiente trasplante. Sin embargo, recientemente se ha publicado que la radiación, aunque no es un requisito indispensable para la formación de células de Purkinje a partir de las CMO (Johansson *et al.*, 2008), contribuye a que este proceso se lleve a cabo con una frecuencia mucho mayor (Johansson *et al.*, 2008; Nygren *et al.*, 2008).

Células de Purkinje poliploides

Como hemos citado anteriormente, muchas de las células de Purkinje que se han encontrado expresando marcadores del donante, tanto en ratones como en humanos, son binucleadas (Álvarez-Dolado *et al.*, 2003; Weimann *et al.*, 2003a, b; Magrassi *et al.*, 2007; Johansson *et al.*, 2008; Nygren *et al.*, 2008). La poliploidía de las células de Purkinje no es un descubrimiento nuevo. Pese a ello, el primer trabajo que demostró claramente la existencia de células de Purkinje con dos núcleos fue el llevado a cabo por Álvarez-Dolado y colaboradores en 2003. Los estudios previos, realizados hace ya varias décadas, habían sugerido la existencia de células de Purkinje poliploides en ratas de edad avanzada (Inukai, 1928), en ratones senescentes (Andrew, 1937; 1939) y en una variedad de condiciones patológicas humanas (Lapham, 1968), sin haberse llegado a demostrar explícitamente la existencia de células binucleadas, a pesar del contenido tetraploide de ADN de algunas de éstas (Mares *et al.*, 1973). No obstante, los resultados descritos por Andrew para ratones de edad avanzada se corresponden con los publicados por Magrassi y colaboradores 70 años más tarde. Es importante reseñar que en este segundo trabajo observaron en torno a un 5% de células de Purkinje binucleadas en el cerebelo de ratones de 18 meses de edad (Magrassi *et al.*, 2007).

El análisis de las células de Purkinje binucleadas, efectuado mediante microscopía electrónica por Álvarez-Dolado y colaboradores (2003), reveló que ambos núcleos ofrecían características morfológicas muy diferentes. Uno de los núcleos presentaba una superficie irregular, con múltiples invaginaciones, eucromatina y un único nucleolo, típico de las células de Purkinje (Palay y Chan-Palay, 1974); mientras que el otro núcleo tenía una forma esférica uniforme, con heterocromatina altamente compactada y múltiples nucleolos, que indicaba un posible origen a partir de CMO (Álvarez-Dolado *et al.*, 2003). Sin embargo, un estudio posterior de las células de Purkinje binucleadas a diferentes tiempos (Weimann *et al.*, 2003a) evidenció que, con el tiempo, los dos núcleos adquirirían características similares, típicas de los núcleos estándares de las células de Purkinje. Este hecho puso de manifiesto que el núcleo “procedente” de las CMO –más condensado y uniforme inicialmente– llega a ser menos compacto, asumiendo finalmente la morfología de un núcleo típico de las células de Purkinje y, lo que es más importante, activando la expresión de sus propios genes (Weimann *et al.*, 2003a; Johansson *et al.*, 2008). Estos resultados sugieren la formación de células de Purkinje a partir de las CMO mediante fusión celular (Weimann *et al.*, 2003a; Johansson *et al.*, 2008; Nygren *et al.*, 2008) y no mediante transdiferenciación (ambos procesos serán desarrollados en detalle más adelante en esta introducción).

Efecto de un microambiente neurodegenerativo

La formación de tipos celulares propios de otros tejidos a partir de las CMO ha sido observada tanto en condiciones normales, fisiológicas, como ante distintos tipos de daño tisular. En el primer caso, la frecuencia de este proceso fue siempre bastante baja (Priller *et al.*, 2001b; Álvarez-Dolado *et al.*, 2003; Johansson *et al.*, 2008; Nygren *et al.*, 2008). Sin embargo, esa frecuencia basal observada en condiciones fisiológicas se ve incrementada cuando el proceso se lleva a cabo en animales con algún tipo de lesión, ya sea genética o inducida física o químicamente (Gussoni *et al.*, 1999; Lagasse *et al.*, 2000; Jackson *et al.*, 2001). En el caso del SNC, y más concretamente de las células de Purkinje del cerebelo, esa diferencia en la frecuencia se ha observado tanto ante un trasplante directo de las CMO en la zona lesionada (Bae *et al.*, 2005), como ante un trasplante sistémico de médula ósea (Magrassi *et al.*, 2007; Johansson *et al.*, 2008; Nygren *et al.*, 2008).

En el caso del trasplante directo de las CMO en una zona lesionada, se utilizaron como receptores ratones BALB/c *npc^{mib}*, modelo animal de la enfermedad humana Niemann-Pick de tipo C1, en los que se produce una acumulación intracelular de esfingomieliina en las células de Purkinje, que conlleva su progresiva degeneración a partir de las 3 semanas de edad y la consecuente ataxia cerebelosa asociada (Tanaka *et al.*, 1988). El trasplan-

te directo de CMO de ratones sanos, que expresaban la esfingomielinasa ácida, en el cerebelo de ratones BALB/c *npc^{nih}* de 4 semanas de edad contribuyó significativamente a la supervivencia de las neuronas de Purkinje. Muchas de las neuronas de Purkinje supervivientes presentaron marcadores procedentes del donante, lo que puso de manifiesto su relación con las CMO trasplantadas (Bae *et al.*, 2005). La comparación de los resultados obtenidos tras el mismo tipo de trasplante en ratones silvestres y en ratones BALB/c *npc^{nih}* dio como resultado una mayor cantidad de células de Purkinje con marcadores procedentes del donante ante un ambiente degenerativo. Del mismo modo, en los ratones BALB/c *npc^{nih}* trasplantados se encontraron muchas más neuronas de Purkinje con dos núcleos (21,5% de total) que en los ratones normales trasplantados (7,5%). Todo ello parece sugerir firmemente que la fusión celular de CMO y células de Purkinje ocurre en una proporción más elevada en un ambiente neurodegenerativo que en condiciones normales (Bae *et al.*, 2005).

El posible efecto “favorecedor” de un ambiente neurodegenerativo en todo este proceso ha sido corroborado posteriormente gracias al trabajo de Magrassi y colaboradores (2007). Estos autores realizaron trasplantes sistémicos de CMO procedentes de animales GFP en ratas y ratones en los que se habían afectado selectivamente las células de Purkinje, mediante inyección intraventricular de sustancias tóxicas (anticuerpos anti-P75 conjugados con saporina (Heckers *et al.*, 1994) o yoduro de propidio (IP; Rossi *et al.*, 1993)) que afectan selectivamente a este tipo neuronal. Los resultados de este estudio demostraron que el ambiente degenerativo conllevaba tanto una aparición más temprana (1 mes antes) de células de Purkinje verdes, como una cantidad de éstas mucho mayor en animales lesionados que en animales control (Magrassi *et al.*, 2007). Los resultados fueron similares tanto para ratas como para ratones (Magrassi *et al.*, 2007). Finalmente, dos trabajos publicados en este último año (Johansson *et al.*, 2008; Nygren *et al.*, 2008) han coincidido en señalar el importante papel favorecedor del proceso inflamatorio en todo este fenómeno.

Las células de la médula ósea y el bulbo olfatorio

La llegada de CMO al BO fue constatada ya desde los primeros trabajos que abordaron la llegada de células derivadas de la médula ósea al cerebro (Brazelton *et al.*, 2000; Mezey *et al.*, 2000). Pese a ello, y pese a tratarse de una de las regiones de mayor incorporación de nuevas neuronas durante la vida adulta del animal (Altman, 1969; Lois y Álvarez-Buylla, 1994; Carleton *et al.*, 2003), su estudio no se ha realizado en profundidad, ni se dispone de datos tan precisos como en el caso del cerebelo y las células de Purkinje. Además,

este análisis está influido negativamente por la heterogeneidad de los resultados publicados (Brazelton *et al.*, 2000; Priller *et al.*, 2001a; Corti *et al.*, 2002; Massengale *et al.*, 2005). Estos escasos trabajos previos que han abordado esta cuestión resultan controvertidos, ya que muestran resultados bastante contradictorios entre sí.

En el trabajo pionero de Brazelton y colaboradores (2000) el número de CMO que expresaban marcadores neuronales, NeuN, Tuj1 o NFH (del inglés *NeuroFilament Heavy chain*), en el BO a los 2-3 meses después del trasplante fue muy elevado (0,2–0,3% del número total de neuronas) en comparación con otras regiones y con los datos publicados en trabajos posteriores. Un año más tarde, Priller y colaboradores (2001) analizaron el BO de animales en los que habían demostrado la existencia de células de Purkinje, completamente desarrolladas y funcionales, relacionadas con CMO procedentes de donantes GFP (Priller *et al.*, 2001a). Contrariamente a lo esperado, apenas encontraron CMO en el BO que coexpresasen GFP y NeuN y, además, ninguna de esas escasas células encontradas mostraron una morfología neuronal característica. A pesar de este trabajo, que pone en entredicho las primeras observaciones, un año más tarde se publicó un nuevo estudio (Corti *et al.*, 2002) que reafirmaba los resultados obtenidos anteriormente por el grupo de Brazelton (2000). Finalmente, en el año 2005, se publicó un nuevo trabajo que abordaba la llegada de CMO al cerebro, que incluía el BO (Massengale *et al.*, 2005). En él, pese a encontrar células de Purkinje que expresaban marcadores del donante, no se encontraron CMO con características neuronales, positivas para NeuN o MAP2 (del inglés *Microtubule Associated Protein 2*), ni en el BO ni en otras regiones encefálicas distintas al cerebelo (Massengale *et al.*, 2005).

Por otro lado, la incorporación de CMO al BO también se ha estudiado mediante su inyección en el ventrículo lateral o en la zona subventricular, tanto en estadios embrionarios (Muñoz-Elías *et al.*, 2004), como en neonatos (Kopen *et al.*, 1999; Hudson *et al.*, 2004). Al igual que en los trabajos presentados anteriormente, los resultados de este tipo de estudios son bastante heterogéneos. No obstante, no entraremos a detallar estos resultados, ya que el trasplante intracerebral de CMO está fuera de la línea de investigación planteada para este trabajo.

Por último, hay que destacar que ninguno de los estudios que analizan la llegada de CMO al BO se ha realizado en animales con degeneración localizada en esta región encefálica, ya fuese genética o inducida, por lo que no se tienen evidencias del efecto de un ambiente neurodegenerativo en este proceso. Del mismo modo, y haciendo un paralelismo con los puntos tratados en el apartado relativo al cerebelo, no se han publicado evidencias de la existencia de células poliploides en el BO de roedores.

Mecanismos de plasticidad de las células madre

Las CMA se han mostrado mucho más plásticas de lo que nunca antes se había llegado a imaginar. Así pues, ante este paradigma de la plasticidad celular surge una interpretación más flexible del concepto de diferenciación de una CMA en respuesta a su entorno o a señales de regeneración. No obstante, para poder interpretar esta capacidad y poder controlar el destino de estas CMA, es necesario un profundo conocimiento de los mecanismos responsables de la plasticidad. Hasta el momento, se han propuesto dos hipótesis principales: la **transdiferenciación** y la **fusión celular**.

La **transdiferenciación** fue definida por Okada en 1991 como un cambio de un tipo celular, completamente diferenciado y funcional, a otro tipo de célula también diferenciada. No obstante, los resultados obtenidos posteriormente a partir de estudios tanto *in vitro* como *in vivo* permitieron redefinirla como la transformación de una célula perteneciente a una determinada estirpe celular en otra célula de otra estirpe completamente diferente (Álvarez-Dolado, 2007). En general, las células madre responden a varios factores *in vitro* que modifican su programa de diferenciación y las hacen incluso más plásticas que *in vivo* (Joseph y Morrison, 2005). Las células madre de la médula ósea no son una excepción, y son capaces de diferenciarse en tipos celulares de las tres capas germinales ante condiciones específicas de cultivo (Jiang *et al.*, 2002). Las primeras interpretaciones de los resultados obtenidos de los experimentos de trasplante de médula ósea descritos anteriormente seguían esta línea de pensamiento. Según esto, las CMO habrían penetrado en el parénquima de los diferentes órganos analizados, donde responderían ante factores específicos del tejido o a señales de daño tisular. Así, el nuevo microambiente permitiría o impulsaría la transdiferenciación de las CMO en tipos celulares específicos de ese tejido. Sin embargo, esta interpretación de los resultados no resultó convincente para algunos grupos que propusieron una explicación alternativa: la **fusión celular**.

La hipótesis de la **fusión celular** considera que una célula derivada de la médula ósea se fusiona con un precursor local o con una célula madura, transfiriendo su material genético y mezclando sus citoplasmas. La célula híbrida recién formada adquiriría un nuevo fenotipo, modificando su programa genético y, en consecuencia, destruyendo su restricción a una determinada estirpe celular (Álvarez-Dolado, 2007). La fusión celular no fue mencionada como una posible alternativa a la transdiferenciación hasta la publicación simultánea de dos trabajos independientes en los que se mostraba la fusión *in vitro* de CME con células de la médula ósea y con CMA de origen neural (Terada *et al.*, 2002; Ying *et al.*, 2002). No obstante, la contribución de la fusión celular a la reparación tisular ya había sido mostrada

con anterioridad en estudios previos sobre regeneración muscular (Gibson *et al.*, 1995; Ferrari *et al.*, 1998; Gussoni *et al.*, 1999).

Tras haberse puesto en duda la hipótesis de la transdiferenciación, muchos de los grupos de investigación de este campo centraron sus esfuerzos en encontrar evidencias en favor de la fusión celular en sus modelos experimentales (Álvarez-Dolado, 2007). El primer modelo *in vivo* en el que se mostró claramente fusión celular fue el de la regeneración hepática. En este caso, el análisis citogenético de los hepatocitos producidos a partir de la médula ósea mostraba cariotipos que revelaban fusión celular entre células del donante y del receptor (Vassilopoulos *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003). Previamente, Wagers y colaboradores (2002) ya habían encontrado escasas evidencias de transdiferenciación de las CMH tras su trasplante, proponiendo que células de Purkinje y hepatocitos podrían obtenerse como resultado de la fusión celular. Del mismo modo, el grupo de Weimann, que realizó necropsias cerebrales de mujeres que habían recibido un trasplante de médula ósea de donantes masculinos, sugirió firmemente que algunas células de Purkinje se habían fusionado con células hematopoyéticas procedentes de la médula ósea trasplantada, puesto que se trataba de células de Purkinje poliploides XXXY (Weimann *et al.*, 2003b).

A pesar de estos resultados, la comunidad científica se mantenía escéptica sobre la fusión celular, ya que no se tenían evidencias directas de transdiferenciación o de fusión celular bajo condiciones normales, es decir, en ausencia de daño tisular. No fue confirmada y aceptada hasta la publicación de un trabajo de Álvarez-Dolado y colaboradores (2003) en el que se mostraba claramente, gracias al empleo de dos líneas transgénicas de ratón (R26R y CRE-GFP; que describiremos en detalle en la sección de Material y Métodos de este trabajo), la fusión celular de CMO con hepatocitos y con células de Purkinje tras el trasplante de médula ósea en condiciones normales, aunque con una irradiación previa. Además, también mostraron evidencias de fusión con cardiomiocitos. Por el contrario, no observaron pruebas de transdiferenciación en ninguno de los tejidos analizados. Estos resultados se han ido corroborando por otros grupos en los años posteriores. Así, se ha mostrado cómo las CMO generan cardiomiocitos en corazones infartados mediante fusión celular, aunque en baja frecuencia, pero no mediante transdiferenciación (Balsam *et al.*, 2004; Murry *et al.*, 2004; Nygren *et al.*, 2004). Weimann y colaboradores (2003b) mostraron que las neuronas de Purkinje fusionadas formaban heterocariones¹ estables y que, además, su número aumentaba con la edad. Como hemos citado anteriormente, el núcleo procedente de la médula ósea era reprogramado en el heterocarionte, y se activaba la expresión de genes específi-

¹ Heterocarionte: célula con dos núcleos resultado de una fusión celular.

cos de las neuronas de Purkinje. La formación de heterocariones mediante fusión celular heterotípica ha sido recientemente propuesta como la única vía para la formación de células de Purkinje del cerebelo a partir de CMO (Johansson *et al.*, 2008; Nygren *et al.*, 2008).

Pese a haber sido verificada la fusión celular, aún no se ha podido identificar, entre todas las células de la médula ósea, el tipo celular capacitado para llevarla a cabo, aunque todo parece indicar que se trata de la porción de CMH. Hace unos años, se publicó que los monocitos mieloides podían fusionarse con células musculares cardiacas, y los macrófagos con hepatocitos, dando lugar a heterocariones en el caso del músculo cardiaco, y tanto a heterocariones como a sincariones² en el caso de los hepatocitos (Camargo *et al.*, 2003, 2004; Willenbring *et al.*, 2004). Paralelamente, se publicaba que, en el caso del músculo esquelético, el tipo celular con más probabilidades de realizar procesos de fusión celular era un precursor de macrófagos de la población de monocitos mieloides, pero no el macrófago como tal (Doyonnas *et al.*, 2004). Recientemente, se ha demostrado que el tipo celular capacitado para originar procesos de fusión heterotípica –con cardiomiocitos, hepatocitos, células de Purkinje y células musculares esqueléticas– forma parte de la porción de CMH (Johansson *et al.*, 2008), y que, además, puede ser llevado a cabo tanto por células de linaje mielóide como linfóide (Nygren *et al.*, 2008).

Potencial terapéutico e implicaciones clínicas

A tenor de los resultados obtenidos en los últimos años, las células madre de la médula ósea han ido adquiriendo una importancia cada vez mayor por sus posibles implicaciones clínicas y su creciente potencial terapéutico. Como ha quedado plenamente demostrado, contribuyen a la regeneración tisular, corrigiendo mutaciones recesivas (Vassilopoulos *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003) o restaurando funcionalmente tejidos dañados (Ferrari *et al.*, 1998; Bittner *et al.*, 1999; Gussoni *et al.*, 1999). Entre las enfermedades que podrían beneficiarse de terapias basadas en el potencial de estas células madre podemos citar la diabetes (Oh *et al.*, 2004; Bonner-Weir y Weir, 2005); algunos tumores (Kondo *et al.*, 2003; Mayhall *et al.*, 2004); los infartos de miocardio (Leri *et al.*, 2005); enfermedades hepáticas agudas (Guettier, 2005); patologías musculares (Gussoni *et al.*, 2002); algunos daños cerebrales y enfermedades del SNC, incluidas algunas enfermedades visuales (Li *et al.*, 2000; Mahmood *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2006), hematopoyéticas (Woodard *et al.*, 2004) e inmunes (Kushida *et al.*, 2001), entre otras (Mimeault y Batra, 2006). Sin embargo, como también

² Sincariote: célula con un núcleo híbrido formado tras la fusión de los dos núcleos de un heterocarionte.

hemos citado anteriormente, una de las mayores objeciones para su posible utilización terapéutica viene dada por la baja frecuencia de la llegada de las CMO a los diferentes órganos estudiados. Aunque no podemos olvidar que esta frecuencia está directamente influida por la capacidad de identificación de las células trasplantadas en los tejidos analizados, y que, en muchas ocasiones, puede estar infravalorada por el propio sistema de detección empleado o por la eliminación prematura del marcador utilizado. No obstante, la llegada de CMO a diferentes órganos a través de la sangre, y su posterior fusión con células residentes, constituiría una importante vía terapéutica que permitiría la transferencia génica para solventar defectos genéticos (Tögel y Westenfelder, 2007). A modo de ejemplo, cabe destacar que los macrófagos, potenciales candidatos a tomar parte en eventos de fusión (Álvarez-Dolado, 2007), penetran en el cerebro atraídos específicamente hacia las zonas de daño neuronal (Priller *et al.*, 2001b). Así, macrófagos modificados genéticamente podrían ser utilizados como vectores para la liberación de fármacos, factores de crecimiento o citoquinas. Del mismo modo, la fusión celular podría dirigir esta liberación hacia un tipo celular determinado, como, por ejemplo, hacia células de Purkinje (Prockop *et al.*, 2003). En este sentido, la fusión también podría ser usada como herramienta terapéutica para eliminar células cancerígenas existentes, a través de la incorporación dirigida de agentes antitumorales con la ayuda de macrófagos modificados genéticamente (Kondo *et al.*, 2003; Mayhall *et al.*, 2004).

Además de este posible mecanismo de acción, también se han propuesto otras posibles explicaciones a los efectos observados tras el trasplante de médula ósea en diferentes modelos animales. Entre ellos se incluyen la secreción de citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento, que pueden modificar activamente ciertas afecciones. Asimismo, las acciones posteriores de estos factores conllevan la estimulación de la angiogénesis, la supresión de la inflamación, la inhibición de la apoptosis, el rescate por transferencia mitocondrial y el aumento de la reparación endógena a través de la estimulación y proliferación de células madre y progenitores intrínsecos (Rabb, 2005; Chien, 2006; Tögel *et al.*, 2007). Por último, una ventaja adicional de la utilización de terapias basadas en la llegada de las células madre de la médula ósea a través del torrente sanguíneo viene dada al considerar vías efectivas para reparar sistemas integrados y altamente especializados, como es el caso del cerebro adulto, en el que resulta básico el poder preservar la complejidad estructural del tejido diana. A diferencia de un trasplante directo en la zona afectada, la llegada de las células a través de la circulación tendría lugar en la propia estructura original del órgano sin generar ningún daño quirúrgico (Álvarez-Dolado, 2007).

Posibles efectos secundarios de su utilización terapéutica

En general, una de las mayores preocupaciones sobre la posible utilización de esta terapia celular está determinada por las potenciales consecuencias asociadas con la permanencia durante un tiempo prolongado de las células del donante en el receptor. Esto constituye una diferencia con los tratamientos farmacológicos, que pueden ser suspendidos, limitándose sus posibles efectos secundarios (Tögel y Westenfelder, 2007). Es por ello por lo que este tipo de terapia requiere extraordinarias precauciones de seguridad y estudios a largo plazo en animales, previos a su posible utilización clínica.

Otra preocupación notable acerca de la terapia celular es la posible formación de teratomas. A diferencia de las CME, en las que constituye un problema muy merecedor de ser tenido en cuenta (Hentze *et al.*, 2007), las CMA, y en especial las de la médula ósea, no parecen formar tumores en condiciones fisiológicas. Sin embargo, en estudios realizados con tejido de ratón *in vitro*, se ha observado que las CMM pueden sufrir una transformación y contribuir al crecimiento de tumores preexistentes (Djouad *et al.*, 2003; Houghton *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005; Tolar *et al.*, 2007). Por suerte, hasta el momento no se han publicado evidencias de transformación de células madre de la médula ósea en tumores en pacientes trasplantados, aunque la experiencia es escasa y los datos extraídos todavía insuficientes para poder estimar sus posibles efectos a largo plazo (Tögel y Westenfelder, 2007). No obstante, hay que tener en cuenta que el proceso de fusión celular ha sido reconocido como un factor en el desarrollo del cáncer (Duelli y Lazebnik, 2003). El resultado de la fusión celular es una célula poliploide, y, si bien es cierto que la poliploidía no está siempre asociada con la enfermedad, está claro que la adquisición de cromosomas adicionales en el proceso de fusión podría conducir a la segregación aberrante de cromosomas y a aneuploidías con la proliferación del producto de fusión (Álvarez-Dolado, 2007). Además, la fusión celular también podría promover la progresión de tumores aumentando la malignidad de las células híbridas resultantes, su resistencia a drogas, confiriéndoles capacidad de metastatizar y contribuyendo a la diversidad tumoral (Miller *et al.*, 1989; Pawelek, 2000).

Aparte de esta potencial formación de tumores, otro temor existente es el posible desarrollo de fibrosis (Iwano *et al.*, 2002; Russo *et al.*, 2006), ya que las CMM son células del tipo de fibroblastos, y están estimuladas por el TGF- β (factor de crecimiento transformante- β , del inglés *Transforming Growth Factor- β*), un factor que ha sido propuesto como uno de los principales causantes del desarrollo de fibrosis tisular. Sin embargo, los modelos animales de fibrosis hepática han mostrado que el trasplante de CMO más que promover la fi-

brosis tisular parece evitarla (Ortiz *et al.*, 2003; Tögel y Westenfelder, 2007) reduciendo su progresión (Zhao *et al.*, 2005).

Por último, se ha mostrado que el proceso de fusión celular podría resultar dañino debido a su potencial como mecanismo de transferencia viral (Álvarez-Dolado, 2007). En este sentido, en el año 2004, Ogle y colaboradores realizaron experimentos de xenotrasplantes en los que trasplantaron células de médula ósea humana en fetos de cerdos. Su objetivo era analizar si retrovirus endógenos porcinos, que se encuentran inactivos en los cerdos, podrían transferirse a las células humanas trasplantadas. Estos investigadores encontraron que las células humanas que sobrevivían en los cerdos contenían ADN cromosómico tanto porcino como humano, confirmando el proceso de fusión celular. Las células híbridas encontradas se dividían, expresaban proteínas humanas y porcinas, y se integraban en tejidos porcinos no hematopoyéticos. Y lo que es más preocupante, las células híbridas eran capaces de transmitir *in vitro* ese tipo de virus a células humanas no infectadas (Ogle *et al.*, 2004). Así, la fusión espontánea puede ocurrir *in vivo* entre células de diferentes especies y podría implicar la aparición de nuevos patógenos mediante la recombinación de determinadas secuencias de ADN (Ogle *et al.*, 2005; Álvarez-Dolado, 2007).

Perspectivas de futuro

El trasplante de médula ósea se ha convertido actualmente en un tratamiento esencial para leucemias hace años incurables, gracias a su desarrollo progresivo desde animales de experimentación hasta su adaptación como tratamiento clínico estándar. El pionero de este tratamiento, E. Donnall Thomas, recibió el premio Nobel de Medicina en 1990. Al igual que sucedió con el trasplante de médula, la terapia con CMO está comenzando a dar el salto desde estadios experimentales a la clínica, e incluso algunos ensayos aleatorios ya han sido llevados a cabo con éxito (Tögel y Westenfelder, 2007). Sin embargo, puesto que el campo de la Medicina regenerativa se encuentra actualmente en sus comienzos, es muy importante que se definan rigurosamente los criterios para la estandarización de todos los procedimientos implicados en ella. A pesar de que muchos de los resultados que se van obteniendo de la investigación básica hacen pensar que la terapia celular puede convertirse en una importante herramienta como tratamiento innovador de muchas enfermedades, no podemos olvidar la enorme distancia existente entre este tipo de investigación básica y su aplicación clínica.

El ratón mutante PCD

Los diferentes modelos animales que presentan neurodegeneración constituyen una herramienta clave para el estudio del SNC. En la actualidad, se han identificado multitud de ratones mutantes que presentan alteraciones generales en el desarrollo cerebral o incluso degeneración celular en determinadas regiones del encéfalo. Ello permite estudiar, entre otras, la plasticidad celular *in vivo* o las respuestas del organismo ante enfermedades degenerativas del SNC y, además, supone un medio fundamental para el ensayo de terapias de prevención, estabilización y recuperación funcional.

Una alternativa a determinados modelos de lesión experimental en el cerebro adulto la constituyen las mutaciones que conllevan degeneraciones posnatales y selectivas de determinados tipos neuronales maduros. En general, debido a la naturaleza del procedimiento, los resultados obtenidos con las lesiones químicas o quirúrgicas que se practican en el sistema nervioso central son bastante heterogéneos. Por el contrario, las mutaciones citadas producen directamente la pérdida de poblaciones neuronales específicas sin la necesidad de la intervención de ningún agente externo (Harding *et al.*, 1977; Baker *et al.*, 1984; Brunjes *et al.*, 1985) y son un modelo más constante, sencillo y económico que los procedimientos invasivos.

En este Trabajo de Tesis Doctoral se estudia el ratón mutante *PCD*, en el que tienen lugar neurodegeneraciones posnatales y selectivas en varias regiones encefálicas, entre ellas en el cerebelo y en el bulbo olfatorio.

La mutación “Purkinje Cell Degeneration”

La mutación *pcd* (del inglés *Purkinje Cell Degeneration*) apareció espontáneamente en la estirpe C57BR/cdJ del ratón (*Mus musculus* L. 1758) en los laboratorios Jackson en Bar Harbor, Maine, EE. UU. Posteriormente, la mutación se transfirió a la estirpe C57BL/6J (Mullen *et al.*, 1976). Esta mutación original se denomina *pcd*^{1J}. Se han hallado dos alelos mutantes *pcd* adicionales, *pcd*^{2J} y *pcd*^{3J}, que aparecieron espontáneamente en las estirpes SM/J y BALB/cByJ, respectivamente. El alelo *pcd*^{2J} se mantiene en la línea congénita C57BL/6J, mientras que el *pcd*^{3J} se conserva en la estirpe original de la que se originó, la BALB/cByJ (Fernández-González *et al.*, 2002). Se han generado, además, mediante mutagénesis dirigida, otras dos mutaciones denominadas *pcd*^{JWG} y *pcd*^{5J} (Chakrabarti *et al.*, 2006).

La mutación original (*pcd*^{1J}) es la más grave, mientras que la *pcd*^{2J} es la más leve (Fernández-González *et al.*, 2002; Chakrabarti *et al.*, 2006).

La mutación *pcd* se localiza en el cromosoma 13 del ratón y está descrita como autosómica recesiva (Mullen *et al.*, 1976). La región portadora de la mutación *pcd* se ha delimitado, utilizando marcadores polimórficos de ADN (Campbell y Hess, 1996), en un segmento genómico de $0,61 \pm 0,33$ megabases. En esta región, localizada entre los marcadores *D13Mit157* y *D13Mit167* (Fernández-González *et al.*, 2002), se encuentra el gen *nna1*, afectado en la mutación. El ARNm para el que codifica *nna1* se encuentra reducido o alterado en su estructura (salvo en la mutación *pcd*^{5J}), mientras que la expresión de los dos genes que lo flanquean no cambia, al menos en los mutantes *pcd*^{1J}, *pcd*^{2J} y *pcd*^{3J} (Fernández-González *et al.*, 2002). Los niveles de expresión del ARNm de *nna1* varían según el tipo de mutante *pcd*. El mutante *pcd*^{1J} (empleado en esta Tesis Doctoral) no presenta diferencias en la secuencia codificante del gen *nna1* con respecto al alelo silvestre. Sin embargo, su nivel de expresión en el SNC es nulo. Esto hace pensar que la mutación *pcd*^{1J} afecta a una secuencia reguladora del gen *nna1*. En el resto de mutantes *PCD*, la mutación produce inserciones o deleciones en la propia región codificante del gen, induciendo a su vez cambios en la estructura de la proteína o en su estabilidad (Fernández-González *et al.*, 2002; Chakrabarti *et al.*, 2006). El gen *nna1* codifica para una proteína nuclear llamada Nna1 (proteína 1 nuclear del sistema nervioso inducida por axotomía) que se ha asociado con procesos de diferenciación y regeneración neuronal (Harris *et al.*, 2000). La proteína Nna1 tiene un tamaño de 1.218 aminoácidos en el ratón y, además, se ha detectado una expresión importante de su ARNm precisamente en células de Purkinje del cerebelo, en células mitrales del BO, en neuronas talámicas, en fotorreceptores de la retina y en espermatozoides maduros y en desarrollo (Harris *et al.*, 2000; Fernández-González *et al.*, 2002). De la secuencia primaria de la proteína Nna1 se deduce que contiene un motivo de unión a ATP/GTP y señales de localización nuclear. También contiene múltiples sitios susceptibles de fosforilación por quinasas. En concreto, posee cuatro sitios con la secuencia consenso para fosforilación mediada por tirosina-quinasas. Por último, posee una región con actividad carboxipeptidasa cuya falta está implicada en el proceso de neurodegeneración (Wang y Morgan, 2007). La proteína murina presenta una elevada homología con la proteína humana (NNA1), con la que tiene un 96% de similitud (Harris *et al.*, 2000).

Efectos generales de la mutación *pcd*

Como consecuencia de la expresión del alelo mutado *pcd*^{fl} se produce la degeneración posnatal selectiva de todas aquellas poblaciones neuronales que presentan expresión del ARNm de *Nna1* (Fernández-González *et al.*, 2002). Es decir, degeneran de forma específica las neuronas de Purkinje del cerebelo (hecho que provoca una ataxia cerebelosa muy severa; Mullen *et al.*, 1976), las células mitrales del BO principal (que conlleva que el tracto olfatorio lateral, que contiene los axones de las células mitrales, también desaparezca prácticamente; Mullen *et al.*, 1976; Greer y Shepherd, 1982; Bartolomei y Greer, 1998; Recio *et al.*, 2007), así como gran parte de la comisura anterior (Baker y Greer, 1990; Recio *et al.*, 2007) y determinadas neuronas de los núcleos talámicos (O’Gorman y Sidman, 1985; O’Gorman, 1985). Por otra parte, en estos mutantes existe una degeneración lenta y progresiva de los fotorreceptores de la retina de características similares a una retinosis pigmentaria (Mullen y LaVail, 1975; Blanks *et al.*, 1982; LaVail *et al.*, 1982). Los animales mutantes machos son infértiles; presentan un esperma anormal, escaso y carente de movilidad. No obstante, estos machos son capaces de copular. A diferencia de los machos, las hembras mutantes sí son fértiles, aunque presentan serias dificultades en la cría de la escasa descendencia que conciben (Mullen *et al.*, 1976; Handel y Dawson, 1981). Todos estos problemas hacen que la cría de los animales *PCD* sea difícil, puesto que sólo se pueden emplear animales heterocigotos para los cruces y éstos conciben animales homocigotos para la mutación con una probabilidad mendeliana del 25%.

La mayor parte de la bibliografía existente acerca de la mutación *pcd* está centrada en los efectos producidos por el alelo *pcd*^{fl}, por lo que es la mutación usada en este estudio. 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). Para llevar a cabo la transferencia de este alelo *pcd*^{fl} desde la estirpe C57BL/6J a la estirpe DBA establecimos un programa de cruzamientos y controles que describiremos detalladamente en el apartado correspondiente de la sección de Material y Métodos.

Efectos de la mutación *pcd* en el cerebelo

El cerebelo es una región del encéfalo cuya principal función es la de integrar vías sensitivas y vías motoras (Fine *et al.*, 2002). El cerebelo coordina la actividad motora, regula el tono muscular, controla el equilibrio estático y dinámico, se encarga de precisar el acto motor voluntario y participa en procesos de memoria. Es una de las regiones encefálicas

mejor estudiadas debido a la sencilla organización laminar de su corteza y a que se dispone de un buen conocimiento de su citología y arquitectura sináptica (Ramón y Cajal, 1911; Palay y Chan-Palay, 1974; Voogd *et al.*, 1985). Del mismo modo, el estudio de las alteraciones que presentan los numerosos mutantes cerebelosos (Sidman *et al.*, 1965) ha aumentado la comprensión sobre la organización y la fisiología del cerebelo.

Organización del cerebelo

El cerebelo consta de una porción medial, el vermis, y de dos lóbulos laterales o hemisferios. El cerebelo de todos los mamíferos se divide en diez lóbulos básicos separados por las correspondientes fisuras (Sillitoe y Joyner, 2007). La corteza cerebelosa está dispuesta en pliegues denominados *folia cerebelli* o láminas cerebelosas. Cada una de éstas está constituida por tres capas, que son, desde la porción más superficial a la más interna, la capa molecular, la capa de las células de Purkinje y la capa de los granos (Figura 1).

Las células de Purkinje, únicas neuronas eferentes de la corteza cerebelosa, presentan una disposición, forma y tamaño bastante homogéneos a lo largo de toda la estructura. En el ratón, se generan entre los días 11 y 13 de vida embrionaria (E11 y E13) en la zona ventricular del cerebelo (Miale y Sidman, 1961) y migran a través de la corteza cerebelosa entre los días E13 y E17 hasta alcanzar su localización definitiva (Yuasa *et al.*, 1991). Posteriormente, desarrollan su morfología normal hacia la mitad de la tercera semana de vida posnatal (Landis y Mullen, 1978). Las células de Purkinje se disponen formando una monocapa en la corteza cerebelosa y extienden sus árboles dendríticos por la capa molecular en un único plano, donde, además, se encuentran dos tipos de interneuronas: células en cesto y células estrelladas. En la capa de las células de Purkinje también se localizan las células en candelabro (Laine y Axelrad, 1994) y los somas de la glía de Bergmann (Voogd y Glickstein, 1998). Debajo de ésta, se encuentra la capa de los granos, constituida por una numerosa población de granos y otras interneuronas: células de Golgi, células de Lugaro y células unipolares en cepillo (Sillitoe y Joyner, 2007). Estos granos son uno de los tipos neuronales más abundantes del SNC. Sus precursores aparecen entre E11 y E14, proliferan abundantemente hasta el momento del nacimiento y, posteriormente, migran y establecen las sinapsis apropiadas durante los primeros 20 días posnatales (Hatten *et al.*, 1997).

Las células de Purkinje forman las conexiones sinápticas aferentes apropiadas alrededor de los 18 días posnatales. Las células en cesto sinaptan sobre el soma de la célula de Purkinje y las células estrelladas forman sinapsis en el tronco de las dendritas principales de las células de Purkinje (Palay y Chan-Palay, 1974). Las fibras trepadoras, procedentes del

complejo olivar inferior, discurren por las ramas de las dendritas principales de las células de Purkinje y sinaptan en sus espinas (Eccles, 1967; Mugnaini, 1972; Palay y Chan-Palay, 1974). Las fibras paralelas, que son los axones de los granos, sinaptan directamente en las espinas dendríticas de las células de Purkinje (Landis y Mullen, 1978). Las fibras musgosas, con origen en múltiples regiones del SNC, llegan hasta la capa de los granos y hacen sinapsis sobre éstos (Palay y Chan-Palay, 1974; Sillitoe y Joyner, 2007). Por otro lado, los axones de las células de Purkinje sinaptan sobre neuronas de los núcleos cerebelosos profundos y de los núcleos vestibulares laterales, encargados de proyectar la información del cerebelo hacia casi todos los sistemas sensorio-motores descendentes (Palay y Chan-Palay, 1974; Palkovits *et al.*, 1977; Voogd *et al.*, 1985; Sillitoe y Joyner, 2007).

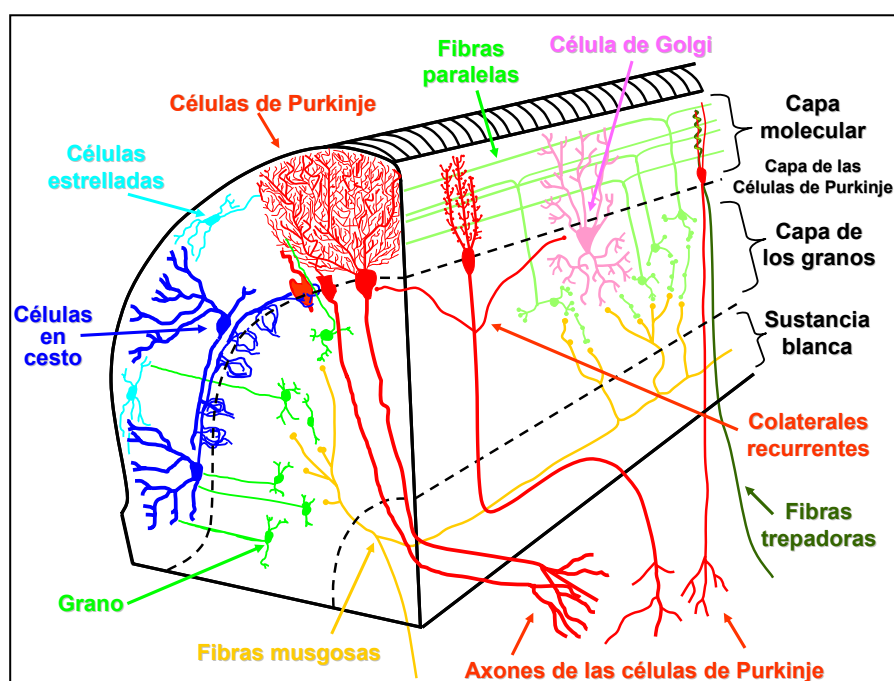


Figura 1. Esquema tridimensional de una lámina cerebelosa en el que se representan sus diferentes capas y los principales tipos celulares. En la capa molecular se localizan las células en cesto y estrelladas, junto con un abundante neuropilo, constituido por las dendritas de las células de Purkinje y las fibras paralelas. A continuación se encuentra la capa de las células de Purkinje formada por los somas de este tipo celular. La capa más interna, situada sobre la sustancia blanca, es la capa de los granos, constituida por numerosos granos y otras interneuronas, como es el caso de las células de Golgi.

Neurodegeneración en el cerebelo

A lo largo de la vida posnatal, el número de células del organismo es ajustado mediante procesos de apoptosis (Zhang *et al.*, 1997). En condiciones normales, más de la mitad de las neuronas mueren por apoptosis antes de alcanzar la madurez (Oppenheim, 1991). La apoptosis de las células de Purkinje es patente alrededor del día 11 de vida posna-

tal, tanto en animales silvestres como en ratones mutantes *PCD* (Zhang *et al.*, 1997). En los animales silvestres, el proceso de apoptosis de las células de Purkinje se detiene en torno a los 24 días de vida posnatal; mientras que en los animales *PCD*, a esa edad, y hasta que concluye la degeneración total, se observa gran número de procesos de muerte celular programada (Zhang *et al.*, 1997), con formaciones de cromatina condensada visibles ya a P22 (Landis y Mullen, 1978). Además, a esa edad, las células de Purkinje de animales *PCD* presentan caspasa 3 activa, implicada en procesos de fragmentación de ADN, corroborando que esta degeneración de las células de Purkinje tiene lugar mediante procesos apoptóticos (Kyuhou *et al.*, 2006). En el cerebelo del ratón mutante *PCD* hay importantes evidencias de degeneración en torno a P18: restos de somas de células de Purkinje en la capa correspondiente y procesos dendríticos degenerados en la capa molecular. Las señales de degeneración están ya muy extendidas a P22; y a P29, la mayoría de los somas han desaparecido, y la capa molecular se ha reducido considerablemente. Esta degeneración de células de Purkinje es menos grave en zonas más ventrales del cerebelo. Así, en el nódulo cerebeloso (lóbulo X) de animales mutantes de P24 tan sólo el 20% de las células de Purkinje ha degenerado. Del mismo modo, a P29, numerosas células de Purkinje están todavía presentes en el nódulo, flóculos, paraflóculos y zona ventral de la *ínsula* (lóbulo IX). Pese a ello, a las 5 semanas de vida, sólo unas cuantas células persisten en los nódulos, flóculos y paraflóculos. La supervivencia de las células de Purkinje a las 7 semanas es muy escasa, y se encuentran mayoritariamente en los nódulos, en donde persisten menos del 5% de las que hay en condiciones normales y que suponen menos del 1% del total de las células de Purkinje del cerebelo (Landis y Mullen, 1978; Alcalde, 2003; Kyuhou *et al.*, 2006). A esa edad, la mayor parte de los restos de esta neurodegeneración ya han sido eliminados por elementos microgliales (Landis y Mullen, 1978). Es relevante señalar también que la microglía parece tener una importante acción en este proceso apoptótico, promoviendo, a través de la liberación de óxido nítrico, la muerte de las células de Purkinje en la fase más tardía de la neurodegeneración (Kyuhou *et al.*, 2006). Finalmente, la capa molecular, donde se localizan las dendritas de las células de Purkinje en condiciones normales, sufre una reducción significativa de su espesor, aunque continúan presentes las células en cesto y las células estrelladas, rodeadas por un alto número de macrófagos y de glía reactiva en la zona (Mullen *et al.*, 1976).

Como consecuencia de la degeneración de las células de Purkinje, en el cerebelo de los ratones mutantes *PCD* tiene lugar una degeneración transneuronal secundaria. Esta degeneración retrógrada afecta a más del 90% de los granos del cerebelo, al menos hasta los 6 meses de edad (Ghetti *et al.*, 1978; Triarhou *et al.*, 1985), muchos de los cuales mueren

por apoptosis (Zhang *et al.*, 1997). Por el contrario, no se aprecia una reducción llamativa en la concentración de células de Golgi tipo II en la capa de los granos (Mullen *et al.*, 1976). La desaparición de las dianas de las aferencias cerebelosas influye también en la muerte celular transneuronal retrógrada de alrededor del 50% de las neuronas del complejo olivar inferior (Ghetti *et al.*, 1987; Shojaeian *et al.*, 1988; Triarhou y Ghetti, 1991), origen fundamental de las fibras trepadoras (Desclin, 1974; Courville y Faraco-Cantin, 1978). Por último, la degeneración anterógrada origina la pérdida del 21% de las neuronas de los núcleos cerebelosos profundos y una reducción en el diámetro de las neuronas supervivientes en un 14%, produciéndose una mayor densidad de empaquetamiento de las neuronas supervivientes y la disminución del volumen de estos núcleos en un 50% (Wassef *et al.*, 1986; Triarhou *et al.*, 1987; Bäurle y Grüsser-Cornehls, 1997; Bäurle *et al.*, 1997; Alcalde, 2003).

Alteraciones citológicas de las células de Purkinje del ratón *PCD*

Los ratones mutantes *PCD* presentan alteraciones ultraestructurales en el desarrollo de las células de Purkinje incluso previas a la degeneración celular. En condiciones normales, los animales silvestres de entre P10 y P12 presentan una gran acumulación de polisomas libres en la parte basal de la célula de Purkinje (masa basal de polisomas) que permanece durante varios días, pero que se desorganiza hacia las dos semanas de edad y se asocia a endomembranas, formando pilas alineadas de cisternas de retículo endoplásmico rugoso (Larramendi, 1969; Landis, 1973). A la tercera semana de vida posnatal, las células van adoptando su forma característica y diversos orgánulos se disponen alrededor del núcleo (Landis y Mullen, 1978). Por el contrario, los ratones mutantes *PCD* de P15 (antes del comienzo de los síntomas de ataxia) retienen aún la masa basal de polisomas, y presentan menos cisternas de retículo endoplásmico rugoso (Landis y Mullen, 1978). En algunos casos se han observado prolongaciones de retículo endoplasmático rugoso convergiendo en una cisterna central dilatada y carente de polisomas (Landis y Mullen, 1978). Esta configuración inusual del retículo endoplásmico rugoso es normal en las células de Purkinje inmaduras. Sin embargo, y al igual que la masa basal de polisomas, se mantiene anormalmente en las células de Purkinje de los ratones mutantes *PCD* hasta su completa degeneración. Lo que sí parece ser exclusivo de las células de Purkinje del mutante *PCD* es la existencia de cisternas de retículo endoplásmico dilatadas y sin polisomas, que se continúan con retículo endoplásmico rugoso (Landis y Mullen, 1978). Todos estos cambios ultraestructurales observados inicialmente en el sistema de endomembranas han sido corroborados, a nivel celular y molecular, con el trabajo publicado por Kyuhou y colaboradores en 2006. En este artículo se describe la implicación del estrés asociado al

retículo endoplasmático en los procesos neurodegenerativos que tienen lugar en las células de Purkinje de ratones mutantes *PCD* (Kyuhou *et al.*, 2006). Finalmente, los somas de las células de Purkinje de animales mutantes *PCD* contienen unas inclusiones citoplasmáticas formadas por gruesos filamentos de material fibrilar condensado sobre una matriz menos densa, denominadas nematosomas (Grillo, 1970). Estos nematosomas se observan con regularidad a partir de P18-P22 y, ocasionalmente, ya desde P15. Estas estructuras no se han observado en ratones normales (Landis y Mullen, 1978).

Alteraciones sinaptológicas de las células de Purkinje del ratón *PCD*

Las células de Purkinje de los ratones mutantes *PCD* de 15 días de vida posnatal parecen haber completado satisfactoriamente la mayor parte de su programa de desarrollo, presentando colaterales axónicas que forman sinapsis (Landis y Mullen, 1978). Del mismo modo, la extensión y características de sus procesos dendríticos parecen normales. Asimismo, las fibras aferentes correspondientes forman y mantienen las sinapsis características con estas células de Purkinje. Los axones de las células en cesto sinaptan sobre los somas de las células de Purkinje, mientras que los axones de las células estrelladas han formado contactos en el tronco de las dendritas principales. Tanto las fibras trepadoras, que discurren por las ramas de las dendritas principales, como las fibras paralelas sinaptan normalmente en las espinas dendríticas de las células de Purkinje (Landis y Mullen, 1978).

A los 18 días de vida posnatal, las espinas dendríticas de las células de Purkinje de ratones mutantes *PCD* carecen de elemento pre-sináptico y están envueltas por procesos gliales. Sin embargo, muchas de las espinas presentan engrosamientos en la membrana que asemejan elementos postsinápticos (Hirano y Dembitzer, 1973; Rakic y Sidman, 1973; Landis y Mullen, 1978; Alcalde, 2003). Hay que destacar que, en condiciones normales, las células de Purkinje más maduras presentan diferenciaciones de membrana idénticas a elementos postsinápticos, que se encuentran enfrentados a procesos gliales o a fibras paralelas, pero no a axones inhibitorios (Landis *et al.*, 1974; Sotelo, 1975; Landis y Mullen, 1978). Las fibras paralelas que están junto a estos engrosamientos de la membrana de las dendritas parecen sinaptar directamente sobre la base de los troncos dendríticos. Estas sinapsis aberrantes, no observadas en los animales silvestres, se mantienen hasta que la célula ha degenerado completamente (Landis y Mullen, 1978).

Ensayos para subsanar la pérdida de las células de Purkinje del ratón mutante PCD

El ratón mutante *PCD* se ha empleado como modelo para el estudio tanto de la muerte neuronal como de la recuperación anatómica y funcional. La mayoría de las investigaciones dirigidas a la recuperación funcional se han centrado en diferentes formas de trasplante de células cerebelosas inmaduras en el cerebelo de ratones *PCD* una vez ocurrida la degeneración de las células de Purkinje. No obstante, también se han desarrollado estudios dirigidos a intentar bloquear directamente el proceso de neurodegeneración (Wang y Morgan, 2007). Es importante destacar que este tipo de estudios relacionados con la recuperación funcional de los ratones mutantes *PCD* se han centrado en los procesos degenerativos relacionados con el cerebelo, pero no en otras regiones que también se encuentran afectadas por la mutación, como es el caso del BO.

Estudios de trasplantes

El trasplante de células cerebelosas inmaduras en el cerebelo de animales mutantes *PCD* jóvenes constituye un método potencial no sólo para reemplazar células de Purkinje, sino también para prevenir o minimizar la subsecuente degeneración neuronal secundaria en el cerebelo (granos) y en el complejo olivar inferior (Chang y Ghetti, 1993). Varios trabajos han mostrado cómo el trasplante de primordios de cerebelo de ratones silvestres en ratones mutantes *PCD*, bien como suspensiones celulares (Sotelo y Alvarado-Mallart, 1986; Chang y Ghetti, 1993; Triarhou *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1996), bien como implantes sólidos (Sotelo y Alvarado-Mallart, 1987a, b), pueden redimir características del fenotipo *PCD*. Por ejemplo, algunas células de Purkinje perdidas pueden ser reemplazadas por células que migran desde el primordio cerebeloso trasplantado hasta su posición adecuada en el cerebelo hospedador. Una vez allí, reciben contactos sinápticos desde neuronas adultas del receptor, presentando interacciones y propiedades moleculares similares a las que tienen lugar durante el desarrollo normal (Sotelo y Alvarado-Mallart, 1987a, b; Zhang *et al.*, 1996; Wang y Morgan, 2007). Además, a pesar de que en el cerebelo de un animal silvestre existen alrededor de 200.000 células de Purkinje, en los experimentos de trasplantes tan solo unas 3.000 fueron suficientes para mejorar considerablemente la función motora, aunque en ningún caso llegaron los animales trasplantados a presentar parámetros motores similares a los de un ratón silvestre (Triarhou *et al.*, 1995; 1996; Zhang *et al.*, 1996).

Estudios para prevenir la neurodegeneración

Los estudios dirigidos a intentar prevenir el proceso de degeneración de las células de Purkinje en ratones *PCD* se han llevado a cabo mediante dos vías de aproximación. Por un lado, se han aplicado agentes neuroprotectores tanto *in vivo* como *in vitro*. *In vivo*, se realizaron implantes de microsferas de factor de crecimiento insulínico de tipo 1 (IGF-I, del inglés *Insulin-like Growth Factor-1*), que presenta propiedades neuroprotectoras (Carro *et al.*, 2001), consiguiéndose una mejoría de la coordinación motora durante el tiempo en que se mantenía la terapia (Carrascosa *et al.*, 2004). *In vitro*, se llevaron a cabo cultivos organotípicos de corteza cerebelosa de ratones mutantes *PCD* de P0 con mifepristona (esteroide sintético, también conocido como RU486), y se observó una reducción en la muerte de las células de Purkinje durante las 4 semanas en las que se mantuvo el cultivo (Ghoumari *et al.*, 2003).

Otro intento de prevenir la degeneración cerebelosa en el ratón *PCD* implica la manipulación genética de las vías de muerte celular en un fondo genético *pcd*, que, si bien no han resultado concluyentes, sí han aportado nuevos datos sobre el papel de distintas moléculas implicadas en la ruta de señalización que tiene lugar ante los diferentes procesos neurodegenerativos que acontecen en el cerebelo de este animal (Wang y Morgan, 2007).

Efectos de la mutación *pcd* en el bulbo olfatorio principal

El bulbo olfatorio principal es una estructura laminada que presenta una distribución ordenada de sus tipos neuronales y de sus circuitos sinápticos (Greer y Halász, 1987). Su estructura básica es común para todos los vertebrados (Ramón y Cajal, 1911), aunque existen variaciones a lo largo de la escala filogenética (Allison, 1953).

La formación del BO en el ratón comienza alrededor del día embrionario 12 (E12), cuando los axones de las neuronas receptoras olfatorias llegan a las vesículas telencefálicas en desarrollo (López-Mascaraque y de Castro, 2002). El contacto estimula un pequeño crecimiento desde el telencéfalo rostral que originará el primordio del bulbo olfatorio, y parece inducir el inicio de la neurogénesis en la zona ventricular (Farbman, 1992; Gong y Shipley, 1995). Los diferentes tipos celulares del BO se originan secuencialmente comenzando por los de mayor tamaño, y son las neuronas de proyección primaria –células mitrales y empenachadas– las primeras en diferenciarse (Hinds, 1968). Las pequeñas interneuronas del bulbo –granos y células periglomerulares– tienen una aparición más tardía (Hinds, 1968; Rosselli-Austin y Altman, 1979; Bayer, 1983; Kaplan *et al.*, 1985) que continúa durante toda la

vida del animal. La adición posnatal de interneuronas y glía provoca un aumento del 85% del tamaño del BO en el ratón durante las 3 primeras semanas de vida (Farbman, 1992).

Organización del bulbo olfatorio principal

La capa más superficial del BO es la capa del nervio olfatorio (CNO), que contiene los axones amielínicos procedentes de las neuronas receptoras olfatorias rodeados por células gliales y sus prolongaciones (Ramón y Cajal, 1911; Pinching y Powell, 1971). Por debajo de la CNO se encuentra la capa glomerular (CG), formada por unidades funcionales independientes denominadas glomérulos (Figura 2). Los glomérulos son estructuras esferoidales ricas en neuropilo rodeadas por una cápsula de pequeñas neuronas (células periglomerulares) y células gliales. Los axones procedentes de las neuronas receptoras olfatorias hacen sinapsis sobre las dendritas apicales de las neuronas de proyección primaria (células mitrales y empenachadas) y sobre dendritas de las neuronas yuxtglomerulares de la capa glomerular: células periglomerulares y células de axón corto, dos tipos de interneuronas, y las células empenachadas externas (Pinching y Powell, 1971). Inmediatamente por debajo de la CG está la capa plexiforme externa (CPE), que presenta una baja densidad celular, con abundancia de neuropilo. Los elementos predominantes en esta capa son dendritas de células mitrales, de células empenachadas y de granos (Macrides y Schneider, 1982; Mori *et al.*, 1983; Orona *et al.*, 1984). Los principales tipos neuronales en este estrato son las células de Van Gehuchten y las células empenachadas medias e internas (Kosaka *et al.*, 1994; Shipley *et al.*, 1995; 1996). Las células empenachadas son, junto con las células mitrales, las encargadas de transmitir la información olfatoria a otras regiones cerebrales fuera del BO (Schönfeld y Macrides, 1984; Recio *et al.*, 2007). Las células mitrales son las principales neuronas de proyección del BO y sus somas se encuentran formando una monocapa, la capa de las células mitrales (CCM), situada a mayor profundidad que la CPE (Shepherd, 1972). Justo por debajo de la CCM se sitúa la capa plexiforme interna (CPI), que es una delgada capa con baja densidad de cuerpos celulares y con mayor densidad de axones y dendritas. La CPI contiene axones de células mitrales y de células empenachadas, dendritas de granos y axones procedentes de centros superiores (Shipley *et al.*, 1986; McLean y Shipley, 1987a, b; McLean *et al.*, 1989). A continuación se localiza la capa de los granos (CGr), que es la capa más extensa del BO. Contiene un gran número de pequeñas neuronas anaxónicas (Ramón y Cajal, 1911; Shipley *et al.*, 1996), entre las que discurren axones mielínicos. En esta capa, así como en la CPI y en la CCM, hay otras interneuronas denominadas células profundas de axón corto. Su soma es de tamaño intermedio entre granos y células mitrales, y se pueden dividir

en varios tipos según su morfología y situación: las células horizontales y verticales de Cajal, las células de Blanes y las células de Golgi son los grupos más abundantes (Ramón y Cajal, 1911; Price y Powell, 1970; Pinching y Powell, 1971; Schneider y Macrides, 1978; Kosaka *et al.*, 1994). Por último, encontramos la capa más profunda del bulbo olfatorio, que ha sido denominada de diversas maneras: sustancia blanca periependimaria o zona subependimal del bulbo olfatorio (SBPE; Figura 2). Por ella transcurren gran parte de las fibras aferentes y eferentes del bulbo olfatorio que, junto con la sustancia blanca dispersa en la capa de los granos, convergen para formar el tracto olfatorio lateral en la zona caudal de este órgano (Price y Sprich, 1975; Willey *et al.*, 1983; Recio *et al.*, 2007).

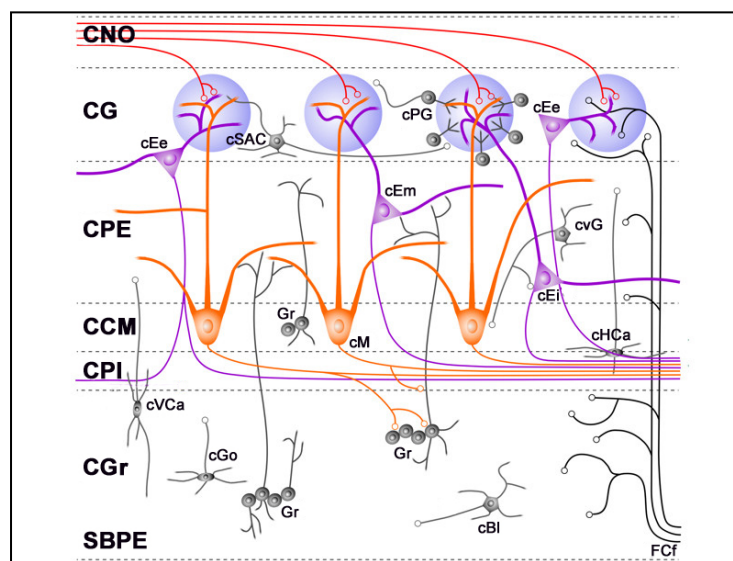


Figura 2. Organización laminar del bulbo olfatorio. cBl: célula de Blanes. CCM: capa de células mitrales. cEe: célula empenachada externa. cEi: célula empenachada interna. cEm: célula empenachada media. CG: capa glomerular. cGo: célula de Golgi. CGr: capa de los granos. cHCa: célula horizontal de Cajal. cM: célula mitral. CNO: capa de fibras del nervio olfatorio. CPE: capa plexiforme externa. CPI: capa plexiforme interna. cPG: célula periglomerular. cSAC: célula superficial de axón corto. cVCa: célula vertical de Cajal. cvG: célula de van Gehuchten. FCf: fibras centrífugas. Gr: grano. SBPE: sustancia blanca periependimaria. Esquema modificado de Puche, 2003 (<http://www.apuche.org/OIA/>).

Neurodegeneración en el bulbo olfatorio principal

Los ratones mutantes *PCD* de menos de 2 meses de edad presentan una organización sináptica y celular normal del BO (Greer y Shepherd, 1982). Sin embargo, aproximadamente a los 60 días posnatales comienza un periodo acelerado de pérdida de las células mitrales que dura hasta, aproximadamente, los 90 días posnatales. No se han observado efectos directos sobre otras poblaciones neuronales del BO (Greer y Shepherd, 1982). Durante este periodo degeneran más del 75% de las células mitrales. El 25% restante se pierde más lentamente entre los 90 y 120 días (Greer y Halász, 1987; Baker y Greer, 1990). Las

escasas células mitrales supervivientes quedan agregadas en pequeños grupos (Greer y Shepherd, 1982).

A pesar de la pérdida de las células mitrales, no se observan alteraciones aparentes en la capacidad de las neuronas receptoras olfatorias para responder a olores de forma normal (Greer y Shepherd, 1982). Con el método de la 2-desoxiglucosa (Kennedy *et al.*, 1975; Stewart *et al.*, 1979) no se han apreciado diferencias entre ratones mutantes y silvestres, de 8 meses de edad, en los patrones de distribución de las aferencias de las neuronas receptoras olfatorias a los glomérulos, tras la exposición a acetato de amilo (Greer y Shepherd, 1982). Esta integridad del epitelio olfatorio en los ratones *PCD* hace posible la interacción sináptica funcional entre las neuronas receptoras olfatorias y las células de proyección supervivientes.

En los ratones mutantes *PCD* se observa la pérdida selectiva de las células mitrales sin que exista una degeneración aparente de la población de células empenachadas, lo que sugiere diferencias en los determinantes genéticos de estos dos tipos neuronales (Greer y Shepherd, 1982). Las células empenachadas aparecen en número y morfología normal en la CPE de los ratones *PCD* (Greer y Shepherd, 1982). Como consecuencia de este proceso degenerativo tan específico, varias poblaciones neuronales del bulbo olfatorio principal quedan privadas de sus conexiones sinápticas con las células mitrales: las células periglomerulares de la CG, las interneuronas de la CPE y los granos de la CGr. Esta degeneración afecta tanto a la integración sináptica de la información olfatoria a nivel glomerular como a las capas inframitrales. Paralelamente, tiene lugar un proceso de reorganización sináptica durante el cual las células denervadas establecen nuevos circuitos sinápticos heterólogos con las neuronas de proyección persistentes (Greer, 1987a, b; Greer y Halász, 1987).

En lo que respecta a la organización de las capas del BO del mutante *PCD* sólo se observan cambios relacionados con su tamaño. El tamaño de los glomérulos de los ratones mutantes se reduce respecto al de los animales silvestres. La disminución del diámetro del glomérulo refleja fundamentalmente la pérdida de los penachos de dendritas apicales de células mitrales, que se extienden originalmente en el interior glomerular (Greer y Shepherd, 1982). El cambio más llamativo se presenta en la CPE, ya que su grosor disminuye considerablemente en los individuos mutantes. Las partes proximales de las dendritas apicales y las arborizaciones de las dendritas basales de las células mitrales pueden ocupar, en condiciones normales, hasta un 30% del volumen de la parte más interna de la CPE (Halász *et al.*, 1981). Al disminuir el grosor total de esta capa, la densidad celular aumenta (Greer y Shepherd, 1982). Además, hay un aumento significativo de la densidad de células

gliales como respuesta a la degeneración de las células mitrales (Caviness y Sidman, 1972; Caviness y Rakic, 1978). La CPI del ratón mutante parece más gruesa, aunque tal vez sea sólo por la desaparición de la capa de las células mitrales (Greer y Shepherd, 1982). Los espacios dejados por las células mitrales son ocupados por algunos granos, aunque el número de granos desplazados no es significativamente diferente al encontrado en los individuos normales. La CGr del ratón mutante *PCD* no parece estar muy afectada en su parte media y superficial. Sin embargo, la densidad celular se reduce claramente en su región más profunda (Alcalde, 2003; Valero *et al.*, 2007).

Por último, la desaparición de los axones de las células mitrales conlleva también una degeneración extensa del tracto olfatorio lateral, en el que los axones de las células empenachadas permanecen aparentemente intactos (Mullen *et al.*, 1976; Bartolomei y Greer, 1998; Recio *et al.*, 2007). En los ratones mutantes, el tracto olfatorio lateral presenta un tamaño marcadamente reducido, y los axones persistentes son considerablemente más delgados que la media de los de los animales silvestres (Bartolomei y Greer, 1998; Recio *et al.*, 2007).

Alteraciones en las células mitrales del bulbo olfatorio principal

La mutación *pcd*^H induce en las células mitrales del BO la formación de focos de daño y reparación del ADN, inhibición global de la transcripción, silenciamiento epigenético de los dominios de cromatina, reorganización de los compartimentos nucleares involucrados en el procesamiento del ARN, y modificaciones en la maquinaria de traducción citoplásmica. Estos eventos celulares son reflejo de un estado pre-degenerativo que tiene lugar previamente a los signos citológicos clásicos de muerte celular (Valero *et al.*, 2006; Valero, 2007).

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio se ha demostrado que la muerte de las células mitrales en los ratones *PCD* tiene lugar mediante mecanismos apoptóticos. Esta muerte “controlada” puede contribuir, en cierto modo, a que no se induzca directamente la muerte de otras células adyacentes. Además de esta muerte por apoptosis, la relativa lentitud del proceso degenerativo permite al BO mantener una organización citoarquitectónica normal conservando todas sus capas (Valero, 2007). La muerte de las células mitrales por apoptosis concuerda con la degeneración de las células de Purkinje en los ratones *PCD*, que también conlleva la activación de mecanismos apoptóticos (Kyuhou *et al.*, 2006).

La mutación *pcd*^H induce —o al menos no previene— la acumulación de focos de daño en el ADN en las células mitrales. Esto parece ser debido a la pérdida de expresión del

gen *ma1*. La gran vulnerabilidad de las células mitrales con respecto a las lesiones en el ADN se correlaciona con su alta actividad metabólica y bioeléctrica (Friedman y Strowbridge, 2000; Lowe, 2003; Djurisic *et al.*, 2004; Granados-Fuentes *et al.*, 2004), que requiere una configuración predominantemente “abierta” de la cromatina (eucromatina), haciendo que las células mitrales sean más vulnerables a los agentes que producen daño en el ADN. La formación y acumulación de focos de daño y reparación del ADN en las células mitrales de los mutantes *PCD*, acompañadas de la pérdida progresiva de esta población neuronal, parecen reflejar la incapacidad de estas neuronas para desarrollar una respuesta efectiva capaz de reparar los daños que se producen en su material genético (Valero *et al.*, 2006).

La acumulación de focos de daño en el ADN en las células mitrales de los ratones mutantes *PCD* se ve asociada a procesos de represión transcripcional en estas células y a una disminución en el número de ARNm presentes en el BO de los animales *PCD* (Valero *et al.*, 2006). Asimismo, en relación con esta represión transcripcional, se ha observado la existencia de abundantes y prominentes masas de heterocromatina a nivel ultraestructural (Valero *et al.*, 2006). Paralelamente a estas modificaciones de la cromatina, la mutación *pcd*^{1J} causa la segregación de los componentes nucleolares y la desorganización de los centros fibrilares de las células mitrales (Valero *et al.*, 2006). Estas modificaciones estructurales se asocian con una disfunción grave de la transcripción nucleolar (Puvion-Dutilleul *et al.*, 1992). Además, esta alteración en la biogénesis de los ribosomas se relaciona con la desorganización del retículo endoplasmático rugoso, previamente descrita en las células de Purkinje de los mutantes *PCD* (Landis y Mullen, 1978), y que refleja la existencia de una maquinaria transcripcional deficiente.

Ensayos para subsanar la pérdida de las células mitrales del BO del ratón mutante PCD

A pesar de haberse empleado al ratón mutante *PCD* como modelo animal para el estudio de la muerte neuronal de las células mitrales (Valero *et al.*, 2006), hasta la fecha, no se han realizado estudios para intentar subsanar esta pérdida neuronal. Todos los estudios previos relacionados con la recuperación funcional de los ratones mutantes *PCD* se han centrado en los procesos degenerativos relacionados con el cerebelo (ver apartados anteriores). Así pues, nos encontramos ante el primer intento de subsanar esta pérdida neuronal selectiva en el bulbo olfatorio principal.

Idoneidad del mutante *PCD* en estudios de neurodegeneración

Los ratones mutantes *PCD* ofrecen gran interés como modelos de neurodegeneración, ya que pueden ser considerados totalmente normales en el momento de su nacimiento, evitando, así, mecanismos compensatorios prenatales. Además, la degeneración neuronal tiene lugar en periodos concretos, hecho que permite un conocimiento detallado de los diferentes procesos degenerativos acaecidos a lo largo de su vida. En lo que al estudio de la llegada de CMO al cerebro respecta, y más concretamente al efecto que tiene un microambiente degenerativo sobre este proceso, el ratón mutante *PCD* es un modelo idóneo. La degeneración posnatal selectiva de poblaciones neuronales específicas –células de Purkinje (Mullen *et al.*, 1976; Fernández-González *et al.*, 2002), determinadas neuronas talámicas (O’Gorman y Sidman, 1985; O’Gorman, 1985), células mitrales (Mullen *et al.*, 1976; Bartolomei y Greer, 1998) y fotorreceptores (Mullen y LaVail, 1975; LaVail *et al.*, 1982)–, situadas en regiones encefálicas definidas (cerebelo, tálamo, bulbo olfatorio y retina, respectivamente) y durante periodos de tiempo diferentes y bien delimitados, permite dilucidar el efecto de las distintas etapas de un mismo proceso neurodegenerativo sobre la llegada de las CMO al encéfalo.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La formación de tipos celulares propios de otros tejidos a partir de CMO ha quedado suficientemente demostrada en la bibliografía consultada. En el caso del SNC, la mayoría de los trabajos se han centrado en el estudio del cerebelo, lo que ha determinado que los datos relativos a otras regiones de interés sean escasos, confusos y contradictorios, como es el caso del bulbo olfatorio, en el que se mantiene un aporte continuo de nuevas neuronas a lo largo de toda la vida del animal. Por otro lado, el efecto favorecedor en todo este proceso de un microambiente neurodegenerativo ha sido demostrado únicamente en el cerebelo. Más aún, este concepto se ha estudiado, bien mediante trasplante intracerebelar de CMO en animales con un defecto genético (Bae *et al.*, 2005; 2007), o bien mediante un trasplante intravenoso de CMO en animales en los que previamente se había inducido la degeneración de las células de Purkinje mediante la inyección intraventricular de sustancias tóxicas (Magrassi *et al.*, 2007). La existencia de un modelo neurodegenerativo como el ratón mutante *PCD* permite estudiar la formación de neuronas a partir de CMO en distintas regiones encefálicas y ante diferentes etapas de un mismo proceso degenerativo. Asimismo, al ser una mutación la causante de la neurodegeneración, se evitan los posibles efectos colaterales del uso de sustancias tóxicas para la inducción del daño neuronal, así como las incertidumbres sobre la concentración de sustancias efectivamente recibidas por las distintas poblaciones

neuronales. Por lo tanto, el objetivo general de esta Tesis Doctoral es contribuir al estudio de la llegada de CMO al encéfalo, tanto en condiciones normales como ante un proceso neurodegenerativo posnatal selectivo, consecuencia de una mutación.

Los objetivos concretos de esta Tesis Doctoral son:

1. Establecer las colonias de ratones que permitan llevar a cabo el estudio de la llegada de las células de la médula ósea (CMO) al encéfalo de los animales mutantes *PCD*, y discernir entre eventos de transdiferenciación y de fusión celular de las CMO.
2. Establecer un procedimiento adecuado para llevar a cabo experimentos de trasplantes de médula ósea en animales portadores de la mutación *pcd*^{fl}:
 - 2.1 Establecer la dosis óptima de radiación para conseguir la ablación de la médula ósea de los diferentes animales receptores.
 - 2.2 Analizar las diferencias existentes entre distintos tipos de trasplante (intraperitoneal e intravenoso).
 - 2.3 Poner a punto los diferentes sistemas de visualización de las células trasplantadas.
3. Realizar un estudio comportamental de los animales mutantes *PCD* y analizar posibles diferencias entre los trasplantados con médula ósea “sana” y los que no recibieron ningún trasplante.
4. Realizar un análisis cualitativo de la llegada de CMO al cerebelo y al bulbo olfatorio de los animales trasplantados, tanto de animales silvestres como de animales mutantes *PCD*.
 - 4.1 Analizar su destino y diferenciación neural en estas regiones.
 - 4.2 Establecer el efecto del ambiente neurodegenerativo en este fenómeno.
 - 4.3 Determinar el efecto del trasplante de médula ósea “sana” en las poblaciones de células de Purkinje y células mitrales de animales mutantes *PCD*.

El logro de estos objetivos debe suponer un claro avance hacia un mejor conocimiento de la biología de las células de la médula ósea y de las posibilidades de uso de éstas en las patologías neurodegenerativas.

MATERIAL Y MÉTODOS

En la sección de Introducción hemos realizado una breve recopilación de los trabajos previos que pusieron de manifiesto la llegada de CMO al encéfalo. En todos ellos, la identificación de las CMO del donante en el receptor resultó clave para poder llevar a cabo el estudio. En nuestro trabajo hemos puesto a punto y comparado diferentes técnicas para efectuar esta identificación; cada una de ellas tiene ventajas e inconvenientes que discutiremos más adelante. Por un lado, hemos llevado a cabo el trasplante de médula ósea de animales CRE-GFP en receptores R26R, hecho que nos ha permitido identificar las células del donante siguiendo su fluorescencia (células GFP) y conocer, además, si se han producido eventos de fusión celular. Por otro lado, hemos realizado el trasplante de médula ósea de animales macho en receptores hembra, identificando las células del donante mediante marcaje específico del cromosoma Y. Así pues, para poder poner en marcha nuestros experimentos, el primero de los pasos que tuvimos que dar fue establecer las diferentes colonias de animales que iban a ser utilizadas en el estudio. La primera de ellas fue la colonia *PCD*, que se caracteriza por presentar la mutación *pcd*^{fl}. Las siguientes colonias fueron la colonia *PCD*-R26R y la colonia CRE-GFP. La primera de estas dos se originó con el objetivo de poder obtener animales receptores R26R que presentasen la mutación *pcd*^{fl}; y la segunda, con el de poder obtener animales donantes CRE-GFP. Finalmente, se estableció la colonia de animales *PCD*-(CRE-GFP) para poder obtener animales mutantes *PCD* con las caracte-

rísticas de los animales CRE-GFP. Todas estas colonias se encuentran descritas en detalle en sus correspondientes apartados. Una vez establecidas las colonias de las que obtener los animales donantes y receptores apropiados para el estudio, pudimos comenzar con los experimentos de trasplantes de médula ósea. Estos experimentos conllevan una serie de pasos que comienzan con la eliminación de la médula ósea de los animales receptores, en nuestro caso mediante irradiación. Debido a la fragilidad de los animales mutantes *PCD*, fue necesario ajustar la dosis de radiación para conseguir no sólo una destrucción completa de la médula ósea propia, sino también la supervivencia del animal trasplantado. A continuación, se lleva a cabo el trasplante propiamente dicho, que puede realizarse de forma intravenosa o intraperitoneal, y del que se obtiene un animal quimera, caracterizado por poseer una médula ósea cuyas células, y las derivadas de éstas, son identificables frente al resto de células del animal. Esos animales son sometidos a una serie de pruebas fisiológicas y de comportamiento, para ver si existe alguna mejoría de la capacidad motora de los animales *PCD* tras el trasplante. Finalmente, sus encéfalos son analizados neuroquímicamente y procesados en busca de CMO que hayan podido llegar tanto al cerebelo como al BO. Los resultados obtenidos son comparados entre los diferentes grupos experimentales. En la figura 3 se presenta un resumen general del diseño de nuestro estudio experimental.

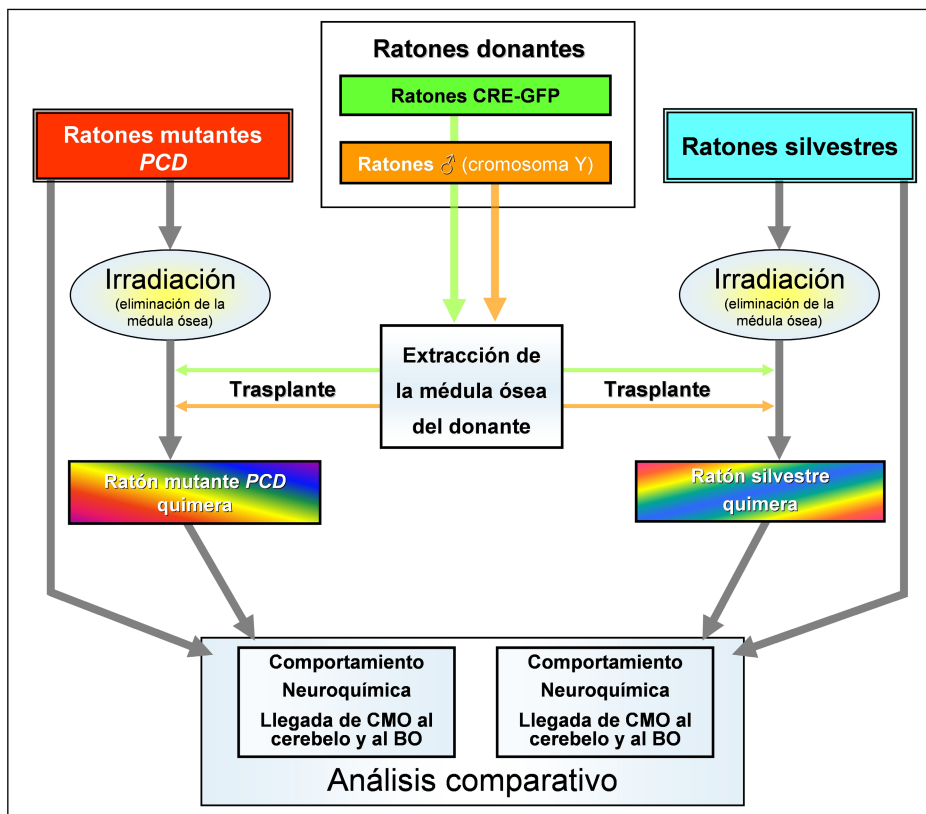


Figura 3. Esquema del proceso experimental seguido en la presente Tesis Doctoral.

Animal de experimentación

El animal de experimentación empleado para la realización del presente trabajo fue el ratón *Mus musculus* L. 1758 (Muridae, Rodentia, Mammalia), de las estirpes C57BL/6J, DBA/2J y BALB/c-Tg(CMV-cre)1Cgn/J, todas procedentes de los Laboratorios Jackson, Bar Harbor, EE. UU. Se emplearon animales provenientes del cruce de algunas de estas estirpes entre sí: C57BL/6J con DBA/2J y C57BL/6J con BALB/c-Tg(CMV-cre)1Cgn/J, así como animales descendientes de esos dos cruces entre sí: (C57BL/6J x DBA/2J) con (C57BL/6J x BALB/c-Tg(CMV-cre)1Cgn/J). Las distintas colonias establecidas para la realización de esta Tesis Doctoral fueron generadas y mantenidas en el Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Salamanca y en el animalario del Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia, a partir de cruzamientos que detallaremos más adelante en los apartados correspondiente dedicados a cada una de las colonias.

Los animales se mantuvieron a temperatura y humedad relativa constantes, con un fotoperiodo artificial de 12 horas, y fueron alimentados *ad libitum* con agua y pienso compuesto para roedores (T2014 Teklad Global 14% Protein Rodent Diet, Oxon, Reino Unido), que en el caso de los mutantes *PCD* tuvo que ser previamente triturado. Todos los animales se manipularon y sacrificaron según las líneas establecidas en la directiva 2003/65/CE del Parlamento Europeo y en la legislación española (RD 1201/2005) vigentes para el uso y cuidado de animales de laboratorio. Todo el procedimiento fue aprobado por el comité de Bioética de la Universidad de Salamanca.

La colonia PCD

La mutación *pcd* empleada en este trabajo es la mutación original, denominada *pcd*^{1J} y que fue transferida a la estirpe C57BL/6J en 1976 (Mullen *et al.*, 1976). Animales de esta estirpe, heterocigotos para la mutación (+/*pcd*), fueron adquiridos en los Laboratorios Jackson (<http://www.jax.org>). Dadas las características especiales de los animales homocigotos para esta mutación (*pcd/pcd*; ver apartado correspondiente en la sección de Introducción), el establecimiento y mantenimiento de la colonia se llevó a cabo mediante cruces entre individuos heterocigotos (+/*pcd*), prácticamente indistinguibles de los silvestres (+/+). El problema con la identificación de los animales heterocigotos (+/*pcd*) se solventó gracias a la colaboración del Dr. Jean-Louis Guénet (Laboratorio de Genética de Mamíferos, Instituto Pasteur de París). Las sugerencias del Dr. Guénet nos ayudaron a la tipificación genética

usando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar los marcadores moleculares adecuados. Para poder llevar a cabo esta identificación del genotipo, se cruzaron ratones macho de la estirpe C57BL/6J heterocigotos para la mutación *pcd*^{1J} con hembras silvestres de la estirpe DBA/2J. Mediante estos cruces se consiguió asociar el alelo *pcd*^{1J} al fondo genético del cromosoma 13 de la estirpe C57BL/6J, mientras que el alelo silvestre se asoció al fondo genético del cromosoma 13 de la estirpe DBA/2J. El establecimiento de esta nueva colonia *PCD* (C57BL/6J x DBA/2J) permite tipificar genéticamente los animales originados, gracias a la segregación diferencial de los alelos. Además, debido a las características reproductivas propias de la estirpe DBA/2J se logró que la estirpe “híbrida” resultante fuese más prolífica que la estirpe portadora de la mutación originalmente (C57BL/6J).

Identificación de los animales

La mutación *pcd*^{1J} 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 consisten en mono-, di-, tri- y tetranucleótidos repetidos en tándem, abundantes por todo el genoma eucariota. También conocidos como SSR (del inglés *Short Sequence Repeat*) o repetición de secuencias discretas; son, además, muy polimórficos, por lo que se utilizan como marcadores moleculares intraespecíficos. En nuestro caso, se eligieron como marcadores dos regiones microsatélite presentes tanto en la estirpe C57BL/6J, portadora de la mutación, como en la estirpe DBA/2J. Los microsatélites debían ser polimórficos entre ambas estirpes, de modo que su tamaño en número de pares de bases (pb) fuese lo suficientemente diferente entre las dos estirpes como para hacerlos distinguibles al separarlos mediante electroforesis en un gel de agarosa. Dichos fragmentos debían estar, además, lo suficientemente cercanos a la región portadora de la mutación *pcd*^{1J} como para asegurar su transmisión ligada en una probabilidad elevada, de manera que pudiésemos suponer la ausencia de recombinación entre la región portadora de la mutación y el marcador. Los microsatélites elegidos bajo estas características fueron D13Mit250 y D13Mit283. El primero de ellos es un fragmento de 130 pb en los ratones de la estirpe C57BL/6J, mientras que está formado por 116 pb en la estirpe DBA/2J. El segundo es un fragmento de 114 pb y 136 pb en las estirpes C57BL/6J y DBA/2J, respectivamente. Se utilizaron ambos marcadores para asegurarnos de que su localización no se veía afectada por fenómenos de recombinación a lo largo de las generaciones.

Extracción de ADN

El ADN para la tipificación genética se extrae a partir de una muestra de tejido de la cola de los ratones, tomada en torno a la primera semana de vida posnatal, tras su correspondiente marcado e identificación individual. Para la obtención del ADN se homogeneiza el tejido en un baño a 55 °C durante una noche utilizando proteinasa K (16,4 U/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, EE. UU.) diluida en un tampón de lisis que contiene 0,2% (p/v) de dodecil sulfato sódico (SDS, del inglés *Sodium Dodecyl Sulphate*), tampón Tris 0,1 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 agua destilada tratada con dietilpirocarbonato (H₂O_{DEPC}, Sigma-Aldrich). A la mañana siguiente, tras resuspender el homogeneizado, se centrifuga durante 2 min a 13.200 revoluciones por minuto (rpm), y se separa el sobrenadante, al que se añade un volumen equivalente de isopropanol (Prolabo, Fontenay-sous-Bois, Francia), y se agita suavemente. A continuación, centrifugamos de nuevo durante 10 min a 13.200 rpm y eliminamos el sobrenadante. El ADN precipitado se lava con etanol 70% (v/v) y, tras resuspender, se vuelve a centrifugar durante 10 min a 13.200 rpm. Por último, el ADN se resuspende en 50 µl de H₂O_{DEPC}. Todos los pasos se realizan a temperatura ambiente (TA).

PCR

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa, o PCR, permite obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN determinado a partir de muy poca cantidad de ADN original, en un corto periodo de tiempo (Mullis *et al.*, 1986). Para la puesta a punto de un protocolo para la realización de la PCR con los marcadores D13Mit250 y D13Mit283 se utilizaron los cebadores propuestos en las siguientes páginas web de los Laboratorios Jackson: <http://www.informatics.jax.org/searches/probe.cgi?38700> y <http://www.informatics.jax.org/searches/probe.cgi?41581>. En la Tabla 1 se recogen las secuencias de los dos cebadores correspondientes a cada uno de los dos marcadores.

| Marcador D13Mit250 | Secuencia | Marcador D13Mit283 | Secuencia |
|--------------------|------------------------------------|--------------------|--------------------------------|
| <i>Cebador 1</i> | 5'-ACACTCATTTC ATGCACGA-3' | <i>Cebador 1</i> | 5'-GGAAGCAGT CTCCTGCCTC-3' |
| <i>Cebador 2</i> | 5'-AGGTCCTCAAAT CTCACAAGTAGG-3' | <i>Cebador 2</i> | 5'-GAGAGGTGG CACATGAGGTT-3' |

Tabla 1. Secuencias de los cebadores empleados para genotipar la mutación *pcd*^U.

El medio para la realización de esta PCR contiene: tampón comercial de la Taq polimerasa (1x, Promega, Madison, Wisconsin, EE. UU.), desoxinucleótidos (0,2 mM, Promega), Taq polimerasa (0,125 U/ μ l Promega), dimetilsulfóxido (DMSO; 5%), Cl_2Mg (1,5 mM), cebadores (2,5 μ M; cada uno), ADN (entre 100 y 500 ng de muestra) y $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$. Como control positivo se incluye siempre una muestra de ADN de cada uno de los tres genotipos posibles (+/+ , +/*pcd* y *pcd/pcd*), mientras que como control negativo se utiliza el medio anterior sustituyendo el volumen de ADN por $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$. La PCR de ambos marcadores se lleva a cabo en una termocicladora (Primus, MWG- Biotech, Vernon Hills, Illinois, EE. UU.) con los ciclos de temperatura que se detallan en la siguiente tabla:

| Paso | Tiempo | Temperatura <i>D13Mit250</i> | | Temperatura <i>D13Mit283</i> | |
|------|------------|---------------------------------|-----|---------------------------------|-----|
| 1 | 5 min | 94 °C | | 94 °C | |
| 2 | 1 min | 94 °C | x40 | 94 °C | x40 |
| 3 | 1 min | 54 °C | | 53 °C | |
| 4 | 1 min 30 s | 72 °C | | 72 °C | |
| 5 | 10 min | 72 °C | | 72 °C | |
| 6 | ∞ | 4 °C | | 4 °C | |

Tabla 2. Condiciones de tiempo y temperatura de la PCR para la mutación *pcd*^U.

Electroforesis

Los productos de la PCR de las regiones microsatélites D13Mit250 y D13Mit283, que tienen distintos tamaños en las estirpes C57BL/6J y DBA/2J, se separan mediante electroforesis en un gel de agarosa (MS-8, Pronadisa, Madrid, España) al 3% en tampón Tris-borato-EDTA (TBE) 0,5 X (ver Apéndice), al que se añaden 0,4 μ g/ml de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich). La visualización de las distintas bandas del ADN amplificado se realiza gracias a una lámpara de luz ultravioleta (Gel Doc XR, Bio Rad Laboratories, Barcelona, España). El marcador de peso molecular (Pm) empleado fue el *pBR322 DNA-Msp I Digest* (New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, EE. UU.). Aquellos carriles en los que aparece una sola banda de 130 pb para el D13Mit250 o de 114 pb para el D13Mit283 se corresponden con animales homocigotos para la mutación (*pcd/pcd*), mientras que en los que aparece una única banda de 116 pb para el D13Mit250 o de 136 pb para el D13Mit283 se corresponden con animales homocigotos silvestres (+/+). Por último, los carriles en los

que aparecen dos bandas de diferente tamaño (130 y 116 pb para el D13Mit250, 114 y 136 pb para el D13Mit283) se corresponden con animales heterocigotos (+/*pcd*; Figura 4).

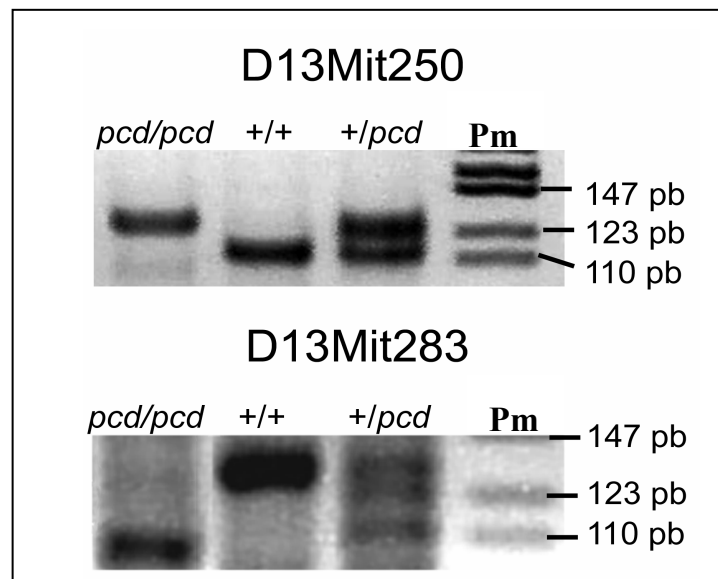


Figura 4. Genotipado de los ratones de la colonia *PCD*. Imágenes de dos geles de agarosa en los que se han resuelto dos PCR para la amplificación de las regiones microsatélites del ADN del ratón D13Mit250 y D13Mit283. Las bandas simples corresponden a homocigotos para la mutación *pcd*^{1J} (*pcd/pcd*) y a homocigotos silvestres (+/+), mientras que las bandas dobles corresponden a animales heterocigotos (+/*pcd*). Pm: marcador de peso molecular en pb.

La colonia *PCD-R26R*

Para poder llevar a cabo la detección de posibles eventos de fusión entre las CMO trasplantadas y células de los animales receptores, se creó una nueva colonia de animales, la colonia *PCD-R26R*. Esta nueva colonia se estableció mediante el cruce de animales heterocigotos (+/*pcd*) de la colonia *PCD*, anteriormente descrita, con animales homocigotos (*lac/lac*) para el gen reportero procariota *LacZ* de la línea R26R (Mao *et al.*, 1999), procedentes del Laboratorio de Regeneración Celular del Centro de Investigaciones Príncipe Felipe (CIPF), que dirige el Dr. Álvarez Dolado. La línea de ratones R26R contiene el gen reportero *LacZ*, pero éste no se expresa a no ser que se produzca la escisión de un codón de “stop” que lo precede, y que se encuentra “floxeado” (Figura 5). Se dice que una secuencia está “floxeada” cuando se encuentra flanqueada por sitios llamados Lox-P, y que son reconocidos por la recombinasa Cre. Así, en presencia de la recombinasa Cre, se produce la escisión del codón de “stop”, permitiendo la expresión del gen reportero *LacZ*, que puede ser fácilmente visualizado (ver más adelante). Los animales R26R carecen de recombinasa Cre, por lo que en condiciones normales no presentan expresión de *LacZ*. Sólo si se ponen en contacto en la misma célula la recombinasa Cre y su diana se podrá visualizar la expre-

sión del gen reportero *LacZ*, demostrándose fehacientemente la fusión celular. Por todo ello, el trasplante de médula ósea procedente de animales que expresan la recombinasa Cre en animales hospedadores R26R permite la detección de los eventos de fusión celular, y constituye, por tanto, un modelo idóneo para el estudio de este proceso.

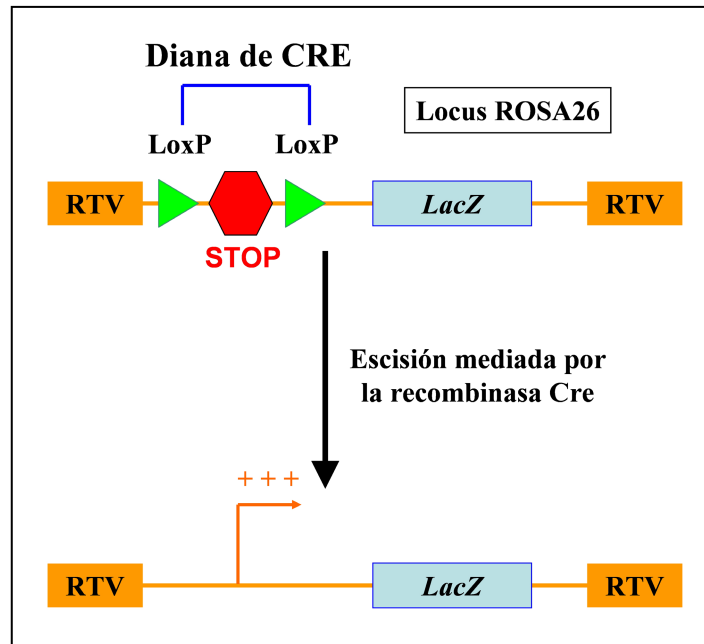


Figura 5. Esquema de la estructura genética para el gen reportero *LacZ* en la línea de ratones R26R. En condiciones normales, el gen reportero *LacZ*, contenido entre las dos secuencias de integración retroviral (RTV), no se expresa debido a la presencia de un codón de “stop” flanqueado por dos sitios Lox-P. La escisión del codón de “stop” llevada a cabo por la acción de la recombinasa Cre permite la expresión del gen reportero *LacZ*

Los ratones originales R26R del laboratorio del Dr. Álvarez Dolado son de la estirpe C57BL/6J, por lo que, para poder mantener nuestro sistema de detección de la mutación *pcd*¹¹, basado en su asociación al fondo genético C57BL/6J, tuvimos que realizar un paso intermedio previo al establecimiento de la nueva colonia *PCD*-R26R. Este paso intermedio, junto con las fases posteriores efectuadas para conseguir el establecimiento de la colonia *PCD*-R26R, los describimos en detalle en la sección de Resultados, ya que permitieron alcanzar el primero de los objetivos planteados para la realización de esta Tesis Doctoral. Así, fruto de un adecuado programa de cruzamientos (incluido también en la sección de Resultados), conseguimos obtener animales $+/pcd-lac/lac$, que son los parentales idóneos para poder mantener la colonia y para poder obtener animales receptores $+/+lac/lac$ y $pcd/pcd-lac/lac$ que permitan afrontar con garantías el análisis de los eventos de fusión en animales mutantes *PCD* y silvestres.

Identificación de los animales

La línea de ratones R26R se caracteriza por presentar el gen reportero *lacZ* en una 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 Friedrich y Soriano (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 (Soriano, 1999; Awatramani *et al.*, 2001; Mao *et al.*, 2001).

Para poder llevar a cabo la identificación de los animales de la línea R26R, tanto de la colonia original como de la colonia *PCD*-R26R, hay que realizar dos PCR de cada uno de ellos: una con cebadores específicos de la región del gen reportero *lacZ*; y la otra con cebadores específicos del locus ROSA26 silvestre, o lo que es lo mismo, sin inserto. Los primeros permiten la amplificación de un fragmento de 280 pb; mientras que los segundos, de un fragmento mucho mayor, de 600 pb, fácilmente distinguibles por electroforesis. Además, en el caso de los animales de la colonia *PCD*-R26R, hay que realizar el genotipado para la mutación *pcd*^{fl}, que hemos descrito anteriormente en el apartado correspondiente a la colonia *PCD*.

PCR

El ADN utilizado en el genotipado de estos animales se extrae siguiendo el mismo procedimiento que hemos descrito anteriormente para la colonia *PCD*. Para el desarrollo de las dos PCR que permiten reconocer el gen reportero *lacZ* se utilizan dos parejas de cebadores. Los cebadores específicos del locus ROSA26 silvestre utilizados son dos de los propuestos en la página web de los Laboratorios Jackson: (http://jaxmice.jax.org/pub/cgi/protocols/protocols.sh?objtype=protocol&protocol_id=433). Los cebadores específicos de la región del gen reportero *lacZ* fueron proporcionados por el Dr. Álvarez Dolado. En la Tabla 3 se recogen las secuencias de los dos cebadores correspondientes a cada uno de los dos posibles tipos de genotipos.

| Genotipo Silvestre | Secuencia | Genotipo <i>lacZ</i> | Secuencia |
|----------------------|---------------------------------|----------------------|--------------------------------------|
| <i>Cebador R26F2</i> | 5'-AAAGTCGCTCTG AGTTGTTAT-3' | <i>Cebador LacB1</i> | 5'-GCTGGGATCCGC CATTGTCAGACATG-3' |
| <i>Cebador R523</i> | 5'-GGAGCGGGAGAA ATGGATATG-3' | <i>Cebador LacF1</i> | 5'-GCTGGAATTCCG CCGATACTGAC-3' |

Tabla 3. Secuencias de los cebadores empleados para genotipar la línea de ratones R26R.

El medio para la realización de esta PCR contiene: tampón comercial de la Taq polimerasa (1x, Promega) desoxinucleótidos (0,2 mM, Promega), Taq polimerasa (0,1 U/ μ l, Promega), Cl₂Mg (1,5 mM), cebadores (0,5 μ M; cada uno), ADN (entre 100 y 500 ng de muestra) en H₂O_{DEPC}. Como control positivo se incluye siempre una muestra de ADN de cada uno de los tres genotipos posibles para el gen reportero *lacZ*; silvestre (-/-), heterocigoto (*lac*/-) y homocigoto para el gen *lacZ* (*lac*/*lac*); mientras que como control negativo se utiliza el medio anterior sustituyendo el volumen de ADN por H₂O_{DEPC}. La PCR se lleva a cabo con el mismo programa de ciclos de temperatura para ambos genotipos, recogido en la siguiente tabla (Tabla 4).

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

Tabla 4. Condiciones de tiempo y temperatura de la PCR para la línea de ratones R26R.

Electroforesis

Para comprobar el tamaño del producto de la reacción de PCR, éste se somete a una electroforesis en un gel de agarosa (Pronadisa) al 1,5% en TBE 0,5 X con 0,4 μ g/ml de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich). El marcador de Pm utilizado en este caso es el PhiX 174 DNA /Hae III (Promega). Los animales homocigotos presentaron una única banda, de unas 600 pb en el caso de los silvestres (-/-), y de unas 280 pb en el caso de los animales *lacZ* (*lac*/*lac*). Los animales heterocigotos (*lac*/-) presentaron ambas bandas (Figura 6).

La colonia CRE-GFP

Para poder completar la identificación de los posibles eventos de fusión, y poder discernir también si las CMO que llegan al encéfalo siguen procesos de fusión celular o de transdiferenciación, se originó una nueva colonia de animales, la colonia CRE-GFP, de la

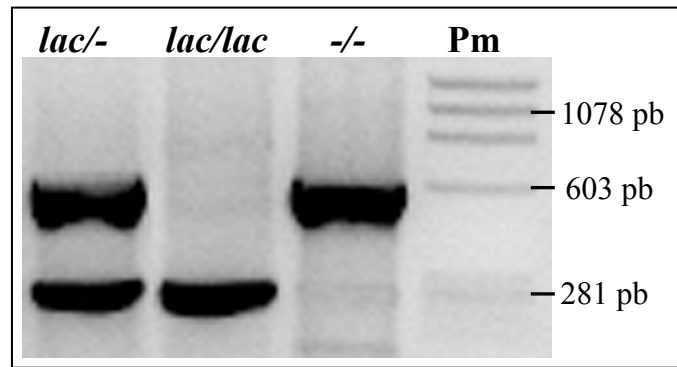


Figura 6. Fotografía de las bandas obtenidas al realizar la electroforesis del producto de la PCR para el gen reportero *LacZ*. El primer carril corresponde a un animal heterocigoto (*lac*^{-/-}); el segundo a un animal homocigoto para *LacZ* (*lac*^{/lac}); y el tercero, a un animal silvestre (*-/-*). El último carril es el marcador de peso molecular (Pm).

que poder obtener los animales donantes idóneos con los que trasplantar a los animales de la colonia *PCD-R26R*. Los animales de la colonia *CRE-GFP* son seleccionados como donantes, ya que, además de tener sus células fluorescentes –permitiendo una visualización directa de las CMO en el receptor– presentan una expresión de la recombinasa Cre de forma constitutiva. Así, en el caso de producirse algún evento de fusión, la recombinasa Cre (codificada en el núcleo procedente de las células de la médula ósea trasplantada) se sintetizaría en un ambiente celular *R26R*, lo que provocaría la escisión del codón de “stop” y la expresión del gen reportero *lacZ* (Figura 7). Por el contrario, en el caso de desarrollarse procesos de transdiferenciación, y no de fusión celular, observaríamos las células GFP sin expresión del gen reportero *lacZ*.

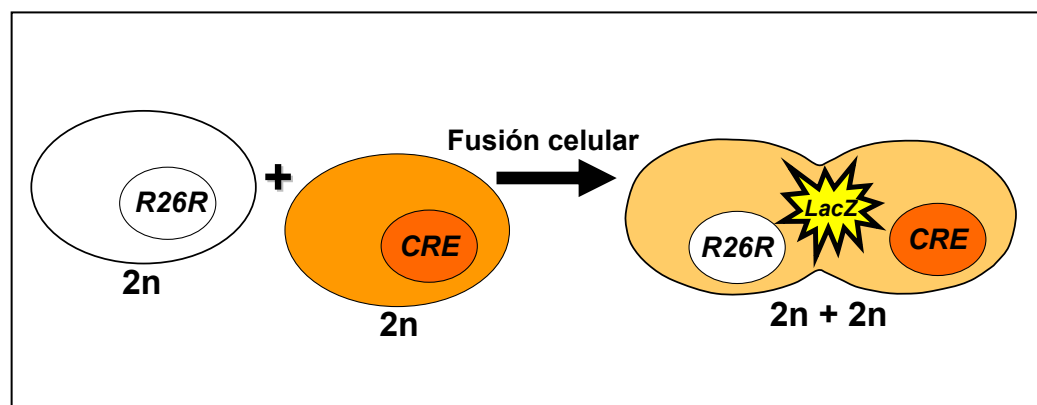


Figura 7. Esquema de un proceso de fusión celular entre una célula *R26R* y una célula *CRE*. La primera de las células contiene el gen reportero *LacZ*, que no se expresa a no ser que se produzca la escisión de un codón de “stop” que lo precede y que se encuentra “floreado”. La célula *CRE* presenta una expresión constitutiva de la recombinasa Cre. Así, ante una fusión entre estos dos tipos celulares, la recombinasa Cre produciría la escisión del codón de “stop” y la expresión del gen reportero *LacZ*.

Como hemos apuntado anteriormente en la Introducción, el gen *lacZ* codifica para la enzima β -galactosidasa que degrada β -galactósidos, como la lactosa o el 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactósido (X-Gal). Por ello, la expresión de *lacZ* puede ser fácilmente visualizada mediante técnicas histoquímicas, aprovechando la actividad de la enzima para degradar el X-Gal o mediante técnicas inmunofluorescentes, empleando anticuerpos contra la enzima β -galactosidasa. Estos sistemas de visualización de la expresión del gen *lacZ* ya se han empleado con éxito previamente en el contexto de demostración de fusión celular (Serkerková *et al.*, 1997; Bex *et al.*, 2002; Álvarez-Dolado *et al.*, 2003; Oh *et al.*, 2003; Chung *et al.*, 2004; Delacour *et al.*, 2004; Jin y Ding, 2006; Naik *et al.*, 2006).

La colonia CRE-GFP se originó también a partir de animales adquiridos en los Laboratorios Jackson. Los animales que contienen el gen de la recombinasa Cre eran de la estirpe BALB/c-Tg(CMV-cre)1Cgn/J. Los animales que sintetizan la GFP eran de la estirpe C57BL/6J. Esta nueva colonia fue establecida mediante un programa adecuado de cruzamientos, que se encuentra detallado en el apartado de Resultados.

Identificación de los animales

La identificación de los animales GFP se realiza bajo el microscopio de fluorescencia a partir de una muestra de tejido de la cola, que posteriormente se aprovecha también para el genotipado del gen de la recombinasa Cre. La proteína GFP, constituida por 238 aminoácidos y cuyo gen fue aislado originariamente de la medusa *Aequorea victoria* Murbach y Shearer, 1902 (Hydroida, Hydrozoa, Cnidaria; Shimomura, 2005), emite bioluminiscencia fluorescente en la zona verde del espectro visible. Es por ello por lo que la observación de una muestra de tejido con luz violeta de 395 nm permite la identificación del fenotipo de animal para esta proteína. Sin embargo, en el caso del gen de la recombinasa Cre, es necesaria la realización de la técnica de PCR para conocer su presencia.

PCR

Para el desarrollo de esta PCR se utilizan las secuencias de cebadores recogidos en la siguiente tabla:

| Cebador | Secuencia | Cebador | Secuencia |
|-----------|----------------------------------|-----------|----------------------------------|
| <i>B1</i> | 5'-GAAAATGCTTCT GTCCGTTTGC-3' | <i>F1</i> | 5'-ATTGCTGTCACT TGGTCGTGGC-3' |

Tabla 5. Secuencias de los cebadores empleados para conocer la presencia del gen de la recombinasa Cre.

El medio para la realización de esta PCR contiene los mismos componentes, con los cebadores correspondientes, que en el caso del genotipado del gen reportero *lacZ*. El ADN utilizado en este caso se extrae siguiendo el mismo procedimiento que hemos descrito en apartados anteriores. El programa de ciclos de temperatura para la termocicladora está recogido en la Tabla 6:

| Paso | Tiempo | Temperatura | |
|------|--------|-------------|-----|
| 1 | 5 min | 94 °C | |
| 2 | 1 min | 94 °C | x35 |
| 3 | 30 s | 55 °C | |
| 4 | 30 s | 72 °C | |
| 5 | 10 min | 72 °C | |
| 6 | ∞ | 4 °C | |

Tabla 6. Condiciones de tiempo y temperatura para la PCR de la recombinasa Cre.

Electroforesis

El producto de la PCR se somete a una electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% en las mismas condiciones que el gel empleado para el genotipado de *lacZ*. El marcador de Pm utilizado en este caso es de BioRad (170-8202, Barcelona, España). Los animales que poseen el gen de la recombinasa Cre presentan la amplificación de un fragmento de 251 pb (Figura 8).

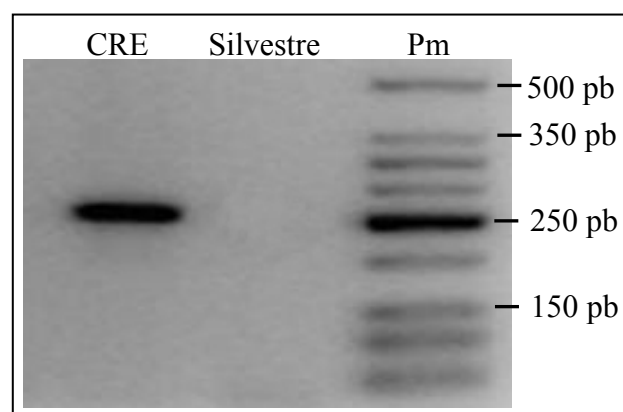


Figura 8. Fotografía del producto de la PCR obtenido para el gen de la recombinasa Cre. El primer carril corresponde a un animal que presenta el gen de la recombinasa Cre. El segundo carril, a un animal que no lo presenta; por lo tanto, no aparece amplificado ningún fragmento. El último carril corresponde al marcador de peso molecular (Pm).

La colonia *PCD*-(*CRE-GFP*)

Finalmente, durante el análisis de los datos obtenidos de los animales mutantes *PCD* trasplantados con médula ósea “sana” nos surgió la necesidad de incorporar un nuevo grupo experimental para futuros trabajos de este tipo. Este nuevo grupo estaría formado por animales mutantes *PCD* trasplantados con médula ósea de otros animales *PCD*, de manera que permitiría aproximarse a las condiciones normales que tienen lugar en un animal *PCD* y al proceso de llegada de CMO al encéfalo de estos animales. Así pues, para poder disponer de animales donantes *CRE-GFP* que, además, tengan la mutación *pcd*¹¹ (*pcd/pcd - cre/cre - gfp/+*), se estableció la colonia *PCD*-(*CRE-GFP*). Este tipo de trasplante lo hemos denominado *homotrasplante*³, y por extensión los trasplantes realizados en este estudio serán denominados como *heterotrasplantes*, para el caso de los animales *PCD* trasplantados con médula ósea “sana”, y *homotrasplante* también, para el caso de los animales silvestres trasplantados con médula ósea de otros animales silvestres.

El establecimiento de esta colonia, *PCD*-(*CRE-GFP*), se realizó mediante cruza- mientos entre animales procedentes de la colonia original *PCD* y de la colonia *CRE-GFP*, teniendo como exigencia prioritaria el mantenimiento del sistema de identificación genética de la mutación *pcd*¹¹. La identificación de los animales originados tras cada uno de los cru- ces realizados se efectuó por separado siguiendo los procedimientos detallados anterior- mente para el genotipado de la mutación *pcd*¹¹ (ver apartado sobre la colonia *PCD*) y para la identificación de los animales de la colonia *CRE-GFP* (ver apartado correspondiente). Co- mo en los casos de las colonias anteriores, todos los trabajos ejecutados para establecer la colonia *PCD*-(*CRE-GFP*) se encuentran detallados en la sección “Resultados” de esta Tesis Doctoral.

Trasplante de médula ósea

En los siguientes apartados, englobados bajo la denominación de “Trasplante de médula ósea”, recogemos todos los pasos que se realizan para poder llevar a cabo dicho proceso experimental. Así pues, comenzamos describiendo el proceso de ablación, o elimi- nación de la médula ósea del animal receptor, necesario para desarrollar este tipo de expe-

³ El homotrasplante propiamente dicho es aquél que se realiza entre individuos de la misma especie consanguíneos. En nuestro estudio hemos utilizado este término para denominar a aquel tipo de trasplante en el que se transfiere la médula ósea de un animal donante a otro animal receptor con el mismo genotipo para la mutación *pcd* (de silvestre a silvestre o de *PCD* a *PCD*).

rimentos. A continuación, hacemos referencia al proceso de extracción de la médula ósea del donante y, finalmente, a su trasplante en los animales receptores, bien mediante inyección intraperitoneal, bien mediante inyección intravenosa.

Ablación de la médula ósea de los animales receptores

Para poder realizar con éxito experimentos de trasplante de médula ósea es necesario llevar a cabo, previa al trasplante, la ablación de la médula ósea propia del animal receptor, para dejar libre el nicho en el que se injertan las células de la médula ósea trasplantada y asegurar la correcta sustitución de la médula del receptor por la del donante. La ablación de la médula ósea puede llevarse a cabo mediante tratamiento con sustancias químicas o mediante irradiación. En nuestro caso, al igual que en la mayoría de los trabajos previos, se ha realizado mediante irradiación de todo el cuerpo del animal con una fuente de radiación ionizante, bien con ^{60}Co , bien con ^{137}Cs . Independientemente del tipo de fuente, en ambos casos tuvimos que poner a punto la dosis óptima de radiación necesaria para conseguir la ablación de la médula ósea de los animales receptores con el menor daño para el animal, lo que hemos denominado **dosis letal mínima**. Con esta terminología, nos referimos a la cantidad mínima de radiación que produce la muerte del animal en ausencia de trasplante de médula ósea. Todos los animales trasplantados fueron irradiados a los 19 días de vida posnatal (P19) y trasplantados dentro de las 24 horas posteriores.

Irradiación con una fuente de ^{60}Co

El ^{60}Co es el radioisótopo más estable del cobalto, y ha sido empleado durante muchos años en radioterapia médica. La utilización de este tipo de fuente en nuestro estudio ha sido posible gracias a la colaboración del Dr. José Luis Rodríguez Fresnadillo, Jefe del Servicio de Radioterapia; del Dr. Manuel Fernández Bordes, Jefe del Servicio de Radiofísica y Protección Radiológica; y de D. Enrique de Sena Espinel, especialista en Radiofísica, todos ellos del Hospital Universitario de Salamanca. El aparato irradiador empleado fue una unidad de teleterapia Theratron-780 (AECL; Kanata, Canadá). La irradiación de los animales se realizó con fotones de 1,25 MeV y una tasa de dosis de $45\text{cGy}^4/\text{min}$. Para poder irradiar de manera uniforme por todo el cuerpo y con la misma dosis a todos los animales, éstos se introdujeron en pequeñas jaulas de metacrilato (que no interfiere en la tasa de ra-

⁴ Gy: gray, unidad del Sistema Internacional que mide la dosis absorbida de radiaciones ionizantes por un determinado material. Un gray es equivalente a la absorción de un joule de energía ionizante por un kilogramo de material irradiado.

diación) diseñadas al efecto, y cedidas para nuestro estudio por el Dr. Ignacio Sánchez-Abarca Bernal, del Servicio de Cultivos y Terapia Celular de la Unidad de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca. La dosis de radiación empleada con este tipo de fuente fue de 7,5 Gy en la línea media del animal, dosis previamente estandarizada por el Dr. Sánchez-Abarca Bernal.

Irradiación con una fuente de ^{137}Cs

El ^{137}Cs es uno de los principales isótopos radiactivos del cesio, y en los últimos años está sustituyendo al ^{60}Co en el tratamiento del cáncer. La fuente de ^{137}Cs utilizada en este trabajo es un equipo de irradiación gamma modelo Gammacell 1000 Elite (MDS Nordion, Ottawa, Canadá), del Laboratorio de Imagen Molecular perteneciente al SEA de la Universidad de Salamanca. Este equipo es capaz de proporcionar una tasa de dosis de 243 cGy/min, con una energía de emisión de 0,662 MeV. En este caso, por tratarse de un equipo nuevo en la Universidad de Salamanca, tuvimos que realizar una serie de pruebas para poder ajustar la dosis letal mínima (ver sección “Resultados”). Finalmente, la dosis seleccionada fue también de 7,5 Gy. A diferencia de la fuente de ^{60}Co , no hubo que utilizar ningún tipo de dispositivo especial para inmovilizar a los animales durante la radiación, ya que se introdujeron directamente en un contenedor específico del propio equipo, que iba girando de forma adecuada con el fin de proporcionar una radiación homogénea.

Tras realizarse el proceso de irradiación, independientemente del tipo de fuente, los animales se mantuvieron separados en un aislador específico para animales inmunodeprimidos del SEA de la Universidad de Salamanca, proceso crítico para evitar su muerte. De hecho, para verificar tanto la eficacia del proceso de radiación como el injerto del trasplante posterior, en todos los experimentos realizados se dejó siempre un animal fuera del aislador, en lo que hemos denominado condiciones “sucias”, y sin trasplante.

Extracción de la médula ósea del donante

La médula ósea que va a ser trasplantada se obtiene a partir de los fémures y de las tibias de animales donantes de más de 4 semanas de edad. Los animales donantes son siempre seleccionados para cada experimento en función del tipo de receptor. Para la extracción de la médula ósea, los donantes se sacrifican por dislocación cervical. A continuación, se limpia la zona de incisión con etanol de 70° (v/v), y se procede al corte de la piel de la parte posterior dorsal del animal, lo que permite acceder a las patas traseras. Las patas se seccionan a la altura de la cadera y del tobillo, y se separan los huesos del resto de los teji-

dos. Los huesos íntegros, sin fisuras ni fracciones, se llevan al interior de una campana de flujo laminar para proceder al lavado medular en condiciones estériles. Hasta el momento de la extracción, se mantienen los huesos en una placa de cultivos con tampón fosfato salino (PBS, *Phosphate Buffered Saline*) estéril 0,1 M, pH 7,4.

La extracción de la médula ósea se realiza mediante la inyección de medio IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium; Invitrogen; Carlsbad, EE. UU.), con ayuda de una jeringuilla de insulina, por ambos extremos del hueso. El lavado óseo se recoge sobre un tubo Falcon® de 50 ml en el que se ha colocado un filtro de 70 µm (BD Falcon; Bedford, Massachusetts, EE. UU.). Una vez extraída la médula ósea de los 4 huesos de un mismo animal, se centrifuga a 1.500 rpm durante 5 minutos y a 4 °C. Tras la centrifugación, se retira el sobrenadante, y nos quedamos sólo con el “pellet”, de color rojo debido a los eritrocitos. A continuación, se añaden 5 ml de solución de lisis de eritrocitos para médula ósea (ver Apéndice), se resuspende y se deja actuar. Al cabo de 5 minutos, se añade PBS hasta 50 ml. En este momento, se toma una alícuota para realizar el recuento del número total de células con una cámara Thoma; mientras, centrifugamos de nuevo en las condiciones anteriores. Finalmente, tras retirar el sobrenadante, se resuspende el “pellet” (ya blanco, sin eritrocitos) en un volumen de PBS, en función del número de células estimadas anteriormente, y teniendo en cuenta que se tienen que trasplantar $7,5 \times 10^6$ células por animal en un volumen máximo de 150 µl.

Trasplante

Una vez realizada la extracción de la médula ósea de los animales donantes, se procede a su trasplante en los animales receptores. Los animales receptores fueron trasplantados al día siguiente de haber sido irradiados (P20).

El trasplante puede llevarse a cabo mediante dos técnicas diferentes: inyección intraperitoneal o inyección intravenosa. Durante todo el tiempo comprendido entre la extracción de la médula ósea del donante y el trasplante, las células se mantienen en frío para su conservación adecuada. No obstante, la viabilidad de las células inyectadas se comprueba siempre después del trasplante mediante el cultivo *in vitro* de parte de las células sobrantes de cada uno de los donantes (ver siguientes apartados).

Vía intraperitoneal

El trasplante de médula ósea mediante inyección intraperitoneal se ha empleado con éxito en algunos trabajos previos (Mezey *et al.*, 2000; Álvarez-Dolado *et al.*, 2003). En

nuestro caso, dado el pequeño tamaño de los animales receptores (P20) y las características especiales de los mutantes *PCD*, inicialmente nos planteamos la realización de trasplantes intraperitoneales. Este tipo de trasplante consiste en la inyección intraperitoneal de las células extraídas con una jeringuilla de insulina de calibre 0,3 mm (30 G), poniendo especial cuidado en que el volumen inyectado no refluya después de retirada la aguja. Para evitarlo, después del pinchazo se mantiene la aguja en el interior del animal durante algunos segundos.

Vía intravenosa

El trasplante de médula ósea mediante inyección intravenosa presenta una serie de ventajas comparado con el realizado por vía intraperitoneal, principalmente relacionadas con la incorporación directa de las células trasplantadas al torrente sanguíneo y, por tanto, con una mayor facilidad para llegar a su destino en los animales receptores. Sin embargo, la inyección intravenosa también presenta los inconvenientes derivados del tamaño del animal. La comparación de ambos procesos la llevaremos a cabo en el apartado de Discusión, de acuerdo con los datos presentados en la sección de Resultados sobre el porcentaje de células del donante incorporadas en los receptores en función del tipo de trasplante.

En este trabajo, la región elegida para llevar a cabo la inyección intravenosa fue una de las dos venas principales de la cola. Para poder realizar el trasplante intravenoso hay que introducir al animal en un dispositivo específico para inmovilizarlo (LE5016, PanLab S.L.; Barcelona, España). Este dispositivo tiene un pequeño orificio que deja libre la cola, la cual se expone a una fuente de calor infrarrojo (InfraCare HP3621, Philips Ibérica; Madrid, España), lo que produce una vasodilatación periférica, favoreciendo así la visualización de los vasos de la cola. Una vez identificadas las venas, el trasplante se realiza introduciendo muy superficialmente la aguja de una jeringuilla de insulina de calibre 30 G en el interior de una de ellas, en dirección distal-proximal. Cuando la aguja alcanza la vena, el émbolo disminuye su resistencia considerablemente, permitiendo una liberación de las células del donante al torrente sanguíneo del receptor. A diferencia del trasplante mediante inyección vía intraperitoneal, en este caso no existen problemas de pérdida de volumen después del trasplante, debido al flujo continuo de la sangre en el mismo sentido de la inyección.

Comprobación de la viabilidad de las células trasplantadas

Puesto que, desde el momento en que se produce el sacrificio del donante hasta que se lleva a cabo el trasplante de las células extraídas al animal receptor, transcurre un tiempo

no inferior a dos horas, se hace necesario un control de viabilidad de las células inyectadas. Para ello, una vez finalizado el trasplante, se cultivan las células restantes, sometidas, por tanto, a los mismos tratamientos que las células inyectadas a los animales receptores.

En nuestro caso, el cultivo de las células de la médula ósea se realiza en una placa multipocillo de plástico estéril en la que se introducen cubreobjetos de plástico específico (Thermanox®). El medio de cultivo empleado está compuesto por el medio IMDM, suero fetal bovino 5% (10106-151, Invitrogen) y penistrepto 100 µg/ml (mezcla comercial de antibióticos Penicilina y Estreptomina; 15140-148, Invitrogen). Se añaden 3 ml de este medio por pocillo y se siembran las células a una densidad de 1×10^6 células/ml. Las células se mantienen en un incubador (Nuairé™ US AUTOFLOW; Plymouth, EE. UU.) a 37 °C y 5% de CO₂ durante una semana, con cambios de medio cada dos días. Coincidiendo con el cambio del medio, se fija uno de los pocillos con paraformaldehído 4% para su tinción posterior con azul de toluidina (ver Apéndice); y otro de los pocillos se trata con Azul Tripán (Invitrogen) al 0,4% en PBS, previamente filtrado, para comprobar la viabilidad celular. El Azul Tripán es un colorante vital que sólo penetra en el interior de las células que presenten daños en su membrana, y que, por tanto, es rechazado por las células vivas. La proporción entre células teñidas y células sin teñir nos da una estimación de la viabilidad celular.

Seguimiento del trasplante

Cuidados especiales de las quimeras

Una vez realizado el trasplante de médula ósea, tanto el intravenoso como el intraperitoneal, los animales receptores —quimeras— se mantienen en el mismo aislador en el que se habían mantenido tras el proceso de irradiación, durante un tiempo mínimo de dos semanas. Transcurrido ese tiempo, las quimeras pueden ser expuestas a lo que hemos denominado anteriormente como condiciones “sucias” sin presentar problemas de supervivencia.

Análisis de la incorporación de las células trasplantadas

El análisis de la incorporación de las células trasplantadas en los animales receptores constituye una aproximación importante al grado de quimerismo conseguido tras el tras-

plante de médula ósea. Un buen injerto de la médula ósea trasplantada en los animales receptores conlleva una mayor capacidad de identificación de las CMO que llegan al encéfalo de los animales receptores. Esto es debido a que cuantas más CMO procedan de la médula ósea del donante, y, por tanto, estén marcadas, mayor probabilidad hay de identificarlas. Además, puesto que uno de los objetivos de nuestro estudio es realizar una aproximación al efecto del trasplante de una médula ósea “sana” en animales mutantes *PCD*, cuanto mayor número de células del donante estén presentes en el animal mutante después del trasplante, mayor capacidad de conocer su efecto tendremos. En nuestros experimentos, este análisis de la incorporación de las células trasplantadas en los animales receptores se lleva a cabo exclusivamente en los animales trasplantados con médula ósea procedente de donantes fluorescentes que, por tanto, permite una visualización rápida y directa mediante citometría de flujo. No se realizó este tipo de análisis en el caso de células procedentes de donantes machos en receptores hembras.

Citometría de flujo de sangre periférica

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular que implica medir las características de dispersión de luz y de fluorescencia que poseen las células, conforme se las hace pasar a través de un rayo de luz. Para su análisis por citometría de flujo, las células deben encontrarse individualizadas en suspensión. A diferencia de las células de tejidos sólidos, que hay que disociarlas previamente, las células sanguíneas pueden analizarse prácticamente de manera directa. El efecto producido por las células en el rayo de luz al atravesarlo permite tener un conocimiento de su tamaño y de su complejidad estructural. Además, si las células se encuentran marcadas con alguna molécula fluorescente, nos permite tener un conocimiento del porcentaje de células que presentan dicho marcador.

En nuestros experimentos, el análisis de la incorporación de las células trasplantadas en los receptores se hizo a partir de sangre periférica. En todos ellos se tomó una muestra de sangre en el momento previo a su sacrificio. Además, en los casos en los que se realizó el estudio del porcentaje de células incorporadas en relación con el tipo de trasplante (intravenoso o intraperitoneal), se tomaron también muestras 2, 4 y 6 semanas después del trasplante, que se corresponden con las edades de P35, P50 y P65, respectivamente. El número de animales empleados en este estudio fue de 4 para cada tipo de trasplante (intravenoso o intraperitoneal) y un control positivo (animal donante CRE-GFP) y un control negativo (animal silvestre de la colonia *PCD-R26R* sin trasplante) como referencia en cada prueba.

La sangre periférica se extrae mediante un pequeño pinchazo en la zona próxima al ojo (plexo supraorbitario) y se recoge en tubos de plástico de 1,5 ml (Eppendorf®), impregnados con heparina (1.000 U/ml de solución salina) para evitar su coagulación. Una vez recogida la sangre, se lisan los eritrocitos con una solución de lisis diferente a la utilizada durante el proceso de extracción de la médula ósea, y que es específica para sangre periférica (ver Apéndice). En este caso, el tiempo necesario para una lisis correcta es de 20 minutos. Todos los pasos de este proceso hay que realizarlos en hielo para evitar la lisis del resto de células sanguíneas. Lisados los eritrocitos, y tras los adecuados lavados con PBS, la muestra con los componentes nucleados de la sangre se lleva a analizar al citómetro de flujo (FACSCalibur, BD; Nueva Jersey, EE. UU.) del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca. Debemos destacar aquí la inestimable ayuda prestada por D. Ángel Prieto Martín (técnico de Citometría del CIC) en la realización de estos experimentos. En todos ellos se utilizó un control positivo (animal donante CRE-GFP) y un control negativo (animal silvestre de la colonia *PCD*-R26R sin trasplante) como referencia para el análisis de los animales trasplantados.

Pruebas fisiológicas y de comportamiento

A las dos semanas de haberse realizado el trasplante (P35; coincidiendo con su salida del aislador para inmunodeprimidos), los animales objeto de estudio se sometieron a diferentes pruebas fisiológicas y de comportamiento para tener una aproximación al efecto funcional del trasplante de una médula ósea “sana” en los ratones mutantes *PCD*. Se formaron 3 grupos experimentales con 4 animales cada uno. Los 3 grupos fueron:

- 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 sin ningún tipo de tratamiento (grupo *Silvestre*).

No se hizo distinción entre machos y hembras (Takahashi *et al.*, 2006). Todos estos animales se sometieron a estas pruebas cada 15 días, las cuales se repitieron un total de 7 veces (P125). A continuación, describimos las diferentes pruebas empleadas en esta parte de nuestro estudio.

Campo abierto

La prueba del campo abierto permite obtener información relacionada con la capacidad motora, con el comportamiento exploratorio y con la reactividad emocional de los

animales analizados. Esta prueba se llevó a cabo introduciendo al ratón en el interior de una caja rectangular de plástico de 50 x 29 cm y 17,5 cm de profundidad, con el piso dividido en 15 cuadros de 9 x 9 cm. Las líneas de separación tienen 1 cm de grosor (Figura 9).



Figura 9. Imagen de la caja en la que se lleva a cabo la prueba de campo abierto.

Inicialmente, el animal fue situado en el centro del rectángulo y observado durante 5 minutos. En este tiempo se contaron el número de líneas que cruzaba, bien con las cuatro patas (*cruces completos*), o bien con sólo dos de ellas (*medios cruces*); el número de veces que se alzaba sobre las patas traseras (*alzadas*); el número de veces que se aseaba (*limpiezas*), y el número de defecaciones que realizaba (*defecaciones*). Transcurrido el tiempo, el animal era devuelto de nuevo a su jaula, y la caja se limpiaba con alcohol de 50% (v/v) para evitar que el siguiente animal estudiado se encontrase bajo la influencia de los olores desprendidos por los animales anteriores. Todas las pruebas se grabaron con una cámara de vídeo situada sobre la caja en la que se hacía el test. El número de *cruces completos* y *cruces medios* aporta, principalmente, información sobre la capacidad motora. Por su parte, el número de *alzadas* y de *limpiezas* es indicativo del comportamiento exploratorio, aunque también está parcialmente relacionado con la capacidad motora y con la reactividad emocional. Finalmente, el número de *defecaciones* es un indicador sencillo del nivel de estrés.

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 sólo 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 se escapase, uno de los lados longitudi-

nales 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.

Análisis neurohistológico

A continuación, recogemos todos los pasos que hemos realizado para poder llevar a cabo el análisis neurohistológico de los animales trasplantados: desde el sacrificio de los animales y el corte del tejido, hasta los diferentes métodos empleados para la identificación de las células del donante en los animales receptores.

Obtención y preparación del tejido

Sacrificio y disección

Con la excepción del grupo de animales silvestres (+/+) que fueron utilizados para buscar poliploidías en el BO y que se dejaron vivir hasta edades muy avanzadas (P300), el resto de los animales fueron sacrificados a 3 edades distintas después del trasplante: P60, P110 y P150. A P60 (40 días después del trasplante), la degeneración en el cerebelo de los animales *PCD* está ya casi concluida; pero en el BO aún no ha comenzado la degeneración de las células mitrales. A P110 (90 días después del trasplante), el BO está en pleno proceso degenerativo. A P150 (130 días después del trasplante), ya casi han concluido ambos procesos degenerativos.

Según los casos, los animales se sacrificaron por dislocación cervical (animales de P300) o por exanguinación (los restantes) tras anestesia intraperitoneal con una solución compuesta por Ketamina (120 µg / gramo peso animal), Valium[®] (19,2 µg / g. p. a.) y Atropina (0,48 µg / g. p. a.). El efecto de la anestesia se comprobó por la ausencia del reflejo palpebral. Los animales se perfundieron a través de la aorta ascendente con una bomba peristáltica con un flujo de 12 ml min⁻¹. Inicialmente, se lavó el árbol vascular con PBS durante 1 minuto, previa inyección intracardiaca de 7 U.I. de heparina sódica. La perfusión se continuó con solución fijadora, seleccionada en función del tipo de técnica a practicar posteriormente. En el caso de realizarse la técnica histoquímica del X-Gal (para identificar eventos de fusión), se utilizaban 40 ml de una solución de paraformaldehído 2% con 0,25% de glutaraldehído en PBS. En el caso de realizarse la hibridación *in situ* del cromosoma Y (para identificar células de donantes machos en receptores hembras), la fijación debía ser mucho más suave, sin glutaraldehído. Hay que destacar aquí que el protocolo recomendado

inicialmente por la Dr.^a Eva Mezey (NIH, Bethesda, EE. UU.) para la realización de este tipo de hibridación *in situ* requería la utilización de tejido fresco. Sin embargo, la ausencia de fijación causa inconvenientes a la hora de realizar algunas técnicas inmunofluorescentes. Es por ello por lo que, para poder combinar ambos procesos (hibridación *in situ* e inmunofluorescencia), hubo que realizar una serie de pruebas hasta conseguir poner a punto un protocolo consenso que resultase en condiciones adecuadas para ambos tipos de técnicas. Con todo ello, tras el lavado del árbol vascular con PBS, se utilizó como fijador el de Zamboni (ver Apéndice) y se emplearon distintos volúmenes (50, 100 ó 150 ml por animal) para poder establecer el volumen de fijador con el que, tanto la hibridación *in situ* como las técnicas inmunofluorescentes, funcionaban correctamente. Además, con el propósito de evitar una exposición prolongada del tejido al fijador, tras el paso de éste por el árbol vascular, se realizó un nuevo lavado con PBS (50 ml), también mediante perfusión intracardiaca.

Tras la perfusión, se diseccionaron los encéfalos y se dividieron en tres bloques (porción rostral, porción central y porción caudal) mediante cortes coronales en los que se empleó una matriz coronal del cerebro de ratón (Electron Microscopy Sciences, Filadelfia, EE. UU.). En la porción caudal se realizó un corte sagital, que permitió dividir el cerebelo en dos partes iguales. Los encéfalos de animales destinados a la técnica histoquímica del X-Gal se mantuvieron en la misma solución fijadora, a TA y en agitación durante 20 min y, posteriormente, se lavaron 3 veces en tampón fosfato 0,1 M pH 7,4 (PB, *Phosphate Buffer*) para eliminar el exceso de fijador. Los encéfalos destinados al resto de técnicas no se posfixaron, por lo que, una vez divididos en esos 4 bloques, se lavaron 3 veces en PBS para eliminar completamente el exceso de fijador. En ambos casos, tras los respectivos lavados, los bloques se sumergieron en una solución crioprotectora de sacarosa al 30% (p/v) en PBS o en PB (según el caso), en agitación y a 4 °C hasta que se hundieron. Algunos bloques se cortaron inmediatamente, pero la mayor parte de ellos se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta el momento de su procesamiento.

Además de diseccionarse los encéfalos, también se extrajeron los ojos, los incisivos inferiores, la lengua, el timo, los pulmones, el corazón, el hígado, el bazo, los riñones, una muestra de músculo esquelético (gastrocnemio) y, en los machos, los testículos de los animales sacrificados. Todos estos órganos siguieron el procesamiento correspondiente según el tipo de perfusión realizada, se crioprotegieron en sacarosa al 30% y se congelaron para su conservación y almacenamiento hasta su futura utilización. En el caso del hígado, que sirvió de control positivo de los eventos de fusión, se seccionó uno de sus lóbulos para ser procesado como control paralelamente al encéfalo correspondiente al mismo animal.

Seccionamiento del tejido

En el caso de animales receptores hembras trasplantados con médula ósea procedente de animales machos (en los que para poder identificar las células del donante hay que realizar la hibridación *in situ* del cromosoma Y), las secciones del encéfalo debían tener un grosor no superior a 14 μm , para permitir una adecuada penetración de la sonda al interior del tejido, por lo que se seccionaron en un criostato (Leica CM 3050S; Wetzlar, Alemania). Este grosor fue establecido tras una serie de pruebas con grosores de 10, 12, 14, 16 y 18 μm (ver sección de Resultados). Para los casos restantes no se requerían secciones tan finas para su procesamiento y visualización, por ello se utilizó un microtomo de congelación (Frigomóvil Jung SM 2000, Leica; Nussloch, Alemania) a 40 μm de grosor.

Independientemente del tipo de seccionamiento, el cerebelo se cortó según planos sagitales, que permiten una visualización completa del árbol dendrítico de las células de Purkinje. Por el contrario, la porción rostral del encéfalo se seccionó según planos coronales.

Corte en criostato

Los encéfalos que se procesaron para llevar a cabo la hibridación *in situ* se seccionaron a 14 μm de grosor, a una temperatura de $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Una vez crioprottegidos, se colocaron sobre el portapiezas del criostato en contacto con nitrógeno líquido, y se encastraron con un medio específico (Tissue-Tek; Sakura, Japón) para este tipo de corte. Todas las secciones se recogieron seriadas directamente sobre 20 portaobjetos, recubiertos de poli L-lisina (Menzel-glaser; Braunschweig, Alemania), de manera que en el portaobjetos número 1 de cada bloque se encontraban las secciones 1, 21, 41, 61, etc.; en el portaobjetos número 2 de cada bloque se encontraban las secciones 2, 22, 42, 62, etc., y así sucesivamente hasta el final de las regiones de interés, constituyendo una muestra representativa de cortes con una separación de 240 μm de cada bloque de tejido. Los portaobjetos con las secciones de tejido se dejaron secar a TA durante dos horas y, a continuación, se almacenaron congeladas a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su procesamiento.

Corte en microtomo de congelación

Los encéfalos de los animales en los que no se iba a realizar la técnica de la hibridación *in situ* del cromosoma Y, y sus correspondientes hígados (controles positivos de eventos de fusión), se seccionaron en un microtomo de congelación a 40 μm de grosor, y a una temperatura que oscilaba entre -23° y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Todas las secciones se recogieron en flotación

en PB y se distribuyeron en series consecutivas. A continuación, se lavaron tres veces durante 10 minutos cada lavado (3 x 10 min) 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 al 0,05% en PB.

Detección de las células del donante en el receptor

En los siguientes apartados, recogemos las diferentes técnicas empleadas para la visualización de las células derivadas en los animales receptores a partir de células procedentes de la médula ósea trasplantada, así como para la identificación de los eventos de fusión. Dividimos este apartado en dos secciones, en función del tipo de donante utilizado en cada caso: donantes CRE-GFP y donantes machos.

Donantes CRE-GFP

En esta primera sección, hacemos referencia a la forma de identificar las células procedentes de donantes CRE-GFP en receptores de la colonia *PCD-R26R*. Este tipo de trasplante se caracteriza porque las células del donante pueden ser fácilmente identificadas en el hospedador, tanto en sangre periférica, como en secciones de tejido. En sangre periférica, nos proporciona una aproximación al grado de incorporación de la médula ósea trasplantada al organismo receptor. En secciones de tejido, nos permite una rápida visualización de las células del donante en los distintos tejidos del receptor. Asimismo, este tipo de trasplante permite caracterizar, en el caso de producirse, los eventos de fusión. No obstante, no todo son ventajas en comparación con el trasplante de donantes machos en receptores hembras, y presenta una serie de inconvenientes que analizaremos posteriormente en el apartado de Discusión. A pesar de la rápida y sencilla identificación de las células del donante (GFP positivas) en los tejidos del receptor, no hemos llevado a cabo la simple visualización directa de las secciones de tejido, sino que siempre la hemos combinado con técnicas de inmunofluorescencia indirecta para intentar también caracterizar neuroquímicamente las células positivas para GFP. Además, puesto que en la mayoría de los casos la señal emitida directamente por la GFP era bastante débil, empleamos como marcador complementario un anticuerpo dirigido contra la propia proteína GFP (ver Tabla 7 y Apéndice) para ampliar la señal y permitir una visualización mejor de las células con origen en la médula ósea trasplantada.

En cuanto a la detección de los eventos de fusión, hay que puntualizar que con las técnicas empleadas no es posible identificar la totalidad de las células originadas a partir de

la médula ósea trasplantada, sino solamente aquellas que han realizado un evento de fusión con células propias del hospedador. Para esta detección de los eventos de fusión, empleamos la técnica histoquímica del X-Gal, que aprovecha la actividad de la propia enzima β -galactosidasa para degradar un cromógeno artificial, el X-Gal.

Inmunofluorescencia indirecta

Para la detección de antígenos, ya fuesen la GFP u otros marcadores propios de determinados tipos neuronales (CB, células de Purkinje del cerebelo; Reelina, células mitrales del BO) o gliales (GFAP, astrocitos; Iba1, microglía), mediante inmunofluorescencia, se utilizaron secciones de tejido obtenidas con cualquiera de los dos métodos descritos anteriormente, ya que para este tipo de procesamiento su grosor no constituyó un factor tan limitante como en el caso de la hibridación *in situ*. Inicialmente, se lavaron las secciones con PBS a TA (3 x 5 min) y, a continuación, se incubaron durante una hora con un medio de preincubación, compuesto por 0,2% (p/v) Triton X-100, 5% (v/v) de Suero Normal de Cabra (NGS, *Normal Goat Serum*; Sigma-Aldrich) o de Suero Normal de Burro (NDS, *Normal Donkey Serum*; Sigma-Aldrich), en función del animal en el que estuviesen hechos los anticuerpos secundarios que se fueran a utilizar, y PBS. Al cabo de ese tiempo, se incubaron en el medio anterior junto con los anticuerpos primarios seleccionados conjuntamente, durante toda la noche a TA. Como norma general, la inmunofluorescencia indirecta se realizó para identificar dos antígenos (doble inmunofluorescencia indirecta), aunque en ocasiones también se hizo para identificar tres (triple inmunofluorescencia indirecta); en todos los casos, uno de los antígenos que se identificaba era la GFP. Para poder efectuar esta identificación de más de un antígeno de forma simultánea, los anticuerpos primarios debían estar hechos en diferentes especies de animales para evitar reacciones cruzadas inespecíficas. En la Tabla 7, se especifican los distintos anticuerpos primarios empleados, con sus respectivas diluciones, y se detalla la especie en la que han sido obtenidos.

Tras la incubación simultánea con los anticuerpos primarios, los cortes se lavaron con PBS (3 x 10 min) y se incubaron durante 90 minutos, a TA y en oscuridad, con los anticuerpos secundarios fluorescentes correspondientes diluidos 1:400 en PBS. En la Tabla 7, se recogen también los anticuerpos secundarios empleados para cada uno de los primarios. Para evitar posibles interacciones inespecíficas, a la hora de seleccionar los anticuerpos secundarios, se eligieron de manera que estuviesen obtenidos en un mismo animal, diferente de aquellos en los que se habían obtenido los distintos primarios.

Finalmente, las secciones se contratiñeron con 4', 6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI; Gibco-BRL, Carlsbad, EE. UU.) a concentración 1:10.000 en PBS, durante

20 minutos, o con yoduro de propidio (IP; Sigma-Aldrich) a concentración 1:2.000 en PBS durante 30 minutos. Tras 3 nuevos lavados con PBS, se montaron con medio “anti-desvanecimiento” (ver Apéndice).

Las fotografías que ilustran esta Tesis Doctoral, tanto de secciones reveladas con este tipo de técnica como con las explicadas posteriormente, fueron captadas mediante un fotomicroscopio (Olympus Provis AX70, Tokio, Japón) que tiene acoplada una cámara digital Olympus DP70. Posteriormente, las imágenes se procesaron digitalmente con Adobe Photoshop 7.0 para igualar el brillo, el contraste y el balance de color.

| Anticuerpo primario | Concentración | Anticuerpo secundario |
|-------------------------------|---------------|---|
| Anti-CB (hecho en conejo) | 1:7.000 | Cy3, Cy2 o Biotinado anti-IgG de conejo |
| Anti-CB (hecho en ratón) | 1:2.000 | Cy3, Cy2 o Biotinado anti-IgG de ratón |
| Anti-DIG (hecho en oveja) | 1:333 | Cy3 anti-IgG de oveja |
| Anti-DIG (hecho en ratón) | 1:333 | Cy3 anti-IgG de ratón |
| Anti-GFAP (hecho en conejo) | 1:2.000 | Cy3, Cy2 o Biotinado anti-IgG de conejo |
| Anti-GFP (hecho en cabra) | 1:1.000 | Cy2 anti-IgG de cabra |
| Anti-GFP (hecho en conejo) | 1:4.000 | Cy2 anti-IgG de conejo |
| Anti-Iba1 (hecho en cabra) | 1:500 | Cy5, Cy3 o Cy2 anti-IgG de cabra |
| Anti-Iba1 (hecho en conejo) | 1:750 | Cy3, Cy2 o Biotinado anti-IgG de conejo |
| Anti-Reelina (hecho en ratón) | 1:1.000 | Cy3, Cy2 o Biotinado anti-IgG de ratón |

CB: calbindina; DIG: digoxigenina; GFAP: proteína ácida fibrilar glial GFP: proteína verde fluorescente. Ver Apéndice para una descripción más detallada de todos ellos. Todos los secundarios fluorescentes se usaron a una concentración de 1:400 y los biotinados a 1:200.

Tabla 7. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en la realización de este trabajo.

Controles de especificidad

Para comprobar la especificidad de la técnica de inmunofluorescencia indirecta, ya fuese doble o triple, se realizaron los siguientes controles. La técnica se llevó a cabo tanto sin los anticuerpos primarios, para detectar uniones inespecíficas de los secundarios, como sin los secundarios, para detectar la posible emisión de fluorescencia inespecífica. Además, también se incubaron las secciones con uno solo de los anticuerpos primarios utilizados y, a continuación, se añadieron los secundarios correspondientes a los otros anticuerpos primarios omitidos, con el fin de poder detectar uniones cruzadas.

Por último, como control negativo de los anticuerpos para la proteína GFP, se emplearon secciones de animales silvestres sin ningún tipo de tratamiento que fueron reveladas paralelamente a las utilizadas como objeto de estudio. En ninguno de los casos detectamos falsos positivos por uniones inespecíficas.

Histoquímica del X-Gal

La técnica histoquímica del X-Gal permite visualizar la actividad enzimática de la β -galactosidasa en aquellas células del tejido en las que se ha producido su expresión. Para poder llevarse a cabo, el tejido debe haber sido extraído siguiendo un protocolo específico para la misma, que ya ha sido detallado en el apartado de “Obtención y preparación del tejido”. Una vez obtenidas las secciones y lavadas con PB, se transfirieron al tampón X-Gal (ver Apéndice) en el que se llevó a cabo la reacción a 37 °C, en oscuridad y durante toda la noche.

La β -galactosidasa hidroliza el enlace O-glucosídico de la lactosa, entre la β -galactosa y la glucosa. En esta técnica se utiliza el X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactósido) como sustrato de la reacción, que también contiene un enlace O-glucosídico con la β -galactosa. Al separarse de la β -galactosa, el 5-bromo-4-cloro-3-indol dimeriza espontáneamente y se genera un compuesto (5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo) de color azul (Figura 10). A la mañana siguiente, se paró la reacción realizando un lavado con PB a TA (3 x 10 min). Las secciones se montaron en portaobjetos gelatinizados. Una vez secas, se cubrieron con medio de montaje acuoso Gel Mount (Sigma-Aldrich) y cubreobjetos.

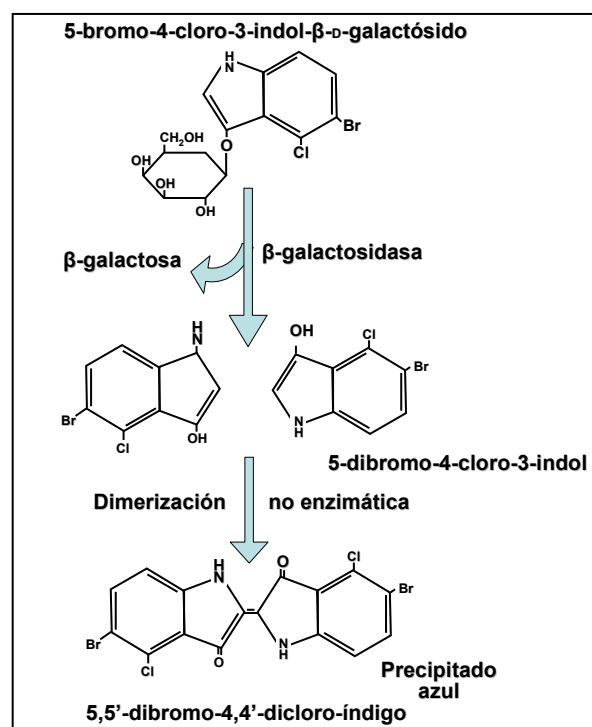


Figura 10. Esquema de las reacciones producidas en la técnica histoquímica del X-Gal. La β -galactosidasa hidroliza el enlace O-glucosídico del X-Gal (5-Bromo-4-Cloro-3-Indol- β -D-galactósido). Al separarse de la β -galactosa, se produce la dimerización espontánea del 5-Bromo-4-Cloro-3-Indol y se genera un compuesto, el 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo, que es de color azul y precipita.

La caracterización de las células marcadas con esta técnica se llevó a cabo en un paso posterior, previo al montaje de las secciones, mediante la técnica inmunohistoquímica del ABC. Las secciones seleccionadas –con células previamente marcadas con la histoquímica del X-Gal– se lavaron con PB a TA (3 x 10 min) y se incubaron con un medio compuesto por 0,2% (p/v) de Triton X-100, 5% (v/v) de NGS o NDS (en función de los anticuerpos secundarios) y PB. Al cabo de 1 hora, se incubaron en el medio anterior junto con el anticuerpo primario seleccionado, durante toda la noche a TA. A la mañana siguiente, se lavaron con PB (3 x 10 min) y se incubaron durante 90 minutos, a TA y en oscuridad, con el anticuerpo secundario correspondiente marcado con biotina, diluido 1:200 en PB. Tras nuevos lavados con PB (3 x 10 min), se incubaron con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC; Vector, California, EE. UU.) diluido 1:200, durante 90 minutos a TA. Tras esto, las secciones se lavaron con PB (3 x 10 min) y con tampón Tris-HCl 0,2 M, pH 7,6 (2 x 10 min). Para la visualización del antígeno buscado, las secciones se incubaron en 0,003% (v/v) de H₂O₂ (sustrato) y 0,02% de 3,3'-diaminobencidina (DAB, cromógeno, Sigma-Aldrich) en tampón Tris-HCl 0,2 M, pH 7,6 a TA. El desarrollo de la reacción se controló en el microscopio y se detuvo con tampón Tris-HCl frío. Las secciones así teñidas se montaron sobre portaobjetos, se deshidrataron rápidamente en una batería de alcoholes de concentración creciente y se aclararon con xileno para poder cubrirlos con el medio de montaje para microscopía Entellan® (Merck, Haar, Alemania) y un cubreobjetos.

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.

Donantes machos

En esta sección hacemos referencia a las técnicas para identificar las células procedentes de donantes machos en receptoras hembras. Este tipo de trasplante se caracteriza principalmente por la alta consanguinidad, ya que puede llevarse a cabo entre animales hermanos, y los problemas de rechazo son mínimos. Sin embargo, el proceso de visualización de las células derivadas de la médula ósea trasplantada (hibridación *in situ* del cromosoma Y) es bastante más complicado y tedioso que en el caso de tener que identificar directamente las células procedentes de donantes GFP o que en el de realizar la técnica histoquímica del X-Gal.

Hibridación *in situ* del cromosoma Y

La hibridación *in situ* es una técnica experimental basada en la capacidad que poseen los ácidos nucleicos para unirse (hibridarse) entre sí, mediante el reconocimiento de secuencias complementarias. Esta capacidad puede emplearse para identificar la presencia de una determinada secuencia de ácidos nucleicos en una muestra, por medio de la utilización de una sonda (secuencia de ácidos nucleicos de una sola cadena) complementaria marcada. Así, se produce la hibridación de la sonda marcada con la secuencia a buscar (en el caso de estar presente en la muestra), que se visualiza mediante técnicas específicas, en nuestro caso inmunofluorescentes. La hibridación *in situ* se caracteriza por presentar una especificidad muy elevada.

Para identificar células de macho en un tejido de hembra, utilizamos una sonda específica para una región del cromosoma Y. Esta sonda nos fue cedida, de forma completamente altruista, por la Dr.^a Eva Mezey, jefa de la “Adult Stem Cell Research Section” del NIH (National Institutes of Health) de Bethesda (EE. UU.), y ya ha sido utilizada con éxito previamente en algunos de sus trabajos (Eglitis y Mezey, 1997; Mezey *et al.*, 2000; Toth *et al.*, 2007; entre otros). La empleamos como una ribosonda; es decir, una sonda de ARN que hibrida en el ADN nuclear.

Preparación de la sonda del cromosoma Y

La sonda de cromosoma Y que empleamos en este trabajo se denomina pY3531B (Bishop *et al.*, 1985) y reconoce una secuencia repetida del cromosoma Y de ratón. Su desarrollo en nuestro laboratorio se ha realizado a partir del fagémido *pBluescript II KS* (<http://www.stratagene.com>; Figura 11) en el que llegó procedente del laboratorio de la Dr.^a Mezey. Un fagémido es un tipo de vector (agente que transfiere información genética)

empleado en biotecnología, compuesto por un plásmido al que se le ha incorporado el origen de replicación de un fago filamentoso (fago de ADN monocatenario). De este modo, mantiene todas las propiedades de un plásmido; pero, además, tiene la capacidad de producir ADN monocatenario. El fagémido *pBluescript II KS* tiene un tamaño aproximado de 2,7 kb y en su secuencia destacan dos genes que actúan como marcadores de selección: el gen de resistencia al antibiótico Ampicilina y el gen *lacZ*. Asimismo, presenta un *polylinker* flanqueado por los promotores de transcripción T3 y T7, en cuyo interior se encuentra el fragmento que codifica para nuestra sonda.

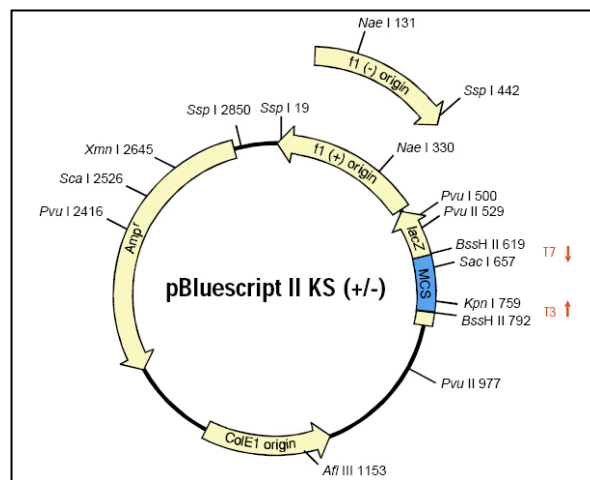


Figura 11. Esquema del fagémido *pBluescript II KS*. En el interior del *polylinker*, flanqueado por los promotores T3 y T7, se encuentra el fragmento que codifica para la sonda de cromosoma Y de ratón, en la región coloreada en azul.

A continuación, describimos todos los procesos que se llevaron a cabo desde su recepción en nuestro laboratorio hasta la utilización de la sonda a modo de ribosonda, es decir, formada por ARN.

Amplificación en bacterias competentes

Para obtener una cantidad suficiente para afrontar el estudio, se procedió a la amplificación del fagémido en bacterias competentes, también con la finalidad de poder conservar el vector en nuestro laboratorio para futuros experimentos. Este proceso se efectuó en la unidad de Medicina Molecular del Dpto. de Medicina de la Universidad de Salamanca, con la ayuda del equipo del Dr. Rogelio González Sarmiento. El primer paso de este proceso de amplificación fue la transformación de bacterias competentes. La transformación bacteriana es el proceso por el que un ADN libre se incorpora en una bacteria, normalmente llevando a cabo un cambio genético. Se dice que las bacterias que son capaces de ser transformadas son competentes. En nuestro caso, diluimos 1 μ l de la solución proporcio-

nada por la Dr.^a Mezey (con el vector original) en 4 µl de H₂O destilada, y lo añadimos a 25 µl de una solución de bacterias supercompetentes de la cepa TG1 derivada de *Escherichia coli*. Para llevar a cabo el proceso de transformación, se pusieron las bacterias en hielo durante 30 minutos; luego, en un baño a 42 °C durante 2 minutos; y, finalmente, de nuevo, en hielo. A continuación, se añadieron 300 µl de medio líquido 2xTY (ver Apéndice) y se cultivaron en agitación. Al cabo de 40 minutos, se sembraron en una placa con medio sólido TYE (ver Apéndice), pero, en este caso, suplementado con Ampicilina, y se pusieron a incubar hasta el día siguiente. Los cultivos en medios líquidos se mantuvieron en incubadores con agitación horizontal (180-200 rpm), mientras que el crecimiento en placas se realizó en estufas de cultivo, ambos a 37 °C. Como resultado de la incubación en placa con un medio suplementado con Ampicilina, se obtuvo un “césped” con una gran cantidad de colonias de bacterias transformadas. Con un palillo estéril, se seleccionaron algunas de ellas y se sembraron tanto en nuevas placas como en medio líquido. Las nuevas placas se sellaron con Parafilm® y se guardaron a 4 °C para futuras siembras, durante un tiempo máximo de 3 meses. Asimismo, también se guardaron parte de las bacterias transformadas cultivadas en medio líquido con glicerol 1:5. Para ello, se mantuvieron a -20 °C durante 1 hora y, finalmente, a -80 °C, temperatura a la que pueden ser almacenadas indefinidamente. Por último, el resto de las bacterias cultivadas en medio líquido se emplearon para la amplificación del vector.

Purificación del vector amplificado

La purificación del vector amplificado se llevó a cabo a partir de las bacterias destinadas a su amplificación tras su cultivo en medio líquido durante una noche. Este procedimiento se realizó también en la unidad de Medicina Molecular del Dpto. de Medicina de la Universidad de Salamanca, siguiendo el protocolo comercial del “RAPID DANAPLAS-MID MINIPREP KIT” (GeneDan S.L., Barcelona, España). Inicialmente, se realizó una lisis alcalina de las bacterias, seguida de un paso de precipitación y neutralización que hace precipitar las proteínas y el ADN genómico. A continuación, se efectuó una precipitación del ADN plasmídico con isopropanol, y, posteriormente, se purificó y concentró en una solución purificante. El producto final, que es el ADN plasmídico purificado, se resuspendió en H₂O destilada y se guardó a -20 °C hasta su utilización posterior.

Extracción de la sonda mediante PCR

Una vez obtenida una cantidad suficiente del vector que contiene la sonda de cromosoma Y de ratón, se procedió a la extracción de dicha sonda mediante la técnica de la

PCR. Con el fin de comprobar que el vector obtenido tras los dos pasos anteriores (amplificación y purificación) era similar al original de la Dr.^a Mezey, el proceso de extracción de la sonda se llevó a cabo simultáneamente con el vector que habíamos amplificado y con una muestra del vector original. Los cebadores empleados para esta PCR fueron los cebadores universales T3 y T7, que flanquean la zona de inserción de la sonda en el vector. En la siguiente tabla se recogen las secuencias de estos dos cebadores utilizados (Tabla 8).

| Cebador | Secuencia | Cebador | Secuencia |
|-----------|------------------------------------|-----------|-------------------------------------|
| <i>T3</i> | 5'-CGCGCAATTAAC CCTCACTAAAGG-3' | <i>T7</i> | 5'-GCGCGTAATACG ACTCACTATAGGG-3' |

Tabla 8. Secuencias de los cebadores utilizados para extraer la sonda del vector

Para preparar 100 μ l de medio para la realización de esta PCR se necesitan: 10 μ l de tampón comercial de la Taq polimerasa 10x, 2 μ l de desoxinucleótidos 10 mM, 1 μ l de Taq polimerasa 5 U/ μ l, 6 μ l de Cl₂Mg 25 mM, 2 μ l de cada cebador universal (T3 y T7) 100 μ M, 2 μ l del vector (entre 100 y 500 ng de muestra) y 75 μ l de H₂O_{DEPC}. Como control positivo, se utilizó el vector original; mientras que, como control negativo, se empleó el medio anterior, sustituyendo el volumen del vector por H₂O_{DEPC}. Esta PCR para la extracción de la sonda del vector se llevó a cabo en una termocicladora (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, Foster City, California, EE. UU.) con los ciclos de temperatura que se detallan en la siguiente tabla (Tabla 9).

| Paso | Tiempo | Temperatura | |
|------|------------|-------------|------|
| 1 | 5 min | 95 °C | |
| 2 | 1 min | 95 °C | x 35 |
| 3 | 2 min | 60 °C | |
| 4 | 2 min 30 s | 72 °C | |
| 5 | 7 min | 72 °C | |
| 6 | ∞ | 4 °C | |

Tabla 9. Condiciones de tiempo y temperatura de la PCR para extraer la sonda del vector.

El producto de la PCR se separó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% en TBE 0,5 X, con 0,4 μ g/ml de bromuro de etidio. La sonda de cromosoma Y de ratón

presenta un tamaño de 1.600 pb. El marcador de Pm empleado en este caso fue el *PhiX 174 DNA /Hae III* (Promega). Tanto con el vector original como con el vector amplificado se consiguió la extracción de la sonda de cromosoma Y de ratón. El producto amplificado tras la PCR no era muy puro (Figura 12), por lo que hubo que purificarlo antes de poder utilizarlo como molde para la síntesis de la sonda de ARN marcada con digoxigenina (DIG) que se requiere para la hibridación *in situ*.

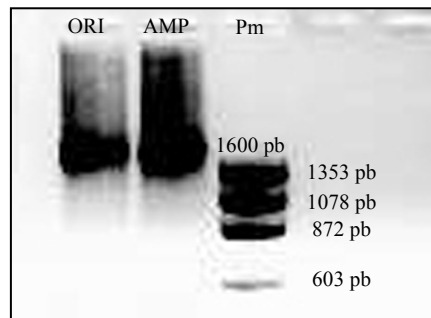


Figura 12. Fotografía del producto de la PCR obtenido para la extracción de la sonda de cromosoma Y de ratón del vector. El primer carril corresponde al vector original (ORI), proporcionado por la Dr.^a Mezey. El segundo carril, al vector amplificado (AMP) en bacterias competentes. El último carril es el marcador de peso molecular (Pm).

Purificación de la sonda a partir del producto de la PCR

La purificación de la sonda extraída del vector mediante la PCR se llevó a cabo con el kit comercial “HIGH PURE PCR PRODUCT PURIFICATION KIT” (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania) proporcionado amablemente por el Dr. Rogelio González Sarmiento. Hay que recordar que, tras la reacción de PCR, la sonda amplificada se encuentra contenida en un medio junto con los otros componentes empleados en la propia reacción (cebadores, sales, nucleótidos que no han sido incorporados, restos del vector y Taq polimerasa) que podrían interferir en los posteriores procesos de secuenciación, transcripción y marcado de la sonda con digoxigenina. El protocolo empleado se basa en una unión selectiva del ADN amplificado a fibras de un vidrio especial, contenidas en el interior de unos filtros propios del kit, seguida de una serie de lavados y centrifugaciones para la eliminación de los distintos contaminantes. Finalmente, se deshace la unión inicial y se obtiene el producto purificado, la sonda de ADN de cromosoma Y de ratón, en nuestro caso.

Para comprobar la efectividad de este proceso se sometió a electroforesis una alícuota del producto resultante (Figura 13). El resto del producto final se guardó a -20 °C para su utilización posterior.

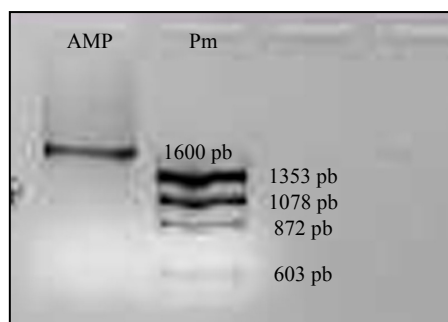


Figura 13. Fotografía de un gel de agarosa en el que se ha corrido mediante electroforesis una alícuota del producto de la PCR obtenido para la extracción de la sonda de cromosoma Y de ratón del vector una vez purificado. El primer carril corresponde al vector amplificado y purificado (AMP). El segundo carril es el marcador de peso molecular (Pm).

Secuenciación de la sonda y comprobación de su especificidad

Para comprobar la especificidad de la sonda de ADN del cromosoma Y de ratón, una vez sintetizada y purificada a partir del vector, se llevó a cabo su secuenciación. Este proceso se realizó en el Servicio de Secuenciación de ADN de la Universidad de Salamanca. En él, los factores más importantes que afectan a la calidad de los resultados son la pureza de la muestra y la cantidad de ADN. El primero de ellos, su pureza, no constituyó un problema tras el proceso anterior al que habíamos sometido a nuestra muestra. Por otra parte, es necesario conocer la concentración del ADN, no sólo para proceder a su secuenciación, sino también para los procesos posteriores de transcripción y marcado de la sonda con DIG, en los que es decisivo también partir de una cantidad de muestra conocida. En el caso de la secuenciación, si se utiliza una cantidad insuficiente de ADN, los resultados son de mala calidad, pues la intensidad o altura de los picos del cromatograma son muy bajos y pueden enmascarse con el ruido de fondo (picos inespecíficos). Por el contrario, si la cantidad de ADN es excesiva, la secuencia no se alarga lo suficiente, ya que los cebadores se terminan en los primeros ciclos. Así pues, es necesaria una relación equilibrada entre la cantidad de ADN molde y de cebadores.

La cuantificación del ADN purificado después de la PCR se realizó mediante espectrofotometría. Para ello, se hizo una predilución 1:100 de la muestra y se calculó su concentración a partir de su absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro (Smart Spec™ Plus Spectrophotometer, BioRad). Esta medición se realizó en el Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca, gracias a la colaboración de D.^a Ruth Rodríguez Barrueco. Una vez conocida la concentración, se preparó una alícuota de la muestra para llevarla a secuenciar, teniendo en cuenta que el proceso de secuenciación para productos de PCR requiere 100

ng del ADN que se secuencie y 3 pmoles del cebador que se utilice (T3 y T7, en nuestro caso) en un volumen final de 8 µl de H₂O destilada.

En los siguientes cuadros se recogen las secuencias obtenidas tras el proceso de secuenciación con los cebadores universales T3 y T7.

Cebador T3

```
5'AGCTGGAGCTCCACCGCGTGNNTTGCCGCTCGGAGAACTAGTGGATCCCCCGNCTGCAGGAATTCATATATAT
GACAGAGGCAACAGCATTGTGCTGGTTTAAACGGGCAAGATCTTCAGTCCCAGGCAATGAGCAAGTATGATATTT
GAAGGGAATGGAAGCCATAAGACAGTGTGATCTACCAACAGATCTACAGCCAGGTAGAAGACAATACCTCTGAA
GAGTCTGAGCATGACATCACTCAAGAAGAAGAGTAGGAGGAAGCCTTCTCCAGGCCCTGGGGAATATTGTTGGC
TGCAGAATTTCTACGGGTGAAAGGAAGGTAATGAGCTGTACCCATTGAAAGGCCATGATTCTAGGTCAACTGCC
AACAAACCCCTTCTCTTTATTGATGAAGTATGAAGGAATTGACAGTGTCTACGGACAGGGAGCTCCACAGCGATGA
GAGCATTAAATCTTAAAGNCTTGCCCTACANAGTAGTTTTCCCTCCAGGTTGANGGATGCTCCCAACCTCGCCA
GCGTCCCTTGGGTTGGCAANAANAAGNNTCCAAACCCCAAAAATTTGGNANAGGNANAACCATGGGCCCTCCC
TGANNNGNTAAAANTTCGGCENNNTAGGTNTAATGGGTNGCCTTNTCCCCCACTGGNNGCCCANNTTNCCTTNA
ANNNGNNNCTGGCGNTTTTNTANCCATTTTTTCCCATANANANANNAAAAAGGANNTGCCNCGGGGCCCTNCTT
TNNCANTCCTTTCTCCGNCCNTTCCCCGGNCTTATGNAACNCTTCCACAACGGATNAGGNTCATAACCCCTNCCCN
CCNNTACCCNTTTNTCAA-3'
```

Cebador T7

```
5'CGATGGGTCCGGGCCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCATATCCGATGGTTAACAA
TCAGCTTTAATGCCAGCTCCATGGGATCTGACAACCTATGTCTCTGTGGTCACCTATACTCTCAAGTCTATGCCCTAC
TCCATCCATATAATAATGATAATAAATCTTAAAATGAGAGACAAGTTTCATTTGGTTTCATTATTCAAAATGAAAC
CTTATTTGTCTGATTTCTGAGTCACCTTTGGATCAGTTTTCTGGGTAAAACCTTTGTGTAACAAGGCCACATTCTTTTA
TCTATCACTCTTCCCAACTTGTGTTTCTCCCTCAGACTTCATACCAGAGATTCTATATCTCTGTCTTTCTTCCC
TTCTTCTAAAAATCCATCATTGCTGCCATCCCTACTCCNCAAGTCATATCTCCAATTCCTTGCTCACTATGCAGA
CCACAGAACTAAGTCTGTCCATTTAGCCTGTGTGATATTAGATGTATGCACTGTTACATCCTGAGTTGCAACTT
TCATCTTCTTTGAAGTCTTTCCACCATAGTCCATCTTCCACCAAAGTGTTTACTAAAAAGCATGTATGTCACAC
GTATTAATTTTTAGAACAAAACAAAATTTTATGACAAAAGATACTGGAGTTGTCAAAGACCCATAGGTNCCCACC
CAGGGGAAAACAAAACAGNTTTTTTCAACCCCTAAAAGTTTANAATTTTCNGGNACNTTTTTTTTTNTCCAANTNAAA
GNGGAAATTTGGGANCCCCGGGGTNTANNCNNANANNAANATGGCANNGNCCCACCCCCGAAAATTTNGGAA
AAAAAATNACCCCGNNAGGGAATGGGNCCNAANACCCTTTTNTAAAAAAAACCTTTTTTGGNAAAACNTTTTTN
G-3'
```

Las secuencias obtenidas se cotejaron con las proporcionadas por la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) para el genoma del ratón (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/BlastGen/BlastGen.cgi?taxid=10090>), y se obtuvieron unos porcentajes de hibridación del 96 y 97% para las secuencias obtenidas con el cebador T3 y T7, respectivamente, con secuencias propias del cromosoma Y del ratón.

Trascrición de la sonda a ARN y marcado con digoxigenina

Tras haberse purificado y cuantificado la sonda de ADN, y una vez comprobada su especificidad, se procedió a su transcripción a ARN y a su marcado con DIG. Las sondas de ARN, o ribosondas, presentan una serie de ventajas con relación a las sondas de ADN; entre ellas, destaca su elevada sensibilidad, así como el hecho de que, durante la hibridación, toda la ribosonda marcada se encuentra disponible para hibridarse, a diferencia de las sondas de ADN que pueden seguir procesos de reanillamiento o de renaturalización. Asimismo, es importante destacar que el proceso de transcripción de la sonda a ARN conlleva, de forma sencilla, la síntesis de una mayor cantidad de sonda.

Por otro lado, la digoxigenina, molécula con la que llevamos a cabo el marcado de nuestra sonda, es una molécula de naturaleza esteroidea, presente únicamente en plantas del género *Digitalis*, por lo que su reconocimiento e identificación en tejidos de ratón no va a presentar problemas de especificidad.

El proceso de transcripción y marcado con DIG se llevó a cabo utilizando el kit comercial “DIG RNA LABELING KIT (SP6/T7)” (Roche Applied Science). A partir de 1 µg de muestra de ADN purificado en 13 µl de H₂O_{DEPC}, se añadió tampón de transcripción 10x (2 µl), mezcla de ribonucleótidos marcados con digoxigenina 10x (2 µl), inhibidor de ribonucleasas (RNAsas; 1 µl) y, en nuestro caso, ARN polimerasa T7 (2 µl). Tras mezclar suavemente, se incubó en un baño a 37 °C durante 2 horas. A continuación, se añadió DNasa I (2 µl) y se incubó a 37 °C, durante 15 minutos, para eliminar el molde inicial de ADN. La reacción se paró con una mezcla de EDTA 0,2 M pH 8,0 (2 µl), LiCl 4 M (2,5 µl) y etanol absoluto frío (75 µl), y se puso en hielo seco durante 30 minutos. A continuación, se centrifugó a 13.000 rpm y 4 °C durante 30 minutos. Se eliminó el sobrenadante por decantación y se resuspendió con 100 µl de etanol 95% frío. De nuevo, se centrifugó a 13.000 rpm y 4 °C durante 30 minutos y, tras eliminar el sobrenadante, se dejó secar a TA hasta que el precipitado se volvió transparente. Finalmente, se reconstituyó en 100 µl de H₂O_{DEPC}. Para evitar congelar y descongelar el volumen total de la sonda de ARN marcada con DIG sintetizada, se prepararon alícuotas de 5 µl que se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

Protocolo de hibridación

Describimos, a continuación, el protocolo definitivo que hemos puesto a punto tras una serie de pruebas, y que ha sido el empleado durante la realización de esta Tesis Doctoral. En él, se necesitan criosecciones de hasta 14 µm de grosor, de material fresco o perfundido con hasta un máximo de 50 ml de fijador Zamboni por animal (ver sección de Resultados). Para evitar que las secciones adheridas –tras su corte– a los portaobjetos se separen de éstos, se sacan del congelador en que se encuentran almacenadas a -30 °C y, para que se atemperen, se dejan a TA por un tiempo no inferior a 2 horas; además, antes de comenzar la técnica, es conveniente secarlas suavemente con un secador de pelo durante unos segundos. Una vez acondicionadas, se puede continuar con la hibridación *in situ* sin temor a perder las secciones a lo largo de todo su procesamiento. A continuación, hay que delimitar con un rotulador de cera el área ocupada por las secciones en los portaobjetos, para disminuir el volumen de sonda y los reactivos que vayan a utilizarse en las distintas incubaciones.

La técnica comienza con 3 lavados en PBS de 5 minutos de duración (3 x 5 min) a TA y en ligera agitación. Es importante que todos los pasos (hasta que se haya producido la hibridación) se realicen en soluciones libres de RNAsas para evitar la presencia de este tipo de enzimas en el momento de aplicar la ribsonda, y que podrían producir su degradación. Tras los lavados con PBS, se realiza un lavado con tampón citrato sódico salino (SSC, *Sodium Chloride – Sodium Citrate*) 2x (ver Apéndice) de 10 minutos de duración. Durante ese tiempo, se preparan el medio de hibridación y el medio de prehibridación, compuesto este último por 7 partes de formamida (FLUKA 47670, Sigma-Aldrich), 2 partes de H₂O_{DEPC} y 1 parte de SSC 20x, y se pone a calentar a 81 °C en un termobloque (Baureihe Metall Block Thermostat MBT 250-4, ETG, Ilmenau, Alemania). El medio de hibridación está compuesto por 80 µl de tampón de hibridación (ver Apéndice), 0,5 µl de SDS 10%, 0,5 µl de tiosulfato sódico 10% (NTS, *Sodium Thiosulphate*), 2 µl ARN mix (ver Apéndice) y 1 µl de la sonda de ARN marcada con DIG. Estas cantidades corresponden a cada uno de los portaobjetos con secciones de tejido analizable. Una vez preparados ambos medios, prehibridación e hibridación, se ponen a incubar los portaobjetos con las secciones durante 10 minutos, a 81 °C, con el medio de prehibridación precalentado a 81 °C, en una placa calefactora específica para este proceso (Hybaid OmniSlide *In Situ* Thermal Cycler System PCR, Thermo Scientific, Massachusetts, EE. UU.) que permite variar rápidamente la temperatura de incubación en el interior de una cámara húmeda. Durante esos 10 minutos de incubación de las muestras con el medio de prehibridación, el medio de hibridación, que contiene la sonda de ARN, se pone a calentar también a 81 °C en el mismo termobloque en el que se había puesto a calentar con anterioridad el medio de prehibridación. Al cabo de ese tiempo, en el que se ha llevado a cabo la desnaturalización de los ácidos nucleicos, se retira el medio de prehibridación de las secciones y se sustituye por el medio de hibridación, que se encuentra también a 81 °C. Esta parte del proceso dura 12 minutos. Para evitar que se sequen las secciones, además de encontrarse en el interior de una cámara húmeda, una vez aplicado el medio de hibridación, se cubren con cubreobjetos estériles, procurando evitar la formación de burbujas en su interior. Tras los 12 minutos de incubación de las secciones con la sonda a 81 °C, se disminuye la temperatura hasta 55 °C y se mantienen incubando a esta nueva temperatura durante 30 minutos en cámara húmeda, tiempo en el que tiene lugar la hibridación propiamente dicha. Estos cambios rápidos de temperatura en el interior de una cámara húmeda son posibles gracias a la utilización del dispositivo anteriormente mencionado, y que pertenece al Dpto. de Anatomía e Histología Humanas de la Universidad de Salamanca.

Terminada la hibridación, el siguiente paso consiste en retirar los cubreobjetos. Para ello, se sumergen los portaobjetos en una cubeta de vidrio con SSC 2x precalentado a 55 °C en la estufa, evitando así someter a las muestras a cambios bruscos de temperatura. Al poco tiempo de haberlos sumergido en el SSC 2x a TA, en ligera agitación, se van soltando los cubreobjetos. Una vez retirados, se realizan lavados consecutivos de 5 minutos cada uno, a TA, con SSC 2x, 1x, 0,5x y 0,1x. Tras el último de estos lavados, se incuba durante 30 minutos a 65 °C con SSC 0,1x. Todos estos lavados tienen por misión eliminar aquellos restos de sonda que hayan podido quedar en el tejido sin estar unidos de manera específica. Asimismo, tras haberse producido la hibridación, todos los medios empleados para los diferentes lavados e incubaciones no se encuentran libres de RNAsas para favorecer la degradación de los restos de sonda no hibridados específicamente.

Visualización de la ribosonda hibridada

Los siguientes pasos consisten en preparar el tejido para la visualización de la sonda hibridada. Al cabo de los 30 minutos a 65 °C con SSC 0,1x, se sacan los portaobjetos con las secciones de la estufa y se dejan en agitación ligera a TA para que no haya cambios bruscos de temperatura con el PBS de los siguientes lavados, que son a TA y en agitación ligera (3 x 5 min). A continuación, se lleva a cabo una preincubación previa a la técnica inmunofluorescente para la identificación de la DIG unida a la sonda. Esta preincubación, de 30 minutos de duración, se hace en el interior de una cámara húmeda, a TA, con PBS, Triton X-100 al 0,2% (p/v) y NGS al 5% (v/v). Tras esta preincubación se realiza la incubación con el anticuerpo primario anti-DIG (ver Tabla 7 y Apéndice) a una concentración de 1:333 en el mismo medio de preincubación, en cámara húmeda, a TA y durante toda la noche. A la mañana siguiente, se lavan las secciones con PBS a TA (3 x 5 min) y en agitación ligera. Se continúa realizando la incubación con el anticuerpo secundario fluorescente Cy3, en función del tipo de anticuerpo primario utilizado (monoclonal o policlonal; ver Tabla 7 y Apéndice), a una concentración de 1:400 en PBS durante 90 minutos, también en cámara húmeda, a TA, y, en este caso, en oscuridad. Al cabo de esos 90 minutos, se lava con PBS a TA (5 x 5 min) y se ponen las secciones a incubar con DAPI a concentración 1:10.000 en PBS durante 20 minutos, a TA, en cámara húmeda y en oscuridad. El DAPI permite marcar los núcleos de las células y poder conocer la localización de la sonda de cromosoma Y en el tejido, identificando su citoarquitectura. El exceso de DAPI se elimina con lavados de PBS (5 x 5 min) a TA, en agitación ligera, y en oscuridad.

Tratamiento con negro Sudán

La hibridación *in situ* fluorescente del cromosoma Y resulta en un marcaje del tejido que consiste en un pequeño punto fluorescente en la periferia de los núcleos (ver sección de Resultados). Para evitar confundir este tipo de señal con otras inespecíficas, principalmente procedentes de la lipofucsina, es conveniente realizar un tratamiento con negro Sudán (Schnell *et al.*, 1999). La lipofucsina es un pigmento lipídico autofluorescente que se acumula con la edad en el interior de las células del SNC y de otros tejidos, y que se conoce como el “pigmento del envejecimiento”. En nuestros experimentos, en los que los tiempos de supervivencia son relativamente elevados, la cantidad de lipofucsina en el tejido es bastante alta. Para enmascararla, tras realizar la técnica completa de hibridación *in situ*, se tiñen las secciones con una solución de negro Sudán B (Panreac, Barcelona, España) al 1% en etanol de 70° (v/v) durante 4 min. Al cabo de ese tiempo, se introducen en etanol de 70° para eliminar el exceso de colorante y se lavan rápidamente en PB. Por último, los portaobjetos con las secciones se montan con cubreobjetos y “medio antidesvanecimiento”.

Controles de especificidad

Además de tener en cuenta la localización nuclear del cromosoma Y, mencionada anteriormente, en todas las hibridaciones *in situ* se llevan a cabo los correspondientes controles positivo y negativo. Como control positivo, se emplean secciones de un animal macho; y como control negativo, secciones de un animal hembra sin trasplante, ambas procesadas bajo las mismas condiciones que las secciones objeto de estudio. En ninguna de las secciones procedentes de animales hembras sin trasplante se observan núcleos con marcaje positivo tras la hibridación *in situ*. Por el contrario, en la mayoría de los núcleos de animales machos se observa marcaje positivo. El hecho de no encontrarse este marcaje del cromosoma Y en la totalidad de las células de los machos es consecuencia del seccionamiento del tejido.

Caracterización de las células del donante en el hospedador

La hibridación *in situ* del cromosoma Y descrita en el apartado anterior permite identificar las células procedentes de los donantes machos en el encéfalo de animales receptores hembras. Sin embargo, esta identificación no es suficiente a la hora de llevar a cabo una aproximación a su función y efecto en el hospedador, por lo que necesitan ser caracterizadas. Para ello, hemos puesto a punto una combinación de la técnica de hibridación *in situ* del cromosoma Y de ratón con técnicas inmunofluorescentes, que permiten la identificación de los distintos tipos celulares que provienen del huésped.

Para poner a punto esta técnica, a la que hemos denominado “doble inmunofluorescencia-hibridación *in situ*”, se probaron diferentes vías. Inicialmente, se hizo en primer lugar la hibridación *in situ* del cromosoma Y; después, la inmunofluorescencia sobre esas mismas secciones. Del mismo modo, se probó a realizar primero la inmunofluorescencia y, a continuación, la hibridación *in situ* del cromosoma Y. Ninguna de estas dos modalidades resultó válida, como describiremos en la sección de Resultados. A continuación, detallamos el protocolo definitivo que hemos conseguido poner a punto para poder realizar la técnica de la doble inmunofluorescencia-hibridación *in situ*.

Doble inmunofluorescencia-hibridación in situ

Puesto que esta técnica es una combinación de la técnica de hibridación *in situ* del cromosoma Y y de técnicas inmunofluorescentes, hay que tener en cuenta los requisitos y restricciones de cada una de ellas. Así pues, se necesitan secciones de hasta 14 μm de grosor, obtenidas de la misma manera y del mismo tipo de tejido que para el caso de la hibridación *in situ* del cromosoma Y. Además, para evitar que las secciones se despeguen de los portaobjetos a lo largo de todo su procesamiento, requieren un tratamiento inicial similar al que se realiza para esa misma técnica por separado. Del mismo modo, antes de comenzar con la doble inmunofluorescencia-hibridación *in situ*, hay que delimitar en los portaobjetos con un rotulador de cera la región en la que se encuentran contenidas las secciones. Dividiremos esta técnica en una serie de apartados para facilitar su seguimiento:

Inhibición de las peroxidasas endógenas

La técnica se comienza con 3 lavados con PBS de 5 minutos de duración (3 x 5 min) a TA y en agitación ligera. A continuación, se realiza una inhibición de las peroxidasas endógenas, fundamental para evitar la posterior aparición de falsos positivos. Este paso, que se lleva a cabo utilizando el kit comercial “PEROXIDASE BLOCKING REAGENT” (DAKO, Glostrup, Dinamarca), se realiza en una cámara húmeda, a TA y durante 10 minutos. Una vez inhibidas las peroxidasas endógenas, se realizan 3 nuevos lavados con PBS (3 x 5 min).

Anticuerpo primario de la técnica inmunofluorescente

El siguiente paso consiste en la incubación con el anticuerpo primario seleccionado para la técnica inmunofluorescente. Inicialmente, se lleva a cabo una preincubación, de una hora de duración, en una cámara húmeda, a TA, con un medio compuesto por: PBS, Triton X-100 al 0,2% (p/v) y NGS al 5% (v/v). Al cabo de ese tiempo, se realiza la incubación

con el anticuerpo primario correspondiente, según el antígeno que queramos caracterizar en cada caso (ver Tabla 7 y Apéndice), en el mismo medio de preincubación y en las mismas condiciones, durante toda la noche a TA. A la mañana siguiente, se lavan las secciones con PBS a TA (3 x 5 min) y en agitación ligera.

Anticuerpo secundario de la técnica inmunofluorescente

Se continúa la técnica incubando durante 90 minutos con el anticuerpo secundario biotinado correspondiente (1:200), en función del tipo de anticuerpo primario utilizado (ver Tabla 7 y Apéndice), también en cámara húmeda y a TA. Después de una hora de haber incubado, se prepara el complejo ABC con el que se realizará la siguiente incubación, y que tiene que prepararse media hora antes de su utilización, y mantenerse en oscuridad.

Complejo ABC

A continuación, se lava con PBS (3 x 5 min) y se incuba con el complejo ABC en una cámara húmeda, durante una hora, en oscuridad. Esta incubación conlleva la formación de agregados de avidina, biotina y peroxidasa en torno a la biotina con la que se encontraba marcado el anticuerpo secundario. Al cabo de ese tiempo, se lava de nuevo con PBS (3 x 5 min) para eliminar el exceso del complejo ABC no unido al tejido.

Amplificación con tiramidas

La amplificación con tiramidas es un paso esencial para poder concluir con éxito el protocolo de la doble inmunofluorescencia-hibridación *in situ*. Este paso consiste en la unión covalente de moléculas de tiramida biotinada a proteínas presentes en el tejido, sólo en torno a la peroxidasa del complejo ABC y, por ende, al antígeno buscado (Figura 14). En presencia de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), la peroxidasa del complejo ABC cataliza la formación de tiramida biotinada **reactiva**, que se une covalentemente a residuos de triptófano y tirosina de proteínas próximas en el tejido, resultando en el depósito de biotina (tiramida biotinada) en la zona de reacción, puesto que la peroxidasa está presente únicamente en la zona de localización del antígeno (Bobrow *et al.*, 1989; Adams, 1992).

La importancia de este paso reside en que el depósito de la tiramida biotinada es capaz de soportar las elevadas temperaturas a las que se somete el tejido para poder realizar posteriormente la hibridación *in situ* (81 °C, en nuestro caso), lo que permite mantener moléculas de biotina en la zona del antígeno para su revelado e identificación posterior. La amplificación con tiramidas se lleva a cabo con el kit comercial “TSA (TYRAMIDE SIGNAL AMPLIFICATION) BIOTIN SYSTEM” (PerkinElmer Life Sciences, Massachusetts, EE. UU.) en una cámara húmeda a TA, durante 6 minutos, a la concentración de

1:100. Para disminuir el volumen de la solución de tiramida biotinada utilizada en cada portaobjetos, se cubren éstos con un trozo de Parafilm® durante la incubación. Tras el tiempo de incubación, se lava abundantemente con PBS (5 x 5 min), y se lleva a cabo la hibridación *in situ* del cromosoma Y de ratón.

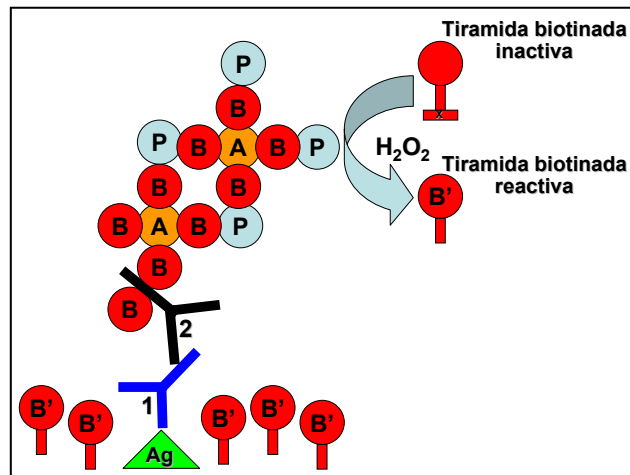


Figura 14. Esquema de los diferentes componentes implicados en el proceso de amplificación con tiramidas. Al antígeno (Ag) se le ha unido el anticuerpo primario (1), y a éste el anticuerpo secundario (2) que lleva unida biotina (B). El complejo ABC produce la unión de avidina (A), biotina y peroxidasa (P) a la biotina del anticuerpo secundario. La peroxidasa, en presencia de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), cataliza la formación de tiramida biotinada reactiva (B') que se une covalentemente a proteínas próximas en el tejido, resultando en el depósito de biotina en la zona de reacción y en la amplificación de la señal.

Hibridación *in situ* del cromosoma Y

Los pasos que se realizan para la hibridación *in situ* del cromosoma Y para la técnica de la doble inmunofluorescencia-hibridación *in situ* son similares a los que hemos descrito anteriormente para el protocolo de hibridación *in situ* (ver sección correspondiente). Así pues, haremos una breve reseña de los distintos pasos: 1º, lavados con PBS (3 x 5 min); 2º, lavado con SSC 2x (10 min); 3º, preincubación (81 °C, 10 min); 4º, incubación con la ribosonda (81 °C, 12 min; 55 °C, 30 min); 5º, lavados con SSC 2x, 1x, 0,5x, 0,1x (5 min cada uno); 6º, lavado con SSC 0,1x (65 °C, 30 min); 7º, lavados con PBS (3 x 5 min); 8º, preincubación previa a la técnica inmunofluorescente (30 min); 9º, incubación con el anticuerpo primario anti-DIG (1:333, durante toda la noche); 10º, lavados con PBS (3 x 5 min).

Revelado fluorescente

Una vez lavado el medio de incubación del anticuerpo anti-DIG, se lleva a cabo el revelado fluorescente de la sonda hibridada y del antígeno buscado. Para ello, se utilizan un anticuerpo secundario fluorescente Cy3 anti-(el anticuerpo monoclonal o policlonal utiliza-

do contra la DIG; 1:400) y estreptavidina Cy2 (1:600) en PBS. Esta etapa se realiza en oscuridad, en el interior de una cámara húmeda a TA, durante 90 minutos. La estreptavidina es una molécula que se une específicamente a la biotina, permitiéndonos revelar el antígeno identificado previamente y que se ha mantenido estable durante la hibridación *in situ* gracias al depósito de biotina producido con la reacción de amplificación con tiramidas. Transcurrido el tiempo de incubación, se lava con PBS (5 x 5 min), se incuban las secciones con DAPI (1:10.000, 20 minutos) y se elimina el exceso de DAPI lavando nuevamente con PBS (5 x 5 min). Al igual que en el caso de la hibridación *in situ*, una vez terminados todos los pasos, se realiza el tratamiento con negro Sudán. Tras eliminar el exceso de colorante, se montan los portaobjetos con cubreobjetos y “medio antidesvanecimiento”.

Controles de especificidad

Para comprobar la especificidad de la técnica de la doble inmunofluorescencia-hibridación *in situ*, se utiliza una combinación de los distintos tipos de controles negativos empleados para cada una de las dos técnicas por separado. Así, se realiza la omisión tanto de los anticuerpos secundarios y de la estreptavidina, para detectar la emisión de fluorescencia inespecífica, como de sólo los anticuerpos primarios, para detectar posibles uniones inespecíficas de los secundarios o de la estreptavidina al tejido. Además, en todos los casos, se revelan a la par secciones de un animal macho y una hembra, como controles positivo y negativo, respectivamente, de la técnica de hibridación *in situ* del cromosoma Y de ratón, y se analiza la necesaria localización nuclear del marcaje para dicho cromosoma.

Detección de células poliploides en el bulbo olfatorio

Para realizar una aproximación a la posible poliploidía de las células mitrales del BO de ratones, se llevó a cabo una hibridación *in situ* fluorescente del cromosoma 1 de ratón. Este análisis se hizo en hermanos silvestres (+/+) de las mismas camadas que los animales PCD, dejándolos sobrevivir hasta 300 días de edad (P300). Los animales se sacrificaron por dislocación cervical, y sus cerebros se diseccionaron rápidamente en fresco. A continuación, se separaron ambos bulbos olfatorios y se seccionaron coronalmente para permitir la visualización de la capa de células mitrales (CCM). Seguidamente, bajo la lupa y con ayuda de un bisturí, se seleccionó en todas las secciones la región en la que se encontraban las células mitrales, desechándose el resto de tejido adyacente. El tejido de interés seleccionado se puso en un tubo de plástico de 1,5 ml (Eppendorf®) junto con 1 ml de PBS, y se mantuvo en hielo hasta el momento de la hibridación *in situ*.

Hibridación in situ del cromosoma 1

Después de haber seleccionado el tejido de interés, se disoció mecánicamente (pasándolo por una aguja de insulina) y se depositó sobre portaobjetos gelatinizados en los que, una vez seco y adherido, se fijó con metanol/ácido acético (3:1) durante 5 minutos. Tras la fijación, se lavó con PBS (2 x 5 min) a TA y en agitación. El siguiente paso consistió en un tratamiento con pepsina (9001-75-6, Sigma-Aldrich) al 0,005%, durante 10 minutos, a 37 °C, para degradar los restos de sustancia intercelular. El medio utilizado para esta degradación estaba compuesto por HCl 1N (1 ml), H₂O (99 ml) y Pepsina (0,005%). Tras 10 minutos de digestión, se volvió a lavar con PBS (2 x 5 min) a TA. Posteriormente, se incubó con paraformaldehído al 1% en PBS, durante 10 minutos, a TA, y se volvió a lavar con PBS (2 x 5 min) en las mismas condiciones. Seguidamente, se deshidrató en una batería de alcoholes de gradación creciente (70%, 90%, 100%), 5 minutos en cada uno de ellos, y se dejó secar. Una vez seco, se llevó a cabo la desnaturalización del ADN celular en una solución de formamida al 70% (49 ml de formamida, 7 ml de SSC 20x (pH 5,3) y 14 ml de H₂O_{DEPC}) a 75 °C, y pH 7,0, durante 5 minutos. Tras ese tiempo se volvió a deshidratar en etanol, pero, en este caso, solamente 1 minuto en cada solución, y se dejó secar de nuevo. Durante esta segunda deshidratación, se procedió a desnaturalizar la sonda comercial del cromosoma 1 de ratón (Applied Genetics Laboratories, Melbourne, Florida, EE. UU.) durante 5 minutos en un baño a 75 °C. A continuación, se añadieron 8 µl de la solución comercial con la sonda de cromosoma 1 de ratón marcada con biotina, por cada uno de los portaobjetos, y se cubrieron con un trozo de Parafilm®. La incubación de las células con la sonda se realizó a 37 °C durante toda la noche. A la mañana siguiente, se lavó en formamida 50% (formamida/SSC 2x) durante 15 minutos a 46 °C y, a continuación, en SSC 2x y en tampón TNT (ver Apéndice) a TA y durante 5 minutos cada uno. El siguiente paso fue una preincubación de 30 minutos a 37 °C en tampón TNB (ver Apéndice), procurando que no se secasen los portaobjetos durante la incubación. Los pasos posteriores se dirigieron a conseguir la visualización de la sonda ya hibridada, y a la amplificación de la señal. Para ello, se incubaron los portaobjetos con las células disociadas utilizando una solución de avidina marcada con una molécula fluorescente, el isotiocianato de fluoresceína (FITC, A2901, Sigma-Aldrich), en TNB (1:400) a 37 °C. Al cabo de 30 minutos, los portaobjetos se lavaron con tampón TNT (3 x 3 min) a TA; después, se volvieron a incubar con biotina-avidina en TNB (1:200) en las mismas condiciones y, tras lavado en TNT (3 x 5 min), se incubaron en avidina-FITC. Después de varios lavados, se incubaron en una solución de contratinción con DAPI (1:1.000), durante 2 minutos, a TA. Finalmente, se eliminó el ex-

ceso de DAPI lavando con TNT (3 x 3 min), y se montaron con Vectashield (H-1000, Vector) y cubreobjetos.

Análisis estadísticos

Las diferencias cuantitativas se analizaron utilizando diferentes test estadísticos, en función de los grupos que se estuviesen comparando. En el caso de estudiar el porcentaje de células fluorescentes –del donante– en la sangre periférica de los dos grupos de animales trasplantados (silvestres y mutantes), se utilizó el test de la *t de student*, con un nivel de significación de $p < 0,05$. En el caso de los resultados obtenidos de las pruebas de comportamiento, en el que se compararon 3 grupos experimentales, se usaron el test de *ANOVA* o el de *Kruskal-Wallis*, en función del grado de cumplimiento de los supuestos de normalidad y homoscedasticidad. En el caso de que existiesen diferencias significativas, se llevó a cabo la comparación entre pares de grupos con *Bonferroni*, si los datos eran normales, o con la *U de Mann-Whitney*, si no se cumplían los supuestos de normalidad. El nivel de significación se estableció en $p < 0,05$ –diferencias significativas (*)– y $p < 0,01$ –diferencias altamente significativas (**)–. El programa estadístico utilizado fue el SPSS v15.0 para Windows (SPSS, Chicago, EE. UU.).

RESULTADOS

Para este apartado se mantiene el mismo esquema que se ha seguido en la sección anterior, desde el establecimiento de las colonias hasta el sacrificio de los animales, pasando por todos los pasos intermedios que conllevan el trasplante de médula y el seguimiento de los animales receptores. Finalmente, se muestran los resultados obtenidos tras el sacrificio de los animales, y que engloban las distintas vías de identificación de las células trasplantadas y un análisis cualitativo de la llegada de las CMO al cerebelo y al BO de los animales trasplantados.

Establecimiento de las colonias de animales

El primero de los objetivos que nos planteamos al inicio de esta Tesis Doctoral fue el establecimiento de las colonias de animales necesarias para abordar estudios de trasplantes de médula ósea como terapia celular en enfermedades neurodegenerativas. Al comienzo de este estudio ya disponíamos de la colonia de animales *PCD* en nuestro laboratorio, por lo que podríamos haber limitado el modelo experimental para nuestro estudio al trasplante de médula ósea procedente de animales donantes machos en animales receptores hembras. Sin embargo, este modelo experimental limita mucho la interpretación de los resultados, ya que, además de no permitir distinguir el mecanismo de plasticidad seguido por las CMO en el encéfalo de los animales receptores (fusión celular o transdiferenciación), requiere un procesamiento experimental mucho más laborioso. Es por ello por lo que nos planteamos el establecimiento de las colonias de animales *PCD-R26R* y *CRE-GFP* como uno de los objetivos prioritarios de nuestro trabajo. Posteriormente, para poder continuar con los experimentos de trasplantes de médula ósea aquí comenzados, establecimos también la colonia *PCD-(CRE-GFP)*.

La colonia *PCD-R26R*

Cuando iniciamos este trabajo disponíamos ya de la colonia *PCD* y de un sistema adecuado para poder genotiparla. Al proponernos introducir el gen reportero *LacZ* (con la estructura propia de la línea de ratones R26R; Figura 5) en animales de aquella colonia, hubo que tener en cuenta que el sistema de identificación de la mutación *pcd*, basado en la asociación de los alelos silvestre y mutante a distintos fondos genéticos, no debía verse afectado.

Los ratones originales R26R del Dr. Álvarez Dolado eran de la estirpe C57BL/6J, por lo que para poder mantener nuestro sistema para genotipar la mutación *pcd*^H tuvimos que realizar un paso intermedio previo al establecimiento de la nueva colonia *PCD-R26R*. Este paso intermedio consistió en transferir la estructura genética propia de los ratones R26R (de la estirpe original C57BL/6J) a la estirpe DBA/2J. Para ello se realizó un primer grupo de cruces entre animales R26R (C57BL/6J), homocigotos para *LacZ* (*lac/lac*), con animales de la estirpe DBA/2J sin el gen reportero *LacZ* (-/-). Todos los descendientes de estos cruces presentaron el *LacZ* en heterocigosis (*lac/-*) y un fondo genético híbrido de las dos estirpes anteriores (C57BL/6J-DBA/2J). El cruce de este tipo de animales entre sí resultó en 9 tipos distintos de genotipos con distintas probabilidades mendelianas (no mostradas), en función de la presencia del gen reportero *LacZ* y de su fondo genético para la región del cromosoma 13 que nos permite genotipar la mutación *pcd*^H (Figura 15).

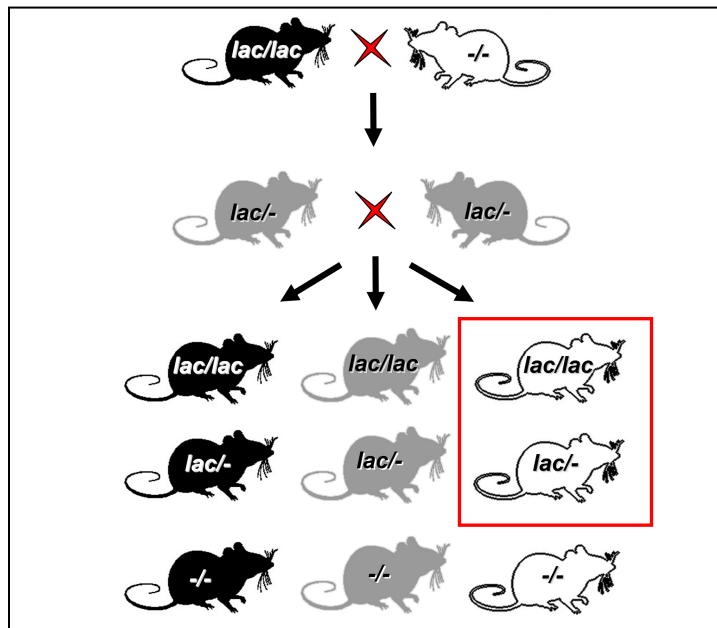


Figura 15. Esquema de la incorporación del gen reportero *LacZ* a ratones con fondo genético DBA/2J. Los colores hacen referencia al fondo genético de cada animal en la región del cromosoma 13 portadora de la mutación *PCD*. Negro: C57BL/6J; Blanco: DBA/2J; Gris: C57BL/6J-DBA/2J. El genotipo para *LacZ* se encuentra escrito en el interior de cada ratón. Los grupos que permiten transferir el *LacZ* a animales de la colonia *PCD*, sin afectar al sistema de genotipado de la mutación, están señalados con un cuadrado rojo.

De todos ellos, los que nos interesan son los que portan el gen reportero *LacZ* (*lac/lac* o *lac/-*) con el fondo genético DBA/2J en la región de interés del cromosoma 13. El genotipado de todos estos animales se llevó a cabo como hemos descrito anteriormente en la sección de Material y Métodos.

El siguiente paso consistió en el cruce de esos animales homocigotos para el gen reportero *LacZ* (*lac/lac*) con animales heterocigotos ($+/pcd$) de la colonia *PCD*. Fruto de ese cruzamiento se obtuvieron dos tipos distintos de animales: homocigotos dominantes ($+/+$) y heterocigotos ($+/pcd$) para la mutación *pcd*^{1J}, todos ellos heterocigotos para el gen reportero *LacZ* (*lac/-*; Figura 16). El cruce de esos animales heterocigotos entre sí resultó en 9 tipos distintos de genotipos, en función de la expresión de la mutación *pcd*^{1J} y de la presencia del gen *LacZ* (Figura 16). De todos ellos se seleccionaron los animales ($+/pcd$)-(*lac/lac*), como parentales idóneos para el mantenimiento de la colonia y para poder obtener animales receptores ($+/+$)-(*lac/lac*) y (*pcd/pcd*)-(*lac/lac*), que permiten afrontar con garantías el análisis de los eventos de fusión en animales silvestres y mutantes *PCD*.

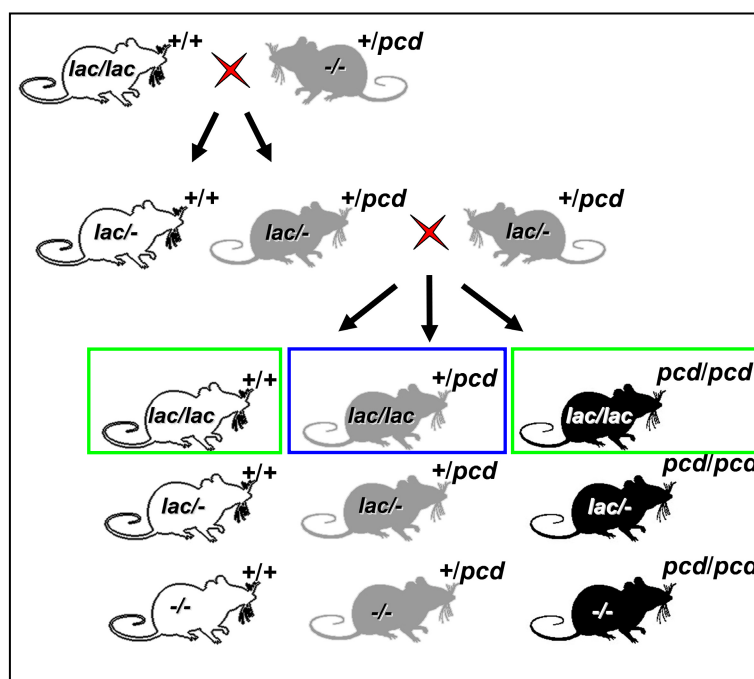


Figura 16. Establecimiento de la colonia *PCD-R26R*. La utilización de animales de la colonia *PCD* portadores de mutación *pcd*^{1J} ($+/pcd$) en el primero de los cruces permite asociar el genotipo para esta mutación de los animales descendientes con el fondo genético del cromosoma 13 utilizado para su identificación (descrito en detalle en el Material y Métodos). Así pues, los colores de los animales en el esquema no sólo hacen referencia al fondo genético de esta región, sino también al genotipo para *PCD*, representado al lado. Negro: C57BL/6J (*pcd/pcd*); blanco: DBA/2J ($+/+$); gris: C57BL/6J-DBA/2J ($+/pcd$). El genotipo para *LacZ* se encuentra escrito en el interior de cada ratón. Los parentales idóneos para poder expandir y mantener la colonia ($+/pcd$)-(*lac/lac*), conservando el sistema para el genotipado de la mutación *PCD*, están contenidos en un cuadrado azul; mientras que los animales receptores, silvestres y mutantes, necesarios para este estudio, están recuadrados en verde.

Al igual que en el caso de la incorporación del gen reportero *LacZ* a la estirpe DBA2J, el genotipado de todos estos animales se llevó a cabo como hemos descrito anteriormente en el Material y Métodos.

La colonia CRE-GFP

Paralelamente al establecimiento de la colonia de animales *PCD-R26R*, efectuamos el establecimiento de la colonia CRE-GFP de la que llegar a obtener los animales donantes que nos permitiesen disponer de una herramienta para ser capaces de discernir el proceso de plasticidad seguido por las CMO en el encéfalo de los animales de la colonia *PCD-R26R* trasplantados. Esta nueva colonia se originó mediante el cruce de animales homocigotos para el gen de la recombinasa Cre (*cre/cre*) con animales heterocigotos (*gfp/+*) que sintetizan la proteína GFP. La baja viabilidad de los animales homocigotos para el gen de la GFP (*gfp/gfp*) limitó el uso de estos animales para la cría (observaciones propias). Fruto de ese primer cruzamiento se obtuvieron dos tipos distintos de animales para el gen de la GFP, heterocigotos (*gfp/+*) y homocigotos sin el gen (*+/+*), todos ellos heterocigotos para el gen de la recombinasa Cre (*+/cre*; Figura 17). El cruzamiento de esas dos poblaciones de animales entre sí produjo 6 tipos distintos de ratones, en función del genotipo para la GFP y para la recombinasa Cre. De esos 6 tipos distintos de descendientes, se seleccionaron los animales que presentaron el gen de la recombinasa Cre y el GFP en heterocigosis (*gfp/+*) como donantes idóneos para trasplantar a animales de la colonia *PCD-R26R* (Figura 17).

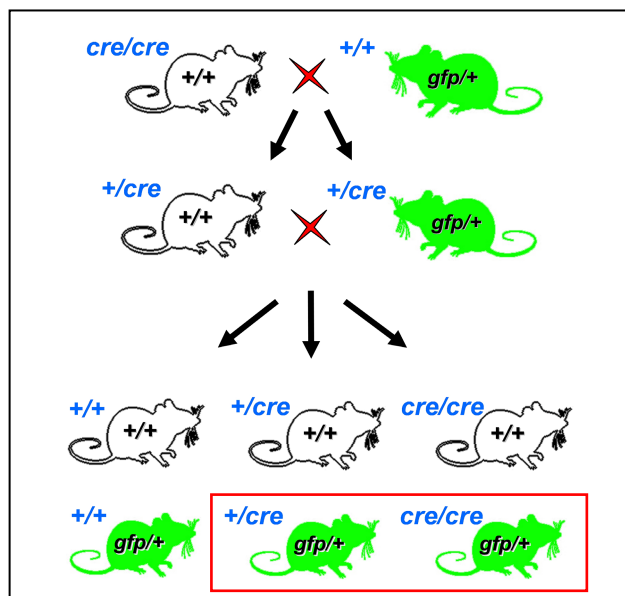


Figura 17. Establecimiento de la colonia CRE-GFP. El genotipo para el gen de la recombinasa Cre se encuentra detallado en color azul encima de cada uno de los animales, en cuyo interior se recoge el genotipo para GFP. Los animales que son realmente verdes están coloreados consecuentemente. Los animales seleccionados como donantes idóneos para poder distinguir el proceso de plasticidad (fusión o transdiferenciación) seguido por las CMO en el encéfalo de los animales de la colonia *PCD-R26R* trasplantados se encuentran en el recuadro rojo.

La identificación de todos los animales se llevó a cabo siguiendo los pasos descritos en el apartado de Material y Métodos.

La colonia *PCD*-(*CRE-GFP*)

Finalmente, con el objetivo de llegar a obtener animales mutantes *PCD* con las características propias de los animales *CRE-GFP*, de manera que puedan ser utilizados como donantes, creamos la colonia de animales *PCD*-(*CRE-GFP*). El establecimiento de esta nueva colonia se realizó mediante cruces entre animales procedentes de la colonia original *PCD*, sin el gen reportero *LacZ*, y animales de la colonia *CRE-GFP*. En todos estos cruces se tuvo en cuenta el mantenimiento de las condiciones necesarias para la identificación de la mutación *pcd*^{1J}. A este respecto, puesto que la colonia *CRE-GFP* había sido originada mediante cruzamientos entre animales de las estirpes BALB/c-Tg(CMV-cre)1Cgn/J y C57BL/6J, para realizar el cruce inicial de la nueva colonia *PCD*-(*CRE-GFP*), hubo que seleccionar aquellos animales (*cre/cre*)-(gfp/+), que no presentaban un fondo genético de C57BL/6J en la región del cromosoma 13 que utilizamos para genotipar la mutación *pcd*^{1J} (concretamente los microsatélites D13Mit250 y D13Mit283). En los ratones de la estirpe BALB/c, el microsatélite D13Mit250 es un fragmento de 120 pb, ligeramente mayor que en la estirpe DBA/2J (116 pb), aunque lo suficientemente distinto de la estirpe C57BL/6J, en la que ocupa 130 pb, como para poder ser distinguibles al separarlos en un gel de agarosa mediante electroforesis. Lo mismo sucede en el caso del segundo microsatélite (D13Mit283), que es un fragmento de 126 pb en la estirpe BALB/c y de 114 pb en la estirpe C57BL/6J. Al igual que en el caso de la colonia *PCD*, para asegurarnos de que a lo largo de las generaciones su localización no se veía afectada por fenómenos de recombinación, se utilizaron ambos microsatélites en su genotipado. Una vez seleccionados los animales de la colonia *CRE-GFP* adecuados, se cruzaron con animales de la colonia *PCD*, heterocigotos para la mutación (+/*pcd*). Fruto de ese primer cruzamiento se obtuvieron 4 tipos distintos de animales, todos ellos heterocigotos para el gen de la recombinasa Cre (+/*cre*), y homocigotos o heterocigotos tanto para la mutación *pcd*^{1J} (+/+; +/*pcd*) como para el gen de la GFP (+/+; gfp/+; Figura 18). El cruce de los animales heterocigotos, tanto para el gen de la recombinasa Cre (+/*cre*) como para la mutación *pcd*^{1J} (+/*pcd*), entre sí, siendo uno de los dos animales heterocigoto para el gen de la GFP (gfp/+), originó 18 tipos distintos de animales. De todos ellos, los donantes idóneos para el *homotrasplante* de animales *PCD* son los animales mutantes *PCD* (*pcd/pcd*), verdes (gfp/+) y con el gen de la recombinasa Cre (Figura 18).

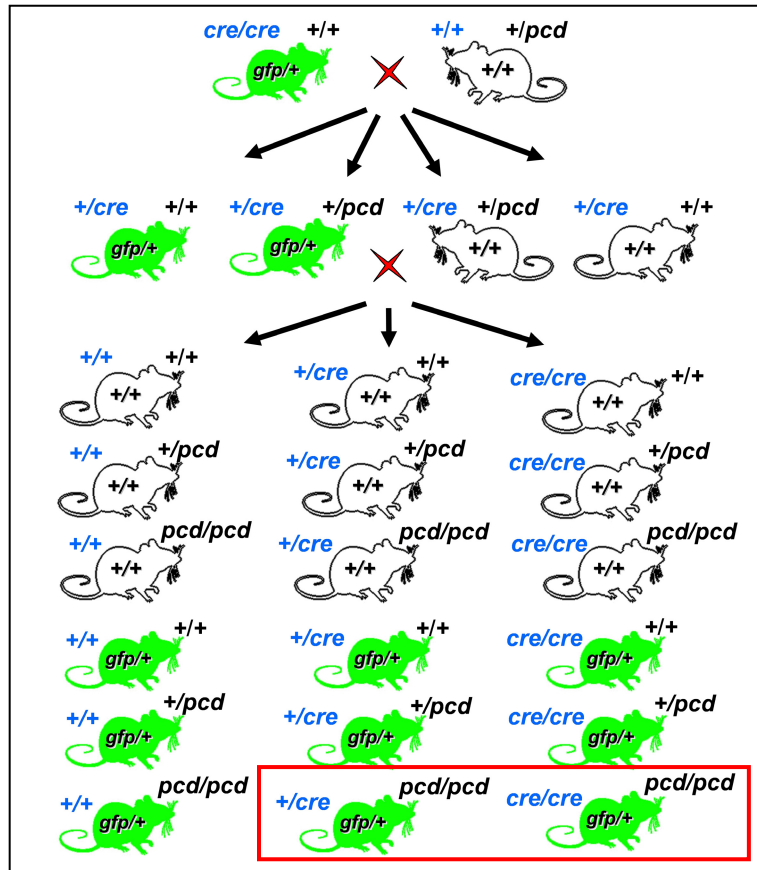


Figura 18. Establecimiento de la colonia PCD-(CRE-GFP). Encima de cada uno de los animales se detallan los genotipos, tanto para el gen de la recombinasa Cre (en azul), como para la mutación pcd^{fl} (en negro), a izquierda y derecha, respectivamente. En el interior de cada animal se detalla el genotipo para el gen de la GFP. Los animales donantes idóneos para ser utilizados como *homotrasplante* en animales mutantes PCD de la colonia PCD-R26R se encuentran incluidos en un recuadro rojo.

La identificación de los animales originados tras cada uno de los cruces realizados se llevó a cabo siguiendo los procedimientos detallados para el genotipado de la mutación pcd^{fl} y para la identificación de los animales de la colonia CRE-GFP (ver apartados anteriores).

Establecimiento de la dosis de radiación

El siguiente objetivo que nos planteamos para este trabajo fue el de establecer la dosis óptima de radiación (**dosis letal mínima**) necesaria para conseguir la ablación de la médula ósea de nuestros animales receptores. La eliminación de la médula es un paso imprescindible para poder realizar con éxito experimentos de trasplante de médula ósea, ya que hay que facilitar un nicho a las células de la médula ósea trasplantada, eliminando la médula ósea propia del animal receptor. Una ablación parcial de la médula del receptor

conllevaría un mantenimiento de parte de su propia médula y, por tanto, tras el trasplante, existiría una menor proporción de células procedentes de la médula ósea trasplantada en el sistema hematopoyético del animal receptor. La importancia para nuestro estudio de la existencia de un mayor número de células procedentes de la médula ósea trasplantada radica en dos aspectos fundamentales: por un lado, puesto que las células de la médula ósea del donante están marcadas para poder ser identificadas en los animales receptores, a mayor número de éstas, la probabilidad de identificar las CMO que están llegando a los diferentes tejidos del receptor es mayor. Por otro lado, puesto que el fin último de nuestro estudio es realizar una aproximación al efecto del trasplante de una médula ósea “sana” en animales con neurodegeneración, cuantas más células de la médula ósea trasplantada estén presentes en el animal mutante después del trasplante, mejor se conocerá su efecto.

En este trabajo hemos utilizado dos fuentes diferentes de radiación: una fuente de ^{60}Co y una fuente de ^{137}Cs (ver sección de Material y Métodos). Inicialmente, comenzamos nuestros estudios de trasplantes utilizando la fuente de ^{60}Co , del Servicio de Radioterapia del Hospital Universitario de Salamanca. Al producirse el cierre de la unidad de ^{60}Co , nos vimos obligados a cambiar de fuente de radiación. Afortunadamente, la clausura de ese equipo coincidió con la apertura del Laboratorio de Imagen Molecular del SEA de la Universidad de Salamanca.

La puesta a punto de la dosis de radiación necesaria con la primera de las fuentes (^{60}Co) resultó bastante sencilla, ya que ese equipo estaba siendo utilizado con el mismo fin por el Dr. Ignacio Sánchez-Abarca. Así pues, simplemente hubo que corroborar (datos no mostrados) que la dosis previamente estandarizada por el Dr. Sánchez-Abarca de 7,5 Gy en la línea media del animal era adecuada para las características propias de nuestros animales (estirpe, edad (P19) y presencia de la mutación *pcd*^{1b}).

Fuente de $^{137}\text{Cesio}$

La fuente de ^{137}Cs era un equipo de irradiación completamente nuevo, por lo que hubo que realizar una serie de pruebas hasta aproximarnos a la **dosis letal mínima** más adecuada para las características de nuestros animales. Para ello, tomamos inicialmente como referencia la dosis utilizada con la fuente de ^{60}Co (7,5 Gy), y realizamos pruebas con dosis de radiación cercanas a la propia experimentada y a la recomendada por el fabricante (9 Gy). Realizamos 6 grupos experimentales, con 4 animales cada uno, en los que se probaron valores de dosis de radiación de 6,5; 7,5; 8,5; 9; 9,5 y 10 Gy. Tras la radiación, los animales se mantuvieron en condiciones “sucias” y sin trasplante, para poder conocer el efecto

de cada una de las dosis de radiación en la supervivencia de los animales. En la Tabla 10 se encuentran recogidos los tiempos medios de supervivencia (días \pm error estándar de la media, ESM) de cada uno de los grupos de animales según la dosis de radiación (Gy).

| Dosis de radiación (Gy) | Días de supervivencia (\pm ESM) |
|-------------------------|------------------------------------|
| 6,5 | ∞ |
| 7,5 | $9,75 \pm 0,4$ |
| 8,5 | $9,00 \pm 0,4$ |
| 9,0 | $8,50 \pm 0,2$ |
| 9,5 | $6,50 \pm 0,2$ |
| 10,0 | $6,00 \pm 1,3$ |

Tabla 10. Días de supervivencia después de la radiación según la dosis.

Hay que destacar que en el grupo de 6,5 Gy solamente murió uno de los cuatro animales irradiados. El resto vivió durante varios meses hasta su sacrificio, por lo que, en la tabla anterior, su tiempo de supervivencia aparece representado con el símbolo ∞ . En la siguiente gráfica (Figura 19) se representa el porcentaje de animales supervivientes para cada uno de los grupos de dosis de radiación según el tiempo (número de días transcurridos después de la radiación).

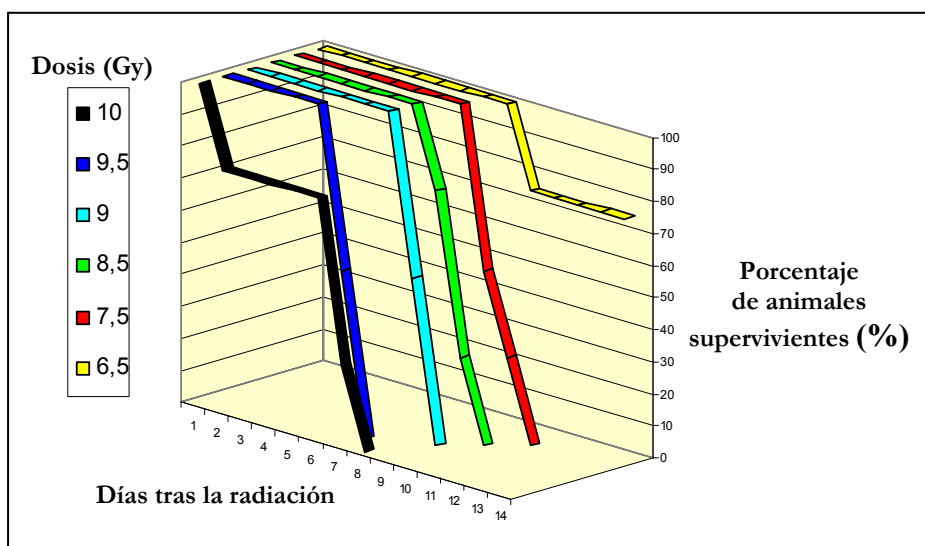


Figura 19. Porcentaje de animales supervivientes para cada uno de los grupos de dosis de radiación según el número de días transcurridos tras la radiación. El eje Y se corresponde con el porcentaje de animales supervivientes de cada uno de los grupos de experimentación, que están representados con líneas de distinto color según la dosis de radiación. Los días transcurridos después de la radiación se representan en el eje X. Se puede apreciar cómo existe una relación inversa entre la dosis de radiación y el tiempo de supervivencia de los animales: a mayor dosis de radiación, menor tiempo de supervivencia.

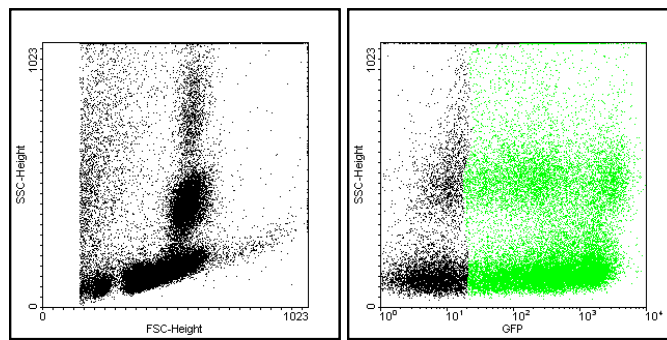
A la vista de estos resultados, se estableció que 7,5 Gy era la dosis más adecuada de radiación con la fuente de ^{137}Cs para las características propias de nuestros animales. Posteriormente, se pudo comprobar cómo el trasplante de médula ósea al día siguiente de la radiación era capaz de salvar de una muerte segura a los animales irradiados. No obstante, en todos los experimentos posteriores se dejó siempre un animal en condiciones “sucias” y sin trasplante, como control del efecto de la radiación. Este animal, al que denominamos **control de radiación**, nos permitió corroborar en todos los experimentos tanto la eficacia del proceso de radiación como la eficiencia del proceso de trasplante posterior. Todos los controles de radiación murieron entre los 9 y 11 días posteriores a su irradiación.

Análisis de la incorporación de las células del donante en el hospedador

El análisis de la incorporación de las células trasplantadas en los animales receptores se llevó a cabo mediante citometría de flujo de sangre periférica. Este análisis se realizó en todos los animales trasplantados con médula ósea procedente de donantes fluorescentes CRE-GFP. A continuación, presentamos una muestra de los resultados obtenidos de este tipo de análisis perteneciente a un animal donante CRE-GFP (control positivo), a un animal de la colonia *PCD-R26R* sin trasplante (control negativo) y a dos animales trasplantados, uno de forma intraperitoneal y otro de forma intravenosa. Las posibles diferencias entre ambos tipos de trasplante serán analizadas posteriormente, en función de los resultados presentados en la Tabla 11 sobre el porcentaje de células GFP positivas en sangre periférica de los dos grupos experimentales (intraperitoneal e intravenoso) a distintos tiempos.

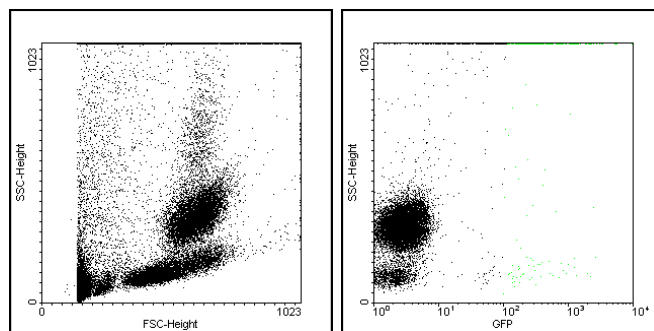
Los resultados para cada uno de estos animales se representan mediante dos gráficas y una cifra, que se corresponde con el porcentaje de células GFP positivas en su sangre periférica. La primera de las gráficas muestra todos los elementos presentes en la muestra sanguínea. En el eje Y, se recogen los valores de SSC (Side Scatter) que representan la complejidad estructural interna de la célula. En el eje X, se recogen los valores de FSC (Forward Scatter) que constituyen una medida proporcional al tamaño celular. En la segunda gráfica se representan los valores de SSC de esas células frente a la emisión de fluorescencia verde (GFP). En las siguientes figuras (20-23) se presentan los resultados pertenecientes a un animal de cada uno de los grupos estudiados, como muestra representativa de este tipo de estudio.

Figura 20. Resultados obtenidos del análisis de un donante CRE-GFP (control positivo).



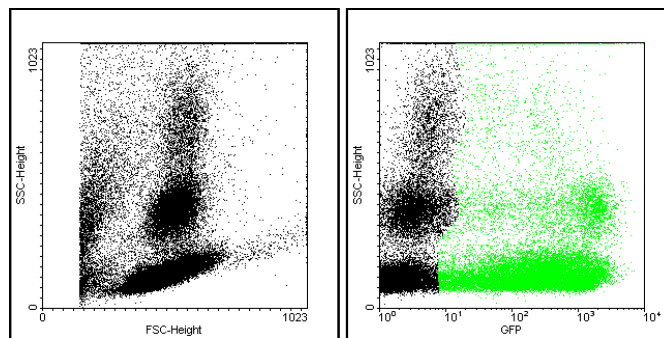
Células GFP positivas en sangre periférica = **81,13%**

Figura 21. Resultados obtenidos del análisis de un animal silvestre R26R (control negativo).



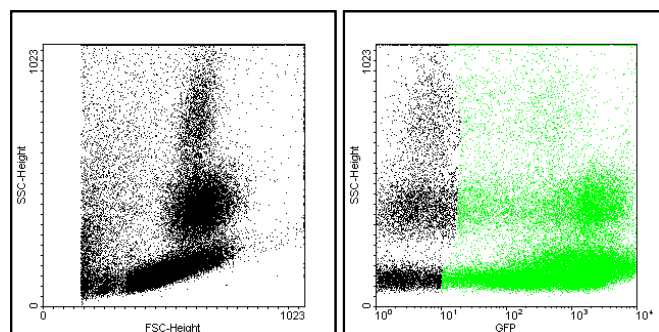
Células GFP positivas en sangre periférica = **0,88%**

Figura 22. Resultados obtenidos del análisis de un animal trasplantado intraperitonealmente.



Células GFP positivas en sangre periférica = **49,06%**

Figura 23. Resultados obtenidos del análisis de un animal trasplantado intravenosamente.



Células GFP positivas en sangre periférica = **81,80%**

A la vista de estos datos, existen importantes diferencias en el porcentaje de células GFP en los animales receptores dependiendo del tipo de trasplante (intraperitoneal o intravenoso). Así pues, nos planteamos realizar un análisis más amplio de la influencia del tipo de trasplante en la incorporación de las células trasplantadas. No entraremos aquí a discutir las ventajas e inconvenientes de cada uno de ellos, sino que nos centraremos en el porcentaje de células GFP + en sangre periférica. Este dato es un buen indicador de la efectividad del proceso de trasplante. Para este análisis se tomaron muestras de sangre periférica de animales receptores a las 2, 4 y 6 semanas después de cada trasplante. El número de animales destinados a este experimento fue de 4 para cada grupo (trasplantados intraperitonealmente y trasplantados de forma intravenosa). En los tres tiempos, se extrajo también sangre a un control positivo (animal fluorescente de la colonia CRE-GFP) y a un control negativo (animal de la colonia *PCD-R26R* sin trasplante). Los resultados (valores medios \pm ESM; Tabla 11) del porcentaje de células fluorescentes en sangre periférica de cada uno de los grupos de estudio se representan en la Figura 24.

| Tipo de trasplante | Medias de los porcentaje de células GFP+ en sangre periférica (\pm ESM) | | |
|--------------------|--|----------------|-----------------|
| | 2 semanas | 4 semanas | 6 semanas |
| Intraperitoneal | 45,8 \pm 5,5 | 47,1 \pm 2,6 | 40,7 \pm 10,5 |
| Intravenoso | 53,3 \pm 2,4 | 78,3 \pm 2,2 | 84,2 \pm 2,7 |
| Control + | 79,0 | 81,2 | 79,7 |
| Control - | 0,8 | 0,9 | 0,8 |

Tabla 11. Valores medios de los porcentaje de células GFP + en sangre periférica.

Es importante destacar que en ninguno de los animales trasplantados, independientemente del tipo de trasplante, se alcanzaron valores de células GFP positivas en sangre periférica superiores al 90%. Este hecho, junto con los datos obtenidos para el animal utilizado como control positivo (Tabla 11), nos llevó a analizar el porcentaje de células GFP positivas en todos los animales destinados a ser utilizados como donantes fluorescentes CRE-GFP en nuestros experimentos. Así, decidimos que todos aquellos animales de la colonia CRE-GFP que no alcanzaban porcentajes de células GFP positivas superiores al 70% serían desechados como donantes. El valor medio del porcentaje de células GFP positivas de los animales que fueron utilizados como donantes fue de $80,7 \pm 2,5\%$ (ESM).

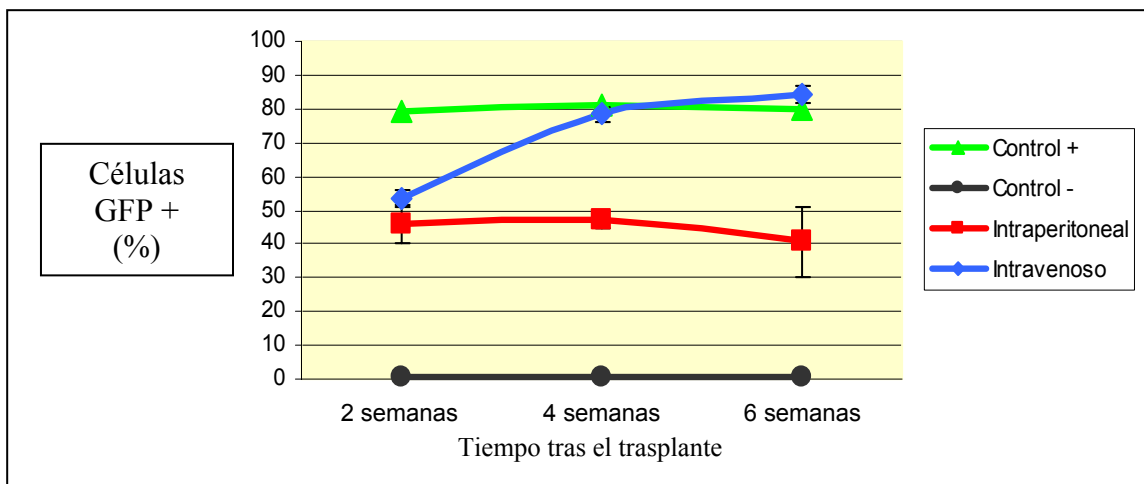


Figura 24. Representación de los valores medios de incorporación de las células del donante (GFP+) en los animales receptores, según el tipo de trasplante y el tiempo del mismo. El porcentaje de células GFP+ en la sangre periférica de los animales trasplantados de forma intravenosa es siempre superior al de los trasplantados de manera intrapéritoneal; además, las diferencias van siendo cada vez mayores con el paso del tiempo.

Por último, en el momento del sacrificio de todos los animales trasplantados con médula ósea de donantes fluorescentes, se tomó una muestra de su sangre periférica y se analizó el porcentaje de células GFP positivas. El valor medio de todos ellos fue de $74,47 \pm 1,66\%$ (ESM), y no se encontraron diferencias significativas (*t de student*; $p < 0,05$) en el porcentaje de células fluorescentes entre los animales receptores silvestres (+/+) $74,85 \pm 1,78\%$ (ESM) y los receptores portadores de la mutación *pcd*^{+/+} (*pcd/pcd*) $72,77 \pm 4,95\%$ (ESM).

Viabilidad de las células trasplantadas

Una vez realizado el trasplante, llevamos a cabo el cultivo de una pequeña fracción de las células de la médula ósea trasplantada para comprobar su viabilidad y tener un control de que las células que estábamos trasplantando estaban vivas (ver sección de Material y Métodos).

En todos los casos, las células cultivadas se adherieron al cubreobjetos introducido en el pocillo para efectuar su cultivo, poniendo de manifiesto su adecuada viabilidad. Del mismo modo, a lo largo de las distintas observaciones, se pudieron apreciar fenómenos de división celular, así como muy distintas morfologías celulares (Figura 25). Finalmente, no se observaron células que captasen el Azul Tripán, lo que corrobora su integridad estructural y su viabilidad.

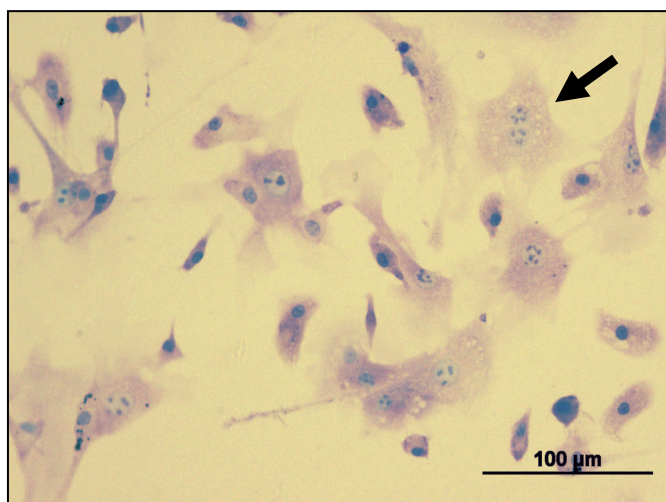


Figura 25. Microfotografía de un cultivo de células de médula ósea teñidas con azul de toluidina. En la imagen se pueden apreciar morfologías celulares variadas. Asimismo, existen células de muy diversos tamaños y distintos grados de compactación de la cromatina en sus núcleos. Algunas de las células se encontraban en procesos de división, como es el caso de la señalada en la imagen con una flecha, que presenta dos núcleos. Todo ello pone de manifiesto que las células trasplantadas están vivas y son capaces de dividirse y de diferenciarse.

Pruebas fisiológicas y de comportamiento

Recogemos aquí los resultados obtenidos de las diferentes pruebas realizadas para tener una aproximación al posible efecto funcional del trasplante de médula ósea “sana” en ratones mutantes *PCD*. Los grupos de animales (descritos en detalle en el Material y Métodos) empleados en este tipo de pruebas fueron: grupo *PCD trasplantado* (*heterotrasplantado*), grupo *PCD sin trasplante* y grupo *Silvestre* (sin trasplante). Se realizaron las pruebas de campo abierto y de velocidad media de desplazamiento.

Campo abierto

Como hemos comentado en el Material y Métodos, esta prueba da información del comportamiento exploratorio de los animales, de su capacidad motora y de su reactividad emocional. De las 5 medidas consideradas, las que más información aportan sobre la capacidad motora de los animales fueron los *cruces completos* y los *medios cruces* (ver sección de Material y Métodos). Los valores medios, con el correspondiente ESM de cada uno de los grupos de estudio (*Silvestre*, *PCD trasplantado* y *PCD sin trasplante*) en las diferentes pruebas realizadas, se recogen en las tablas 12 y 13. El valor medio total (\pm ESM) de cada grupo experimental se muestra en la última columna de cada tabla.

| Grupo \ Prueba | P35 | P50 | P65 | P80 | P95 | P110 | P125 | Media |
|----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| <i>Silvestre</i> | 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 |
| <i>PCD trasplanta-do</i> | 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 |
| <i>PCD sin tras-plante</i> | 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 12. Valores medios (\pm ESM) de *cruces completos* de la prueba de campo abierto.

| Grupo \ Prueba | P35 | P50 | P65 | P80 | P95 | P110 | P125 | Media |
|----------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----------|-----------|------------|
| <i>Silvestre</i> | 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 |
| <i>PCD trasplanta-do</i> | 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 |
| <i>PCD sin tras-plante</i> | 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 13. Valores medios (\pm ESM) de *medios cruces* de la prueba de campo abierto.

El análisis estadístico mostró diferencias altamente significativas (*U de Mann-Whitney*; $P < 0,01$) entre el grupo **Silvestre** y el grupo **PCD sin trasplante**, como era lógico esperar, para las dos medidas realizadas. En cuanto al grupo de **PCD trasplantado**, presentó diferencias altamente significativas (*U de Mann-Whitney*; $P < 0,01$): con el grupo de animales **PCD sin trasplante**, en el número de *cruces completos*; y con el grupo de animales **Silvestre**, en el número de *medios cruces* (Figura 26).

El resto de los datos obtenidos de la prueba del campo abierto estuvieron relacionados con la reactividad emocional y con el nivel de estrés al que se encontraron sometidos los animales. Se contaron el número de *limpiezas*, de *alzadas* y de *defecaciones* (ver sección de Material y Métodos) y se realizó el correspondiente análisis estadístico para ver si existían diferencias entre los 3 grupos experimentales. Todos estos datos se recogen en las siguientes tablas (14-16).

| Grupo \ Prueba | P35 | P50 | P65 | P80 | P95 | P110 | P125 | Media |
|----------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <i>Silvestre</i> | 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 |
| <i>PCD trasplanta-do</i> | 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 |
| <i>PCD sin tras-plante</i> | 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 14. Valores medios (\pm ESM) de *limpiezas* de la prueba de campo abierto.

| Grupo \ Prueba | P35 | P50 | P65 | P80 | P95 | P110 | P125 | Media |
|----------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----------|------------|
| <i>Silvestre</i> | 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 |
| <i>PCD trasplanta-do</i> | 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 |
| <i>PCD sin tras-plante</i> | 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 15. Valores medios (\pm ESM) de *alzadas* de la prueba de campo abierto.

| Grupo \ Prueba | P35 | P50 | P65 | P80 | P95 | P110 | P125 | Media |
|---------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <i>Silvestre</i> | 1,5 ± 0,2 | 2,2 ± 0,8 | 2,0 ± 1,0 | 2,2 ± 0,4 | 2,7 ± 1,1 | 2,2 ± 1,3 | 2,7 ± 0,9 | 2,2 ± 0,7 |
| <i>PCD trasplanta-</i> <i>do</i> | 1,5 ± 0,6 | 3,0 ± 1,4 | 1,7 ± 0,4 | 1,7 ± 0,8 | 3,5 ± 0,8 | 3,2 ± 1,0 | 3,7 ± 0,8 | 2,6 ± 1,0 |
| <i>PCD sin tras-</i> <i>plante</i> | 1,0 ± 0,4 | 3,0 ± 0 | 2,2 ± 0,8 | 3,0 ± 0,9 | 3,7 ± 1,1 | 2,7 ± 1,3 | 3,2 ± 1,4 | 2,7 ± 1,0 |

Tabla 16. Valores medios (\pm ESM) de defecaciones de la prueba de campo abierto.

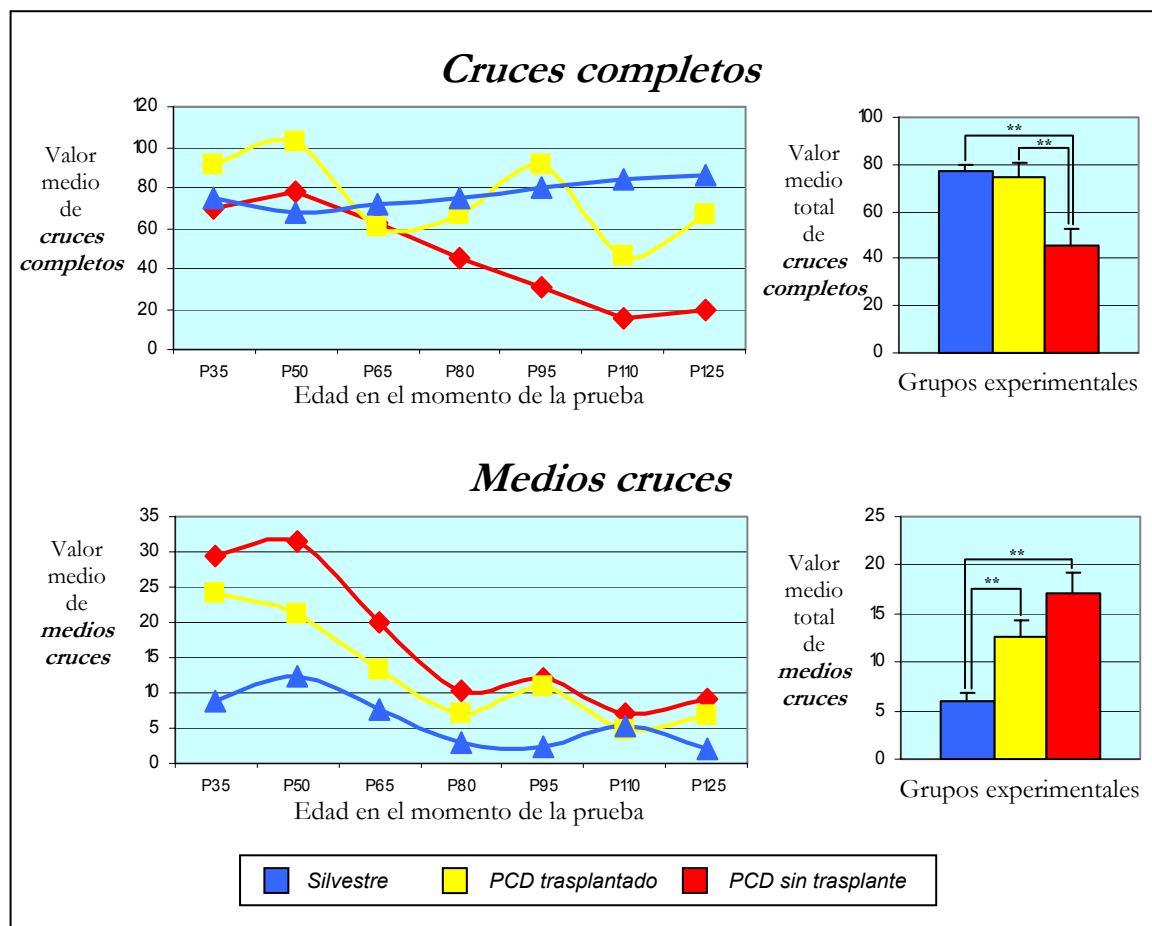


Figura 26. Representación de los datos obtenidos de la prueba de campo abierto, relacionados con la capacidad de movimiento, de los 3 grupos experimentales. En la parte superior se presentan los datos de *cruces completos*. A la izquierda, los resultados obtenidos de cada una de las pruebas y, a la derecha, 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.

En el caso de las *limpiezas*, no se encontraron diferencias entre el grupo de animales *Silvestre* y el de *PCD trasplantado*. Sin embargo, los resultados de ambos grupos fueron estadísticamente significativos (*Bonferroni*; $P < 0,01$) para esta medida con relación al grupo de animales *PCD sin trasplante*. En cuanto al número de *alzadas*, se encontraron diferencias altamente significativas (*Bonferroni*; $P < 0,01$) entre los tres grupos. Por último, los valo-

res para *defecaciones* no mostraron diferencias estadísticas entre ninguno de los grupos. Este hecho pone de manifiesto que el nivel de estrés al que estuvieron sometidos los animales de los 3 grupos experimentales fue similar.

Los resultados anteriores para cada uno de los parámetros considerados se presentan en las siguientes gráficas (Figura 27).

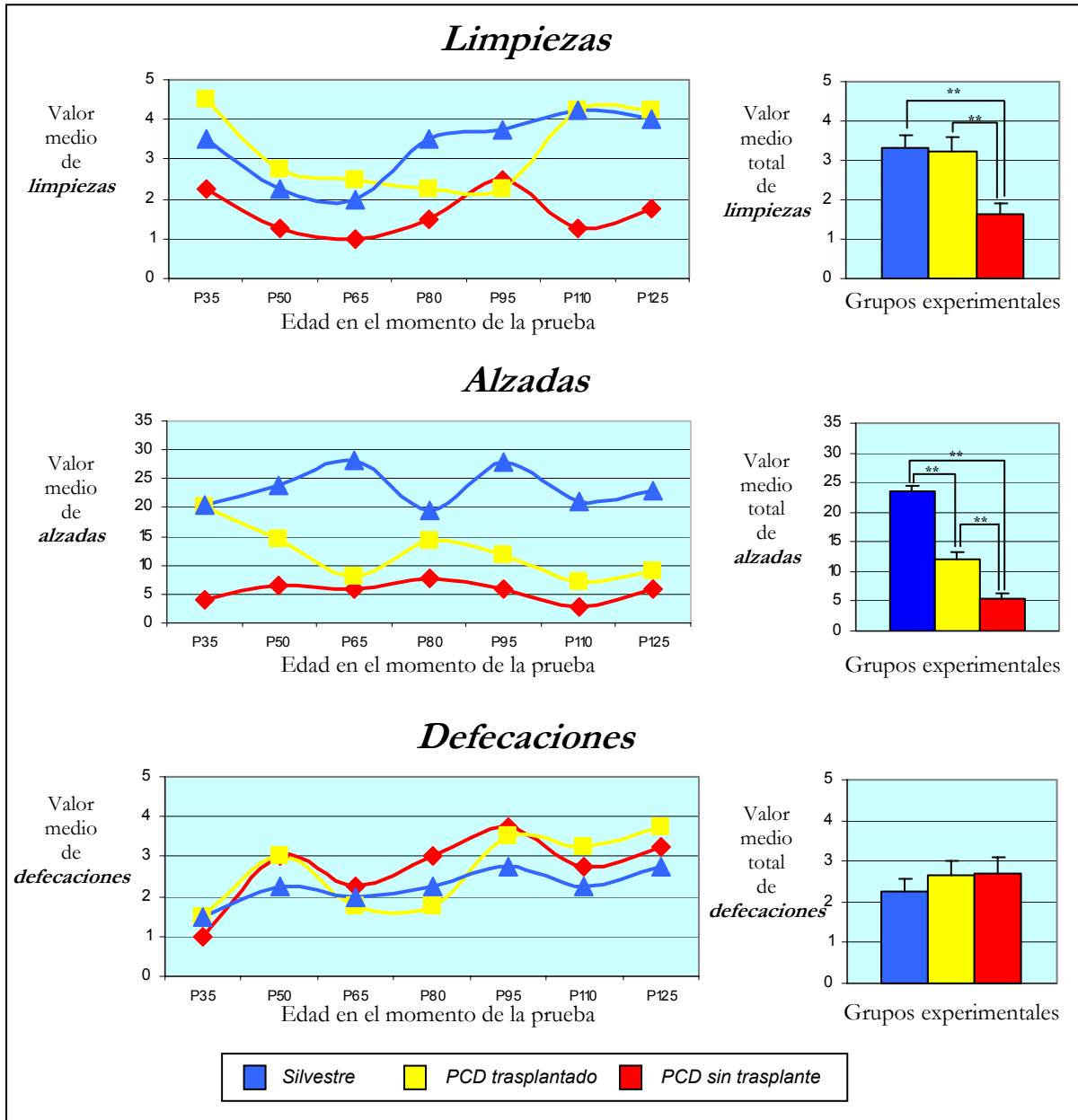


Figura 27. Representación de los datos de reactividad emocional obtenidos de la prueba de campo abierto de los 3 grupos experimentales. En la parte superior se presentan los datos de *limpiezas*; en el centro, los de *alzadas* y abajo, los de *defecaciones*. En los tres casos se representan, a la izquierda, los resultados obtenidos de cada una de las pruebas y, a la derecha, los resultados totales 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.

Velocidad media de desplazamiento

Finalmente, se realizó también un análisis de la *velocidad media de desplazamiento* (mm/s) de cada animal. Los valores medios (\pm ESM) de cada grupo en cada una de las pruebas y su valor medio total (\pm ESM) se encuentran recogidos en la siguiente tabla (Tabla 17).

| Grupo \ Prueba | P35 | P50 | P65 | P80 | P95 | P110 | P125 | Media |
|---------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|
| <i>Silvestre</i> | 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 |
| <i>PCD trasplanta-</i> <i>do</i> | 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 |
| <i>PCD sin tras-</i> <i>plante</i> | 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 17. Valores medios (\pm ESM) de *velocidad media de desplazamiento* (mm/s).

Los valores se expresan en mm/s para facilitar su interpretación. Tras el correspondiente análisis estadístico, se encontraron diferencias altamente significativas (*U de Mann-Whitney*; $P < 0,01$) entre los 3 grupos de animales. En la Figura 28 se representan los resultados de *velocidad media de desplazamiento* para cada uno de los grupos experimentales.

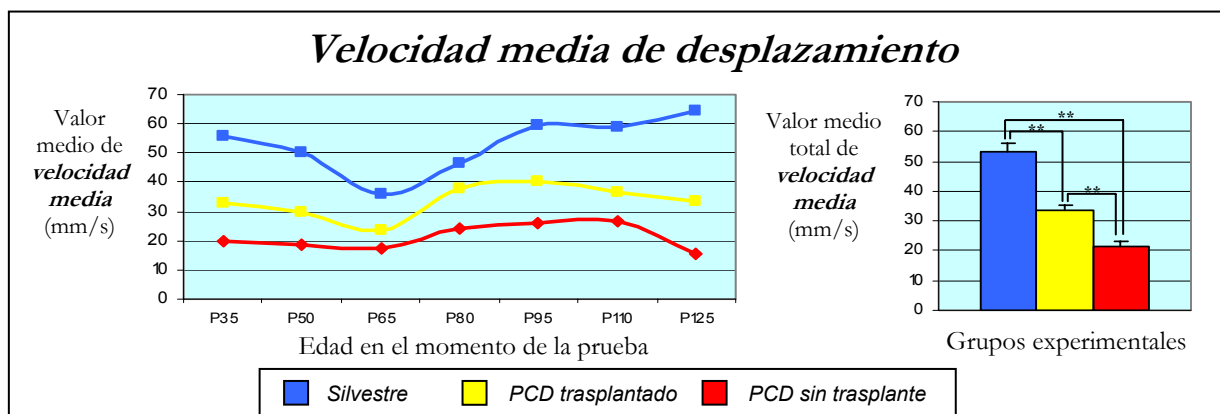


Figura 28. Representación de los datos de *velocidad media de desplazamiento* de los 3 grupos experimentales. A la izquierda, se representan los valores medios de los 3 grupos experimentales en cada una de las 7 pruebas realizadas. A la derecha, se han juntado los valores de cada grupo y se ha realizado 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 realización de la prueba de *velocidad media de desplazamiento*, entre los animales de cada uno de los tres grupos experimentales se observaron importantes diferencias en la forma de apoyar la planta de los pies. Los animales del grupo **Silvestre** apoyaban siempre los dedos al andar. Los **PCD sin trasplante** se desplazaban siempre sobre sus talones. Sin embargo, los **PCD trasplantados** apoyan en ocasiones también los dedos. En las imágenes contenidas en la Figura 29 se puede ver claramente esta diferencia en un animal de cada grupo experimental.



Figura 29. Fotogramas capturados gracias a los vídeos realizados durante la prueba de *velocidad media de desplazamiento* de un animal de cada grupo experimental. 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 “sana”–, 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 esta observación, intentamos incluir una prueba para medir el patrón de marcha del animal a través de su impronta plantar, conocida como “footprinting”. Esta prueba se basa en el análisis de las huellas dejadas por el animal al desplazarse en un mismo sentido por una superficie horizontal. Debemos manifestar que, debido al estado de los animales mutantes **PCD sin trasplante**, fuimos incapaces de llevarla a cabo en la mayoría de los animales de este grupo experimental, y que, en los que se consiguió realizar, no se pudo hacer un análisis posterior de las huellas dejadas (Figura 30). 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 resultar muy ilustrativo, presentar una imagen de las huellas dejadas por un animal de cada grupo experimental.

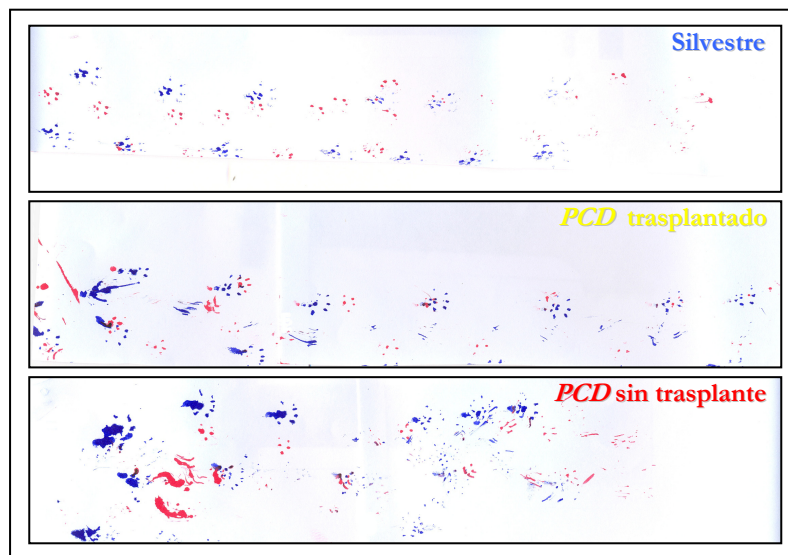


Figura 30. Imágenes de las huellas dejadas por un animal de cada grupo experimental al desplazarse en el mismo sentido por una superficie horizontal. Para poder distinguir las distintas huellas dejadas, los animales tenían las patas delanteras manchadas con pintura de color rojo y las traseras de color azul. El movimiento se realizó de izquierda a derecha según la imagen. 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.

Puesta a punto de sistemas de visualización de las células trasplantadas

El siguiente de los objetivos que nos planteamos al comienzo de esta Tesis Doctoral fue el de poner a punto los diferentes sistemas de visualización de las células trasplantadas. En experimentos de trasplante de médula ósea como el nuestro, en los que se investiga el efecto de las células trasplantadas y su posible llegada e integración en los diferentes tejidos de los animales receptores, resulta esencial poder identificar las células del donante en el receptor. En el caso de los animales trasplantados con donantes CRE-GFP, no hubo que poner a punto ningún sistema nuevo de visualización, ya que se realizó mediante inmunofluorescencia indirecta o mediante histoquímica, dos técnicas de uso rutinario en nuestro laboratorio. Sin embargo, en el caso de los animales trasplantados con donantes machos, hubo que realizar numerosas pruebas hasta poner a punto el protocolo definitivo de identificación del cromosoma Y, descrito en detalle en el apartado de Material y Métodos.

Células procedentes de donantes machos

Para la puesta a punto de un sistema de identificación de las CMO procedentes de donantes machos en el encéfalo de receptores hembras, se tomó inicialmente como referencia el protocolo proporcionado por la Dr.^a Mezey para tejido fresco. Por tanto, las primeras pruebas se realizaron con tejido fresco para comprobar la especificidad de la sonda sintetizada *in situ*, pues hasta entonces sólo se conocía la especificidad de su secuencia (ver sección de Material y Métodos). Para ello, se realizó dicho protocolo de hibridación *in situ* para tejido fresco en secciones del encéfalo de ratones machos y hembras, como controles positivo y negativo, respectivamente (Figura 31). En esta primera prueba se probaron distintos grosores de corte para identificar el espesor máximo en el que la sonda presenta una penetración adecuada en el tejido.

De los grosores que se probaron (10, 12, 14, 16 y 18 μm), la penetración de la sonda fue la correcta hasta un máximo de 14 μm . En secciones de mayor grosor, se encontraron regiones del interior del tejido procedente de animales machos con núcleos celulares sin dicha señal cromosómica.

Con estas primeras pruebas, no sólo conseguimos establecer el grosor máximo adecuado, sino que pudimos comprobar que la técnica funcionaba perfectamente con tejido fresco y que la sonda sintetizada era específica para el cromosoma Y de los ratones machos

con la mezcla de estirpes utilizadas en nuestro estudio. Sin embargo, la utilización de tejido fresco presentaba múltiples inconvenientes que desaconsejaban su utilización en nuestro protocolo de trabajo. Éstos estaban determinados por la complejidad para la disección del encéfalo en buenas condiciones –principalmente los bulbos olfatorios–, por los problemas a la hora de almacenar el tejido y por la dificultad para obtener secciones según planos comparables entre los distintos animales. Además, de manera especial, estos inconvenientes surgen al realizar técnicas de inmunofluorescencia, determinados por la falta de antigenicidad de algunas moléculas o por su elución del tejido en ausencia total de fijación. Por todo ello, nos planteamos la necesidad de poner a punto un protocolo de hibridación *in situ* de cromosoma Y de ratón para su utilización con material fijado.

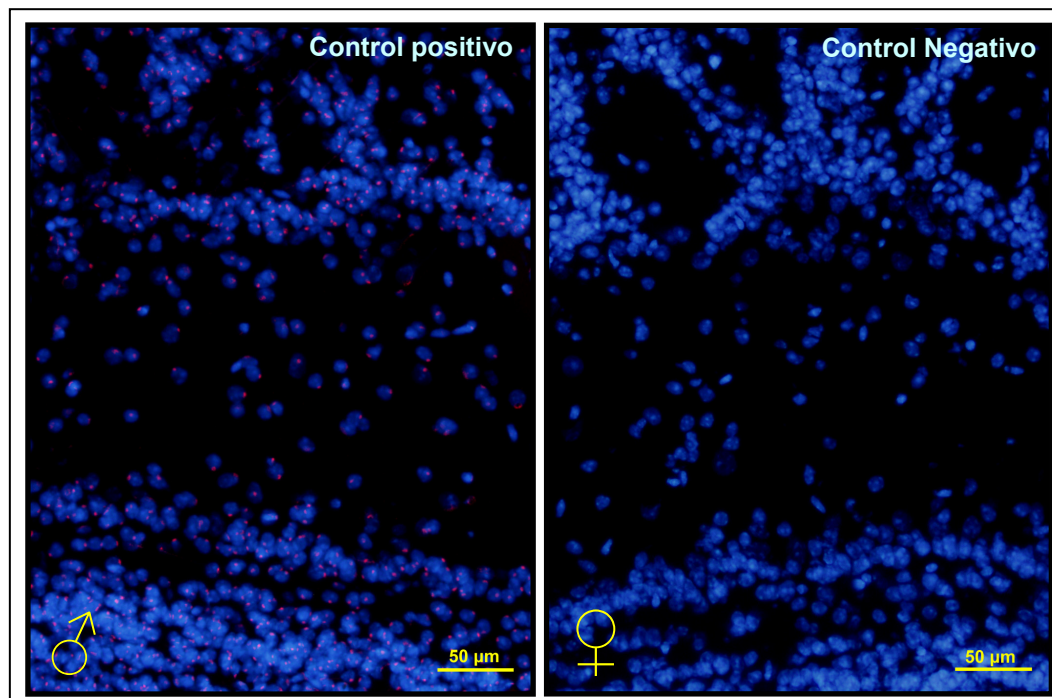


Figura 31. Secciones del BO (tejido fresco) de un ratón macho (control positivo) y de un ratón hembra (control negativo) en los que se ha realizado la hibridación *in situ* de cromosoma Y. El cromosoma Y está marcado en rojo y los núcleos se encuentran contrateñidos con DAPI (azul). El cromosoma Y se encontró localizado en la periferia de los núcleos. No se encontraron células positivas para el marcaje del cromosoma Y en secciones de animales hembras sin trasplante.

Así pues, llevamos a cabo la perfusión de varios animales con distintas cantidades de fijador de Zamboni (50, 100 y 150 ml; ver sección de Material y Métodos) para probar cuál era la cantidad máxima que podía ser utilizada sin que la técnica de la hibridación *in situ* del cromosoma Y se viese comprometida. En todas estas pruebas, tras la perfusión con el fijador, se realizó un lavado del árbol vascular con 50 ml de PBS para evitar la exposición

posterior del tejido al fijador y, por tanto, una fijación más prolongada. Una vez diseccionados los encéfalos y seccionados a 14 μm , se realizó en todos ellos la hibridación *in situ* en las mismas condiciones. La técnica de la hibridación *in situ* del cromosoma Y sólo funcionó con un volumen de 50 ml, el menor de los tres volúmenes utilizados. Pese a ser bastante escaso, este volumen resultó suficiente para conseguir solventar todos los problemas enumerados anteriormente y, lo más importante, permitió la perfecta identificación de todos los antígenos celulares necesarios para nuestro estudio (ver Tabla 7).

Puesta a punto de la doble inmunofluorescencia-hibridación in situ

La primera de las opciones que barajamos a la hora de poner a punto este protocolo fue la de realizar, primero, la hibridación *in situ* del cromosoma Y y, después, la técnica de inmunofluorescencia sobre esas mismas secciones. La elección de este orden se hizo pensando en que, en el caso de poderse llevar a cabo con éxito la doble inmunofluorescencia-hibridación *in situ* de esta manera, nos permitiría realizar el análisis de las secciones en dos pasos consecutivos: un primer paso para la identificación de las células procedentes del donante (con cromosoma Y), y un segundo paso en el que se realizaría la caracterización neuroquímica de esas células. De este modo, sólo habría que hacer la técnica de inmunofluorescencia en aquellas secciones del encéfalo de receptores hembras trasplantados con médula ósea de donantes machos en las que se hubiesen detectado con anterioridad células con cromosoma Y. Este procesamiento en dos pasos consecutivos conllevaría un considerable ahorro de recursos y de tiempo. Desafortunadamente, los diferentes tratamientos a los que se somete el tejido para poder realizar la hibridación *in situ* del cromosoma Y, sobre todo las elevadas temperaturas de incubación (81 °C), resultaron incompatibles a la hora de desarrollar la detección de un antígeno mediante inmunofluorescencia.

Una vez desechada esa opción, pasamos a poner a punto un protocolo para la doble inmunofluorescencia-hibridación *in situ* cambiando el orden de las dos técnicas: primero, la inmunofluorescencia para los diferentes antígenos buscados y, a continuación, la hibridación *in situ* del cromosoma Y. La inmunofluorescencia funcionó perfectamente en todos los casos; sin embargo, al realizar la hibridación *in situ* sobre esas mismas secciones, desaparecía el marcaje fluorescente producido.

A la vista de estos resultados, consideramos que los diferentes tratamientos de la hibridación *in situ* podrían estar afectando negativamente a las moléculas fluorescentes con las que estaban marcados los anticuerpos secundarios. Ante esta posibilidad, nos planteamos la opción de realizar la inmunofluorescencia en dos partes y no emplear anticuerpos

secundarios fluorescentes sino marcados con biotina. Así, en una primera parte, llevamos a cabo la incubación con el anticuerpo primario y con el anticuerpo secundario biotinado y, después de realizar la hibridación *in situ*, se reveló la biotina del anticuerpo secundario con estreptavidina marcada fluorescentemente. Con este procedimiento, pensamos que se evitaría el posible efecto negativo de los diferentes tratamientos de la hibridación *in situ* sobre las moléculas fluorescentes. Lamentablemente, este tipo de revelado siguió sin producir los resultados esperados.

La siguiente opción que nos planteamos seguía en la línea de dividir la inmunofluorescencia en dos partes. En este caso, en la primera parte, se llevaba a cabo la incubación únicamente con el anticuerpo primario antes de realizarse la hibridación *in situ*. En la segunda parte, tras la hibridación *in situ*, se efectuaba el revelado con el anticuerpo secundario fluorescente. Este nuevo intento tampoco funcionó, lo que parecía indicar que los diferentes tratamientos de la hibridación *in situ* estaban afectando al reconocimiento primario del anticuerpo al antígeno tisular.

Finalmente, después de varios intentos para poner a punto la técnica de la doble inmunofluorescencia-hibridación *in situ*, probamos un método patentado (PerkinElmer®) para la amplificación de la señal producida en técnicas inmunofluorescentes y en hibridaciones *in situ*. Este método, conocido como “amplificación de la señal mediante tiramidas” o TSA (*Tyramide Signal Amplification*), se basa en una reacción catalizada por la peroxidasa y que produce la unión covalente de moléculas de tiramida a proteínas del tejido (ver sección de Material y Métodos). Curiosamente, este método, que había sido ideado inicialmente para amplificar una señal (Bobrow *et al.*, 1989; Adams, 1992), podía ser empleado para llevar a cabo la combinación de técnicas inmunofluorescentes (Hunyady *et al.*, 1996), de técnicas de hibridación *in situ* (Albertson *et al.*, 1995) y de ambos tipos de técnicas (Donadoni *et al.*, 2004) sobre el mismo tejido. Así pues, basándonos en las publicaciones anteriores y en las especificaciones técnicas de la casa comercial, aplicamos el método TSA en nuestro estudio. El protocolo definitivo puesto a punto para la técnica de la doble inmunofluorescencia-hibridación *in situ* es el que hemos descrito detalladamente en la sección correspondiente del apartado de Material y Métodos, y que permite obtener resultados como los mostrados en la Figura 32.

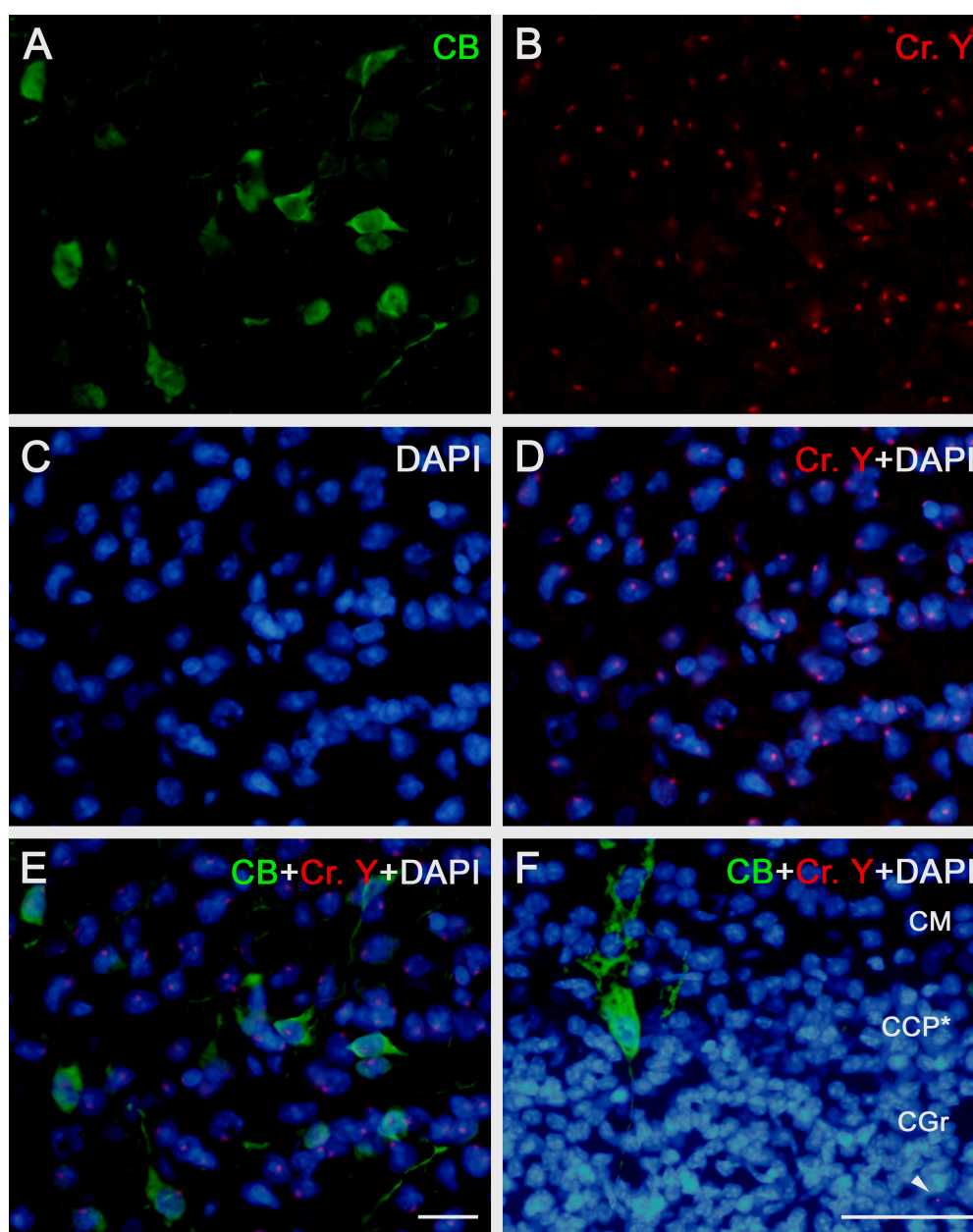


Figura 32. Imágenes de microscopía de epifluorescencia convencional en secciones encefálicas de ratón en las que se ha llevado a cabo la técnica de la doble inmunofluorescencia-hibridación *in situ* puesta a punto para esta Tesis Doctoral. **A-E** pertenecen a un ratón macho silvestre; **D**, a un ratón hembra mutante *PCD* trasplantada con médula ósea de un ratón macho silvestre. **A** muestra el marcaje de la técnica de inmunofluorescencia para Calbindina (CB). **B** es la misma sección que **A**, con el marcaje para la técnica de la hibridación *in situ* del cromosoma Y (Cr. Y, puntos rojos). **C** muestra la contratinción con DAPI de esas células y **D** ofrece la localización del cromosoma Y en ellas. **E** muestra el resultado de la combinación de todas las imágenes anteriores. En **F** se presenta un ejemplo de la aplicación de esta técnica en nuestro estudio. La imagen muestra una sección del cerebelo de una hembra del grupo *PCD* trasplantado en la que se puede apreciar una única célula de Purkinje (CB positiva, en verde) y, en sus proximidades, hay una célula procedente de la médula ósea “sana” trasplantada (punta de flecha) con cromosoma Y. **CCP***: capa de las células de Purkinje en los animales *PCD*. **CGr**: capa de los granos. **CM**: capa molecular. Barras de escala: 20 μm para **A-E**, 50 μm para **F**.

Análisis de la llegada de células de la médula ósea al encéfalo de los animales receptores

Una vez que hemos conseguido disponer de todo lo necesario para poder llevar a cabo estudios de trasplantes de médula ósea en ratones silvestres y mutantes *PCD* –las colonias de animales donantes y receptores que permiten no sólo identificar las células del donante en el receptor, sino también distinguir el mecanismo seguido por éstas en sus diferentes tejidos, la dosis de radiación letal mínima establecida, la puesta a punto de todo el procedimiento de trasplante, así como la metodología para la identificación y caracterización de las células del donante en el receptor–, nos dedicamos a analizar microscópicamente el encéfalo de los animales trasplantados.

A continuación, presentamos los resultados obtenidos en nuestro estudio del análisis de la llegada de CMO al encéfalo de los animales receptores. Dividimos este apartado en nuestras dos regiones de estudio: el **cerebelo** y el **bulbo olfatorio**. Asimismo, separamos los resultados de cada una de estas regiones en dos partes: los resultados observados en animales silvestres, con trasplante de médula ósea de otros animales silvestres (grupo *Silvestre homotrasplantado*) y los resultados observados en animales mutantes *PCD*, con trasplante de médula ósea “sana” (de donantes silvestres, grupo *PCD heterotrasplantado*) y sin trasplante (grupo *PCD sin trasplante*). En todos los casos, el análisis se llevó a cabo a tres edades diferentes: P60, P110 y P150, que se corresponden con 40, 90 y 130 días después del trasplante, respectivamente.

Llegada al cerebelo

El cerebelo es la zona del encéfalo en la que se han centrado la mayoría de los trabajos previos y en la que ya ha sido demostrada fehacientemente la llegada de CMO y su integración en el mismo. En nuestro caso, su análisis en animales del grupo *Silvestre homotrasplantado* nos sirvió como control positivo de este fenómeno y, en los animales del grupo *PCD heterotrasplantado*, como aproximación tanto al efecto de un microambiente degenerativo en todo este proceso, como al resultado del trasplante de una médula ósea “sana” en los ratones mutantes *PCD*.

Animales silvestres

El análisis de la llegada de CMO al cerebelo de animales del grupo *Silvestre homotrasplantado* nos permitió comprobar que el proceso se llevaba a cabo en los animales con las características propias de nuestras colonias, como había sido descrito anteriormente en la Bibliografía. Además, con el análisis de este fenómeno en animales de este grupo, pudimos también conocer la frecuencia y los tiempos de este proceso en condiciones “normales”, en ausencia de un microambiente degenerativo. La identificación de las células del donante se efectuó con los diferentes sistemas descritos en detalle en la sección de Material y Métodos.

Tipos celulares originados

El tipo celular mayoritario originado, a partir de la médula ósea del donante, en el cerebelo de los animales del grupo *Silvestre homotrasplantado* fue la **microglía** (Figura 33). Se observaron células de microglía (positivas para el marcador Iba 1) distribuidas a lo largo de todo el cerebelo. Su abundancia y localización fue bastante similar en todos los animales analizados (Figura 34A). Asimismo, no se observaron grandes diferencias ni en su abundancia ni en su localización entre los animales sacrificados a edades más jóvenes (P60) y los animales sacrificados a edades más avanzadas (P150). Su localización fue mayoritaria en la porción más externa del cerebelo, en el límite con las meninges (Figura 34B). La mayoría de estas células presentaron una morfología típica de microglía latente, con un pequeño soma y numerosas prolongaciones con ramificaciones (Figura 33A-C). No obstante, también se encontraron algunas de estas células, originadas a partir de la médula ósea trasplantada, con una morfología más redondeada –con un soma de mayor tamaño y un menor número de prolongaciones de pequeño tamaño– características morfológicas de elementos de microglía activada (Figura 33D-F).

En cuanto a la posible formación de **astrocitos** (GFAP positivos) a partir de la médula ósea trasplantada, no se encontraron elementos celulares que colocalizaran la GFAP con algunos de los marcadores utilizados para la visualización de las células de la médula ósea trasplantada (cromosoma Y o GFP).

Finalmente, se analizó la formación de elementos neuronales a partir de la médula ósea trasplantada. En este caso, nuestro estudio se centró en las células de Purkinje, porque este tipo neuronal es el que caracteriza la neurodegeneración que tiene lugar en el cerebelo de los ratones mutantes *PCD* –modelo de estudio en esta Tesis Doctoral–. No obstante, a lo largo de nuestro análisis, no se observaron otros tipos celulares con características neuronales distintas a las de las células de Purkinje. Así pues, los únicos elementos neuronales

que se encontraron en el cerebelo de los animales del grupo *Silvestre homotrasplantado* originados a partir de la médula ósea trasplantada fueron **células de Purkinje** (Figura 34).

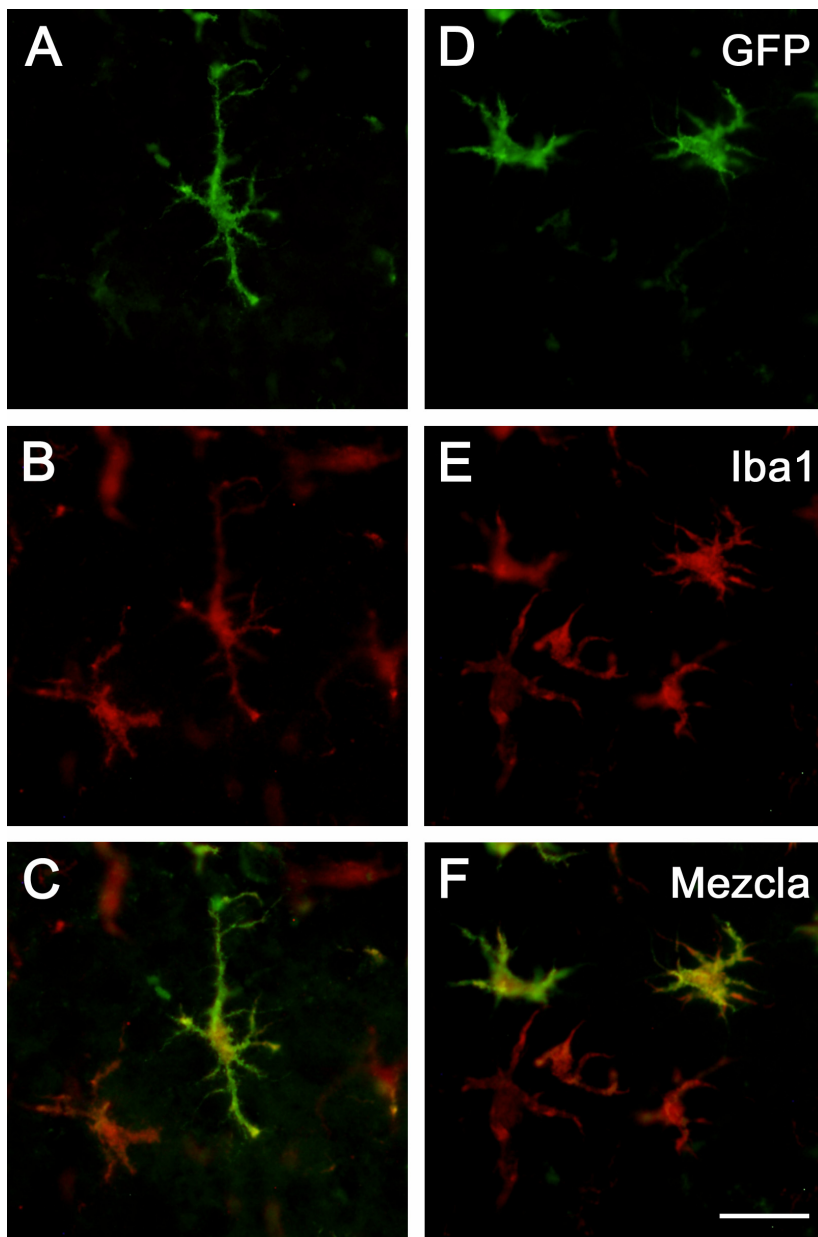


Figura 33. Imágenes de microscopía de epifluorescencia convencional en secciones del encéfalo de un ratón silvestre trasplantado con médula ósea “sana” (*homotrasplantado*) de un donante CRE-GFP en las que se pone de manifiesto la contribución de la médula ósea a la población microglial, tanto de microglía 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 producidas a partir 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 que no son GFP positivas). Barra de escala: 20 μ m.

Estas células de Purkinje producidas a partir de la médula ósea trasplantada presentaron una distribución aleatoria a lo largo de todo el cerebelo de los animales receptores. No se encontraron diferencias rostro-caudales o latero-mediales en la aparición de estos elementos. Del mismo modo, tampoco se apreció una preferencia especial por alguno de los lóbulos en los que se divide la corteza cerebelosa.

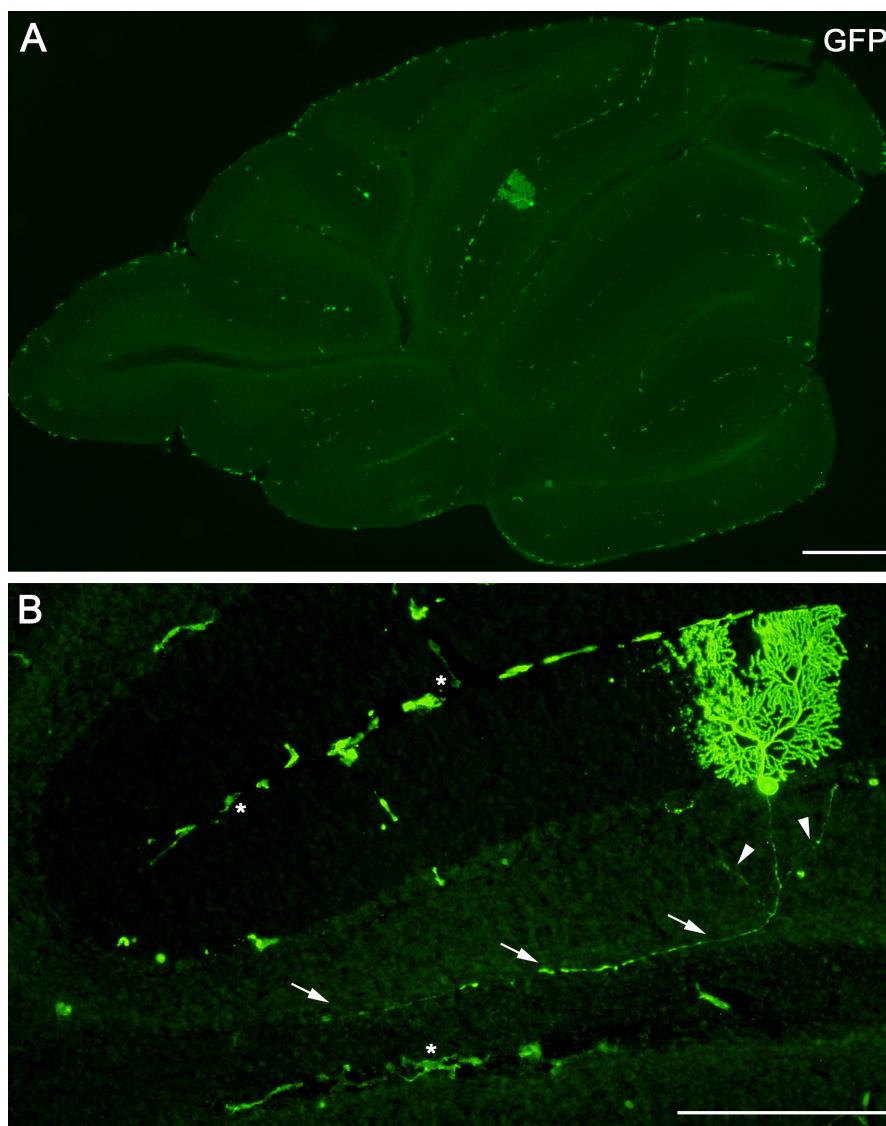


Figura 34. Imágenes de microscopía de epifluorescencia convencional en secciones de cerebelo de un ratón silvestre trasplantado con médula ósea “sana” (*homotrasplantado*) de un donante CRE-GFP en las que se muestran las células GFP positivas. **A** es una imagen panorámica que muestra la localización 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 μm para **A** y **B**.

Por otro lado, también se observó que la aparición de estas células de Purkinje con marcadores propios de la médula ósea trasplantada era un proceso relativamente poco frecuente (hasta un máximo de 21 células en un mismo cerebelo) y que presentaba una relación con el tiempo transcurrido desde el momento del trasplante. Solamente se encontraron en los animales sacrificados con tiempos de supervivencia de P150. En todos los casos en los que se observaron estas células, no hubo ninguna duda de que se trataba de células de Purkinje (Figura 34), ya que presentaban su morfología característica y, en aquellos casos en los que se combinó su identificación con un marcaje para CB, fueron siempre positivas para este marcador propio de células de Purkinje.

En la figura 35 se pueden observar distintas microfotografías de diferentes células de Purkinje originadas a partir de la médula ósea trasplantada en las que se puede apreciar su enorme grado de diferenciación, puesto de manifiesto por la enorme complejidad de su árbol dendrítico y por sus numerosas ramificaciones. Del mismo modo, también se pudo apreciar que se trataba de elementos celulares integrados en la estructura del cerebelo, ya que, además del árbol dendrítico citado anteriormente, en algunos de ellos se observaba perfectamente un largo axón que proyectaba a otras regiones cerebelosas, y en el que, en ocasiones, se distinguían las típicas colaterales recurrentes características de las células de Purkinje (Figura 34B). Finalmente, también se observó la fusión de CMO con células de Purkinje, como queda puesto de manifiesto en las imágenes de la figura 35 (G-I), que se corresponden con una célula de Purkinje positiva para β -gal, lo que demuestra que se ha fusionado con alguna CMO.

Por último, la contratinción nuclear con DAPI o con IP de estas células permitió observar sus núcleos y concluir que la gran mayoría de las células de Purkinje originadas a partir de la médula ósea trasplantada eran células con dos núcleos (Figura 35J-L).

Animales mutantes *PCD*

El estudio de la llegada de CMO al cerebelo de animales mutantes *PCD* trasplantados con médula ósea “sana” (grupo *PCD heterotrasplantado*) y la comparación de estos resultados con los obtenidos del estudio de los animales del grupo *Silvestre homotrasplantado* (apartado anterior) nos permite investigar si existe un efecto favorecedor del microambiente neurodegenerativo (degeneración de las células de Purkinje) en la llegada de CMO al cerebelo. Además, la comparación histológica del cerebelo de los animales del grupo *PCD heterotrasplantado* con el de los del grupo *PCD sin trasplante* nos brinda una oportunidad única de conocer el efecto del trasplante de una médula ósea “sana” en los animales mutantes *PCD*.

Y, a la vez, nos permite buscar una interpretación histológica a los resultados obtenidos de las pruebas de comportamiento (expuestos anteriormente).

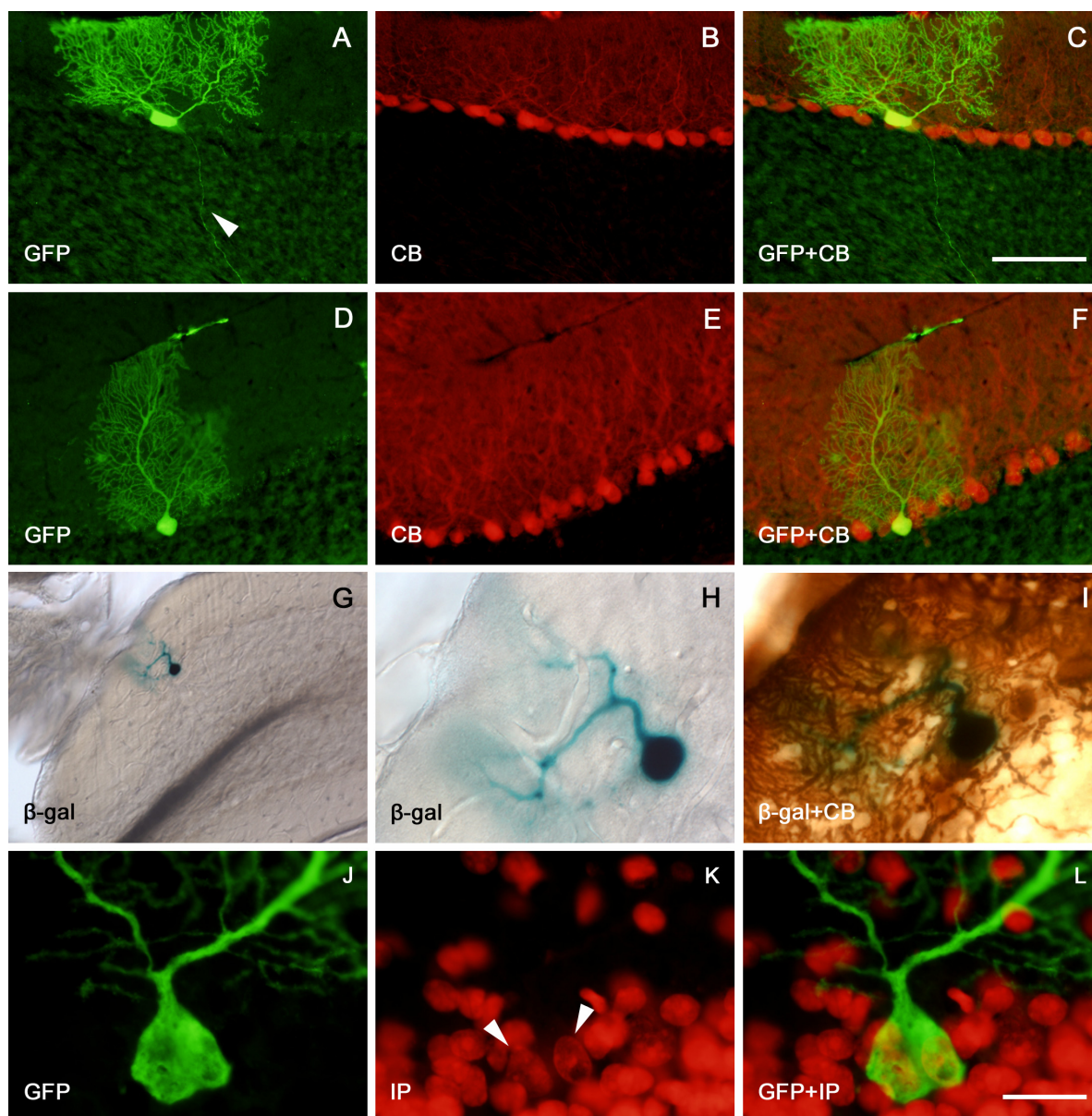


Figura 35. Imágenes microscópicas en secciones de cerebelo de ratones silvestres trasplantados con médula ósea “sana” (*homotrasplantados*) de donantes CRE-GFP en las que se muestran algunos ejemplos de células de Purkinje originadas a partir de la médula ósea trasplantada. **A** y **D** muestran dos 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 colocación 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**.

Tipos celulares originados en un ambiente con neurodegeneración

Al igual que sucede en el caso de los animales del grupo *Silvestre homotrasplantado*, en los animales mutantes del grupo *PCD heterotrasplantado*, el tipo celular mayoritario originado a partir de la nueva médula ósea en el cerebelo fue la **microglía**. Por lo general, no se observaron diferencias importantes relacionadas con su abundancia o localización (Figura 36A y B), ni entre los distintos animales analizados, ni al comparar estos animales con los del grupo *Silvestre homotrasplantado* (Figura 34). Asimismo, tampoco se encontraron diferencias al comparar los animales sacrificados a edades más jóvenes (P60) con los sacrificados a edades más tardías (P150). Su distribución fue similar a la descrita en el apartado anterior para el grupo de animales silvestres (mayoritariamente localizada en el límite con las meninges; Figura 36A y B). Del mismo modo, se encontraron células de microglía originadas a partir de la médula ósea trasplantada, tanto reactiva como latente. En la misma línea de los animales silvestres trasplantados, no se encontraron **astrocitos** producidos a partir de CMO del donante.

Por último, llevamos a cabo el estudio de la posible formación de elementos neuronales a partir de la médula ósea trasplantada en el cerebelo de animales con neurodegeneración. Al igual que en el caso de los animales silvestres, centramos nuestro análisis en las **células de Purkinje**, teniendo como hipótesis previa –basada en los trabajos previos publicados en la bibliografía (ver apartado de Introducción)– que el fenómeno de formación de células de Purkinje a partir de CMO iba a estar favorecido por el proceso degenerativo. Sin embargo, sorprendentemente, no se observaron células de Purkinje originadas a partir de la médula ósea trasplantada en el cerebelo de ningún animal mutante del grupo *PCD heterotrasplantado*. Este resultado fue extensible a los tres grupos de edad analizados (P60, P110 y P150). En todos los casos se llevó a cabo un análisis exhaustivo de todo el cerebelo y no se encontró ninguna célula de Purkinje con algún marcador propio de la médula ósea trasplantada (cromosoma Y o GFP), ni siquiera en los nódulos, flóculos y paraflóculos, descritos como las regiones del cerebelo de los ratones mutantes *PCD* en los que las células de Purkinje degeneran en etapas más tardías (Landis y Mullen, 1978; Alcalde, 2003; Kyuhou *et al.*, 2006), ni incluso en el lóbulo X, en el que recientemente hemos visto en nuestro laboratorio cómo el proceso degenerativo de este tipo celular comienza también en edades más avanzadas que en el resto del cerebelo (comunicación personal, Fernando Calvo Baltanás).

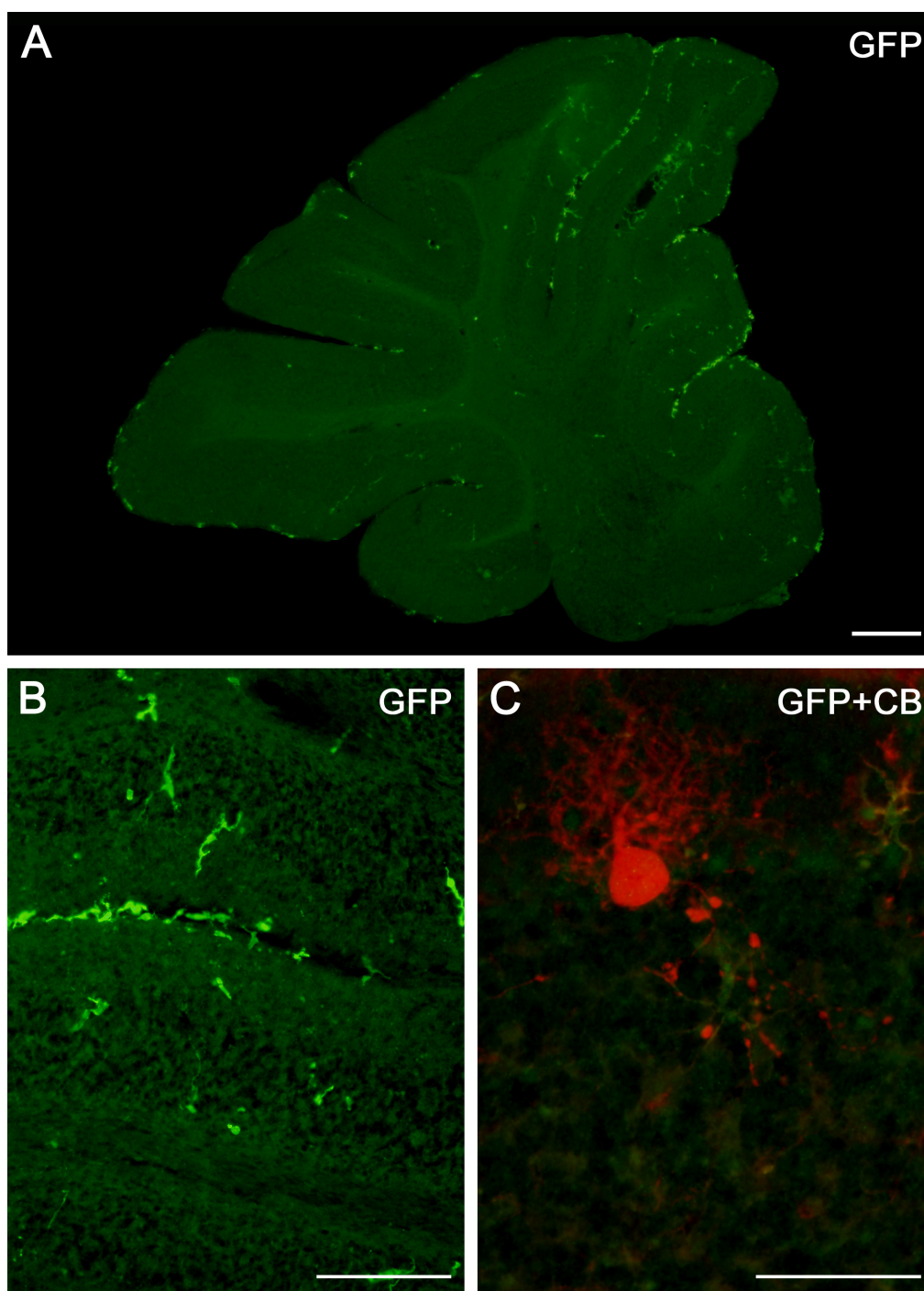


Figura 36. Imágenes de microscopía de epifluorescencia convencional en secciones de cerebelo de ratones mutantes *PCD* trasplantados con médula ósea “sana” (*PCD hetero-trasplantado*) de donantes *CRE-GFP*. **A** es una imagen panorámica que muestra la localización y abundancia de las células originadas 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; luego, 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**.

Efecto de una médula ósea “sana” en el cerebelo de los mutantes PCD

La ausencia de células de Purkinje originadas a partir de la médula ósea trasplantada en un ambiente degenerativo no solamente refutaba nuestra hipótesis previa, sino que, sorprendentemente, no cumplía con las expectativas creadas a raíz de los resultados obtenidos de las pruebas de comportamiento realizadas (ver secciones anteriores). Según estos resultados, todo hacía indicar que debía de existir un efecto de la médula ósea “sana” en el cerebelo de los animales mutantes *PCD* trasplantados con ella. Una vez descartada la posible formación de nuevas células de Purkinje, nos propusimos realizar un análisis comparado del cerebelo de estos mutantes, grupo *PCD heterotrasplantado* (con médula ósea “sana”), con el cerebelo de animales del grupo *PCD sin trasplante* (por tanto, con una médula ósea con la mutación *pcd*^{1j}) para ver si existía alguna diferencia en las poblaciones de células de Purkinje. Tal vez, la médula ósea “sana” no estaba dando lugar a nuevas células de Purkinje, pero, en cambio, estaba teniendo algún efecto en la supervivencia de las propias células de Purkinje de los animales receptores. Sin embargo, el análisis del marcaje con CB del cerebelo de ambos grupos de animales mutantes reveló que no existían apenas células de Purkinje (CB positivas) en ninguno de ellos. Tan sólo se encontró una única célula en todo el cerebelo de un único animal del grupo *PCD sin trasplante* y de dos animales del grupo *PCD heterotrasplantado*. Además, estas células de Purkinje supervivientes presentaban un árbol dendrítico bastante menor que el observado típicamente en los animales silvestres (Figura 32F y 36C). Esta ausencia de células de Purkinje, casi total, era patente desde la edad más temprana a la que fueron analizados los animales (P60).

Llegada al bulbo olfatorio

El bulbo olfatorio, pese a tratarse de una zona cerebral con un aporte continuo de nuevas neuronas a lo largo de toda la vida del animal, es una región encefálica en la que no ha sido demostrada aún de forma fehaciente la llegada e integración de células provenientes de la médula ósea. El análisis de este proceso en animales del grupo *Silvestre homotrasplantado* nos sirvió para estudiar si se trataba de un fenómeno que ocurría en condiciones fisiológicas normales (sin neurodegeneración). Además, también se estudió la posible influencia de un microambiente degenerativo en la llegada de las CMO al BO y si una médula ósea “sana” podía tener algún efecto en el proceso de degeneración de las células mitrales que ocurre de manera espontánea y posnatal en el BO de los ratones mutantes *PCD*.

Animales silvestres

El análisis de la llegada de CMO al bulbo olfatorio de animales del grupo *Silvestre homotrasplantado* (con médula ósea de otros animales donantes silvestres) nos permitió comprobar que este proceso se estaba llevando a cabo en condiciones fisiológicas normales (en ausencia de un microambiente degenerativo) y, por tanto, aportar datos definitivos sobre él a la escasa y confusa bibliografía existente. La identificación de las células del donante se efectuó con los diferentes sistemas detallados en el Material y Métodos.

Tipos celulares originados

El tipo celular mayoritario producido a partir de la médula ósea trasplantada en el BO de los animales silvestres trasplantados, al igual que en el caso del cerebelo, fue la **microglía**. Se observaron células con marcadores propios de la médula ósea trasplantada que expresaban Iba 1, distribuidas a lo largo de todo el bulbo olfatorio (Figura 37). Su presencia fue mayoritaria en la periferia del BO, en contacto con las meninges. No se observaron diferencias importantes al comparar su abundancia y localización entre los diferentes animales analizados, independientemente de la edad de sacrificio. Al igual que en el caso del cerebelo (ver secciones anteriores), se observaron elementos tanto de microglía reactiva como latente. La posible formación de **astrocitos** en el BO a partir de la médula ósea trasplantada quedó también descartada, ya que no se observaron células con morfología estrellada y que presentasen al mismo tiempo alguno de los marcadores propios de las células de la médula ósea trasplantada (cromosoma Y o GFP) junto con GFAP.

Por último, el estudio de la posible formación de elementos neuronales en el BO a partir de la médula ósea no se centró únicamente en las células mitrales –tipo neuronal que caracteriza la degeneración del BO de los animales mutantes *PCD-*, sino que se llevó a cabo a lo largo de las principales capas celulares que lo componen. Comenzamos nuestro análisis por la capa de los granos (CGr). En esta región se encontraron células con marcadores propios de la médula ósea trasplantada, que tenían la típica morfología de los **granos** del BO (Figura 38 A-C). Además, ninguna de las células que se encontraron con estas características fue positiva para los marcadores gliales GFAP o Iba 1. Estos granos estuvieron presentes tanto en regiones internas como externas de la capa de granos del BO. En ellos se pudo apreciar una prolongación larga, típica de este tipo celular, que proyectaba, en el caso de los primeros, a otras regiones más externas de la CGr y en el caso de los segundos, a la capa plexiforme externa (CPE; Figura 38A).

En cuanto a la posible formación de **células mitrales** a partir de la médula ósea trasplantada en animales del grupo *Silvestre homotrasplantado*, no podemos concluir firmemente que se esté produciendo, pues no hemos hallado células con marcadores del donante (cromosoma Y o GFP) que se encuentren localizadas en la capa de células mitrales (CCM), con la morfología típica de una célula mitral y que sean positivas para Reelina. Sin embargo, sí se han encontrado células producidas a partir de la médula ósea trasplantada –con marcadores del donante– que cumplían alguno de los requisitos anteriores, pero no todos.

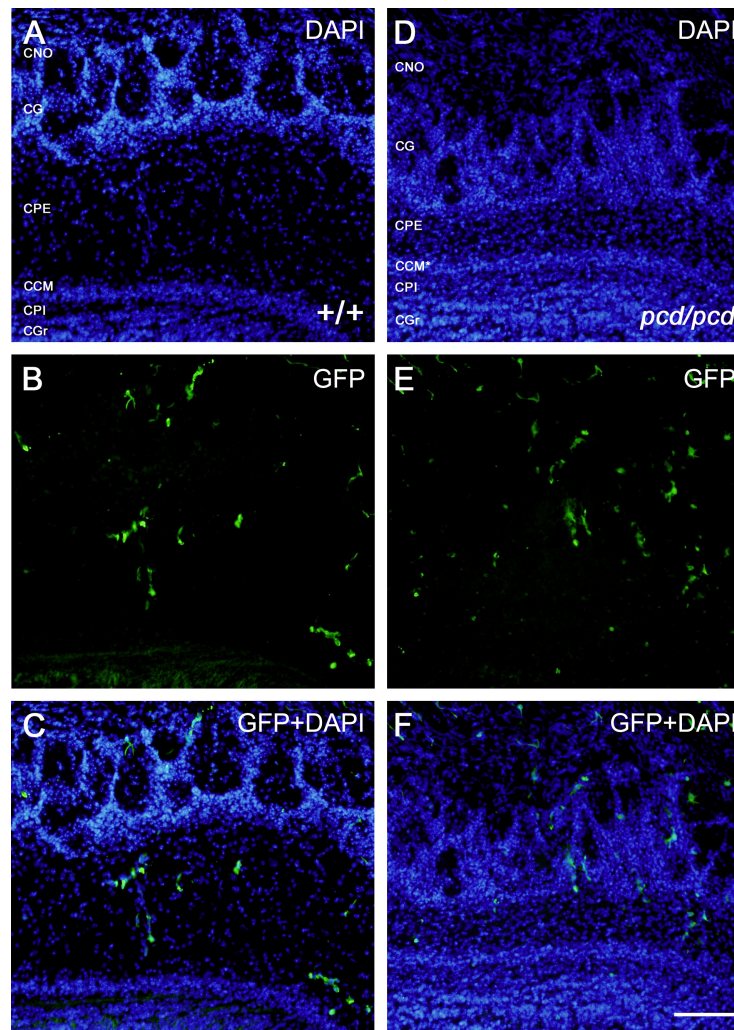


Figura 37. Fotografías microscópicas de epifluorescencia convencional en secciones del bulbo olfatorio de un ratón del grupo *Silvestre homotrasplantado* (A, B y C) y de un ratón mutante *PCD* del grupo *PCD heterotrasplantado* (D, E y F), ambos de P150, que fueron trasplantados, con médula ósea “sana” de animales donantes CRE-GFP, a los 20 días de edad. En A y D se muestran imágenes de la distribución de las capas del BO marcadas con DAPI en ambos tipos de animales. En B y E se presentan las mismas secciones, pero, en este caso, con la señal producida por la GFP. En C y F se ha realizado la combinación de ambas imágenes para poder localizar las células GFP positivas. Como se puede observar en estas imágenes representativas, no se encontraron diferencias importantes en cuanto a la abundancia y distribución de las células producidas a partir de la médula ósea trasplantada (GFP positivas; preferentemente en las porciones más externas). **CCM**: capa de células mitrales. **CCM***: capa de células mitrales en los animales *PCD*. **CG**: capa glomerular. **CGr**: capa de los granos. **CNO**: capa del nervio olfatorio. **CPE**: capa plexiforme externa. **CPI**: capa plexiforme interna. Barra de escala: 100 μ m.

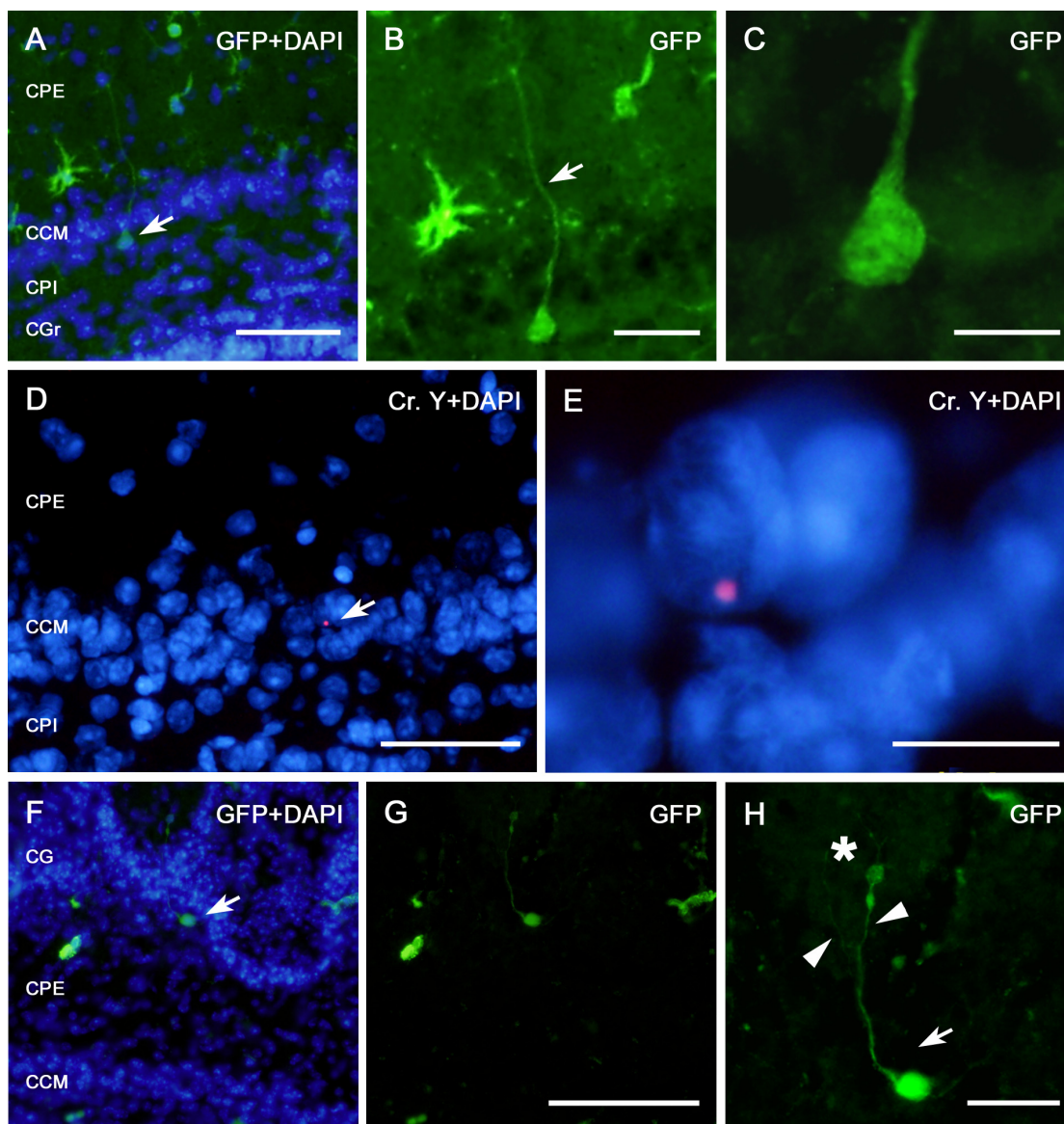


Figura 38. Imágenes microscópicas en secciones de bulbo olfatorio de ratones silvestres homotrasplantados con médula ósea “sana” procedente de animales donantes, bien CRE-GFP (A-C y F-H) bien machos (D y E), en las que se muestran algunos ejemplos de tipos neuronales propios de esta región originados a partir de la médula ósea trasplantada. En A-C se presenta una célula GFP positiva (con su núcleo marcado con DAPI) en la CPI, y que podría ser considerada por su morfología y localización como un grano desplazado. B y C muestran detalles de su prolongación (flecha) y soma, respectivamente. En D y E se muestra una célula con cromosoma Y (Cr. Y) en la CCM de una hembra silvestre trasplantada. E es una magnificación de D y permite observar el tamaño nuclear y la localización del cromosoma Y en la región más externa del núcleo. Por su localización en la CCM y por el gran tamaño nuclear, parece corresponder a una célula mitral, aunque estos datos no son concluyentes. En F-H se expone una célula GFP positiva (con su núcleo marcado con DAPI) en la CG del BO. F es la misma imagen sin el marcaje nuclear y H es una magnificación de esa célula GFP positiva en la que se puede seguir claramente su prolongación (flecha) entrando al interior de un glomérulo (marcado con un asterisco), donde se ramifica (puntas de fecha). De acuerdo con su localización y morfología, esta neurona se tipifica como una célula yuxtglomerular. CCM: capa de células mitrales. CG: capa glomerular. CGr: capa de los granos. CPE: capa plexiforme externa. CPI: capa plexiforme interna. Barras de escala: 50 μ m para A, 25 μ m para B, 10 μ m para C, 50 μ m para D, 10 μ m para E, 100 μ m para F y G, 25 μ m para H.

Para ilustrar este tipo de casos, en la figura 38 (D-E) se muestran imágenes de secciones del BO de una hembra silvestre trasplantada con médula ósea de un donante macho en las que se puede apreciar cómo uno de los núcleos de una de las células de la CCM presenta el cromosoma Y, poniendo de manifiesto su origen. La localización de esta célula y el gran tamaño de su núcleo podrían llevarnos a pensar que se trata de una célula mitral.

A continuación, analizamos la posible formación de elementos neuronales a partir de la médula ósea en la capa celular más externa, la capa glomerular (CG). En ella, encontramos una formación de **células yuxtglomerulares**, incluidas **células periglomerulares** (Figura 38J-L). En estos casos, debido a la enorme heterogeneidad neuroquímica existente entre estos tipos celulares, nos limitamos a utilizar como criterios para su clasificación tanto su localización en la CG como su morfología. Es importante destacar que en todos los casos anteriores se realizó una contraincubación nuclear con DAPI o con IP para analizar los núcleos de estas células. En ningún caso se encontraron células que presentasen más de un núcleo (Figura 38F-H), contrariamente a lo observado en el caso de las células de Purkinje del cerebelo.

Finalmente, hay que señalar que no se apreció una distribución preferencial de estas células originadas a partir de la médula ósea por ninguna de las capas celulares del BO. En esta misma línea, tampoco se encontraron diferencias en su distribución en las distintas regiones del BO –dorsal, ventral, medial y lateral–. No podemos concluir este apartado sin dejar claro que la presencia de todos estos elementos neuronales en el BO fue siempre muy escasa.

Poliploidías

Pese a que, como hemos comentado en la Introducción, no se han publicado evidencias de la existencia de células poliploides en el BO de roedores, la repetida observación de células mitrales con grandes núcleos nos llevó a pensar en la posibilidad de que algunas de esas células podrían presentar una dotación cromosómica poliploide. Para salir de dudas, llevamos a cabo una hibridación *in situ* fluorescente del cromosoma 1 (ver sección de Material y Métodos) del BO de animales silvestres de avanzada edad (P300).

El resultado obtenido fue sorprendente, pues se encontraron células que presentaban más de dos copias de dicho cromosoma (Figura 39), hecho que ponía de manifiesto la existencia de células mitrales del BO con una dotación cromosómica mayor de lo normal, por primera vez en roedores.

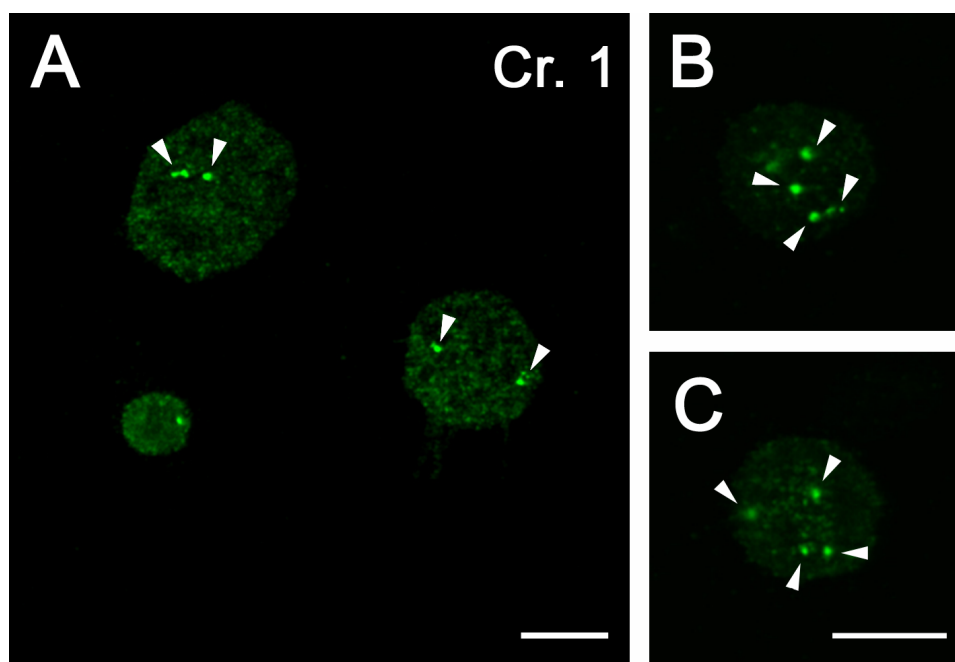


Figura 39. Imágenes de microscopía de epifluorescencia convencional en disociados de células mitrales de ratones silvestres de edad avanzada (P300) en los que se llevó a cabo una hibridación *in situ* fluorescente del cromosoma 1 (Cr. 1, puntas de flecha) para comprobar la posible poliploidía de estas células. En **A** se muestran tres células, una de pequeño tamaño (presumiblemente un grano) y dos de un tamaño mayor (células mitrales). Estas células mitrales presentan 4 puntos verdes, dato que pone de manifiesto su polisomía para este cromosoma. En **B** y **C** se presentan fotografías de otras dos células mitrales que también tienen 4 copias –tetraploides– del cromosoma 1 (puntas de flecha). Barras de escala: 25 μm para **A**, 10 μm para **B** y **C**.

Animales mutantes *PCD*

Al igual que en los resultados relacionados con el cerebelo, el análisis del BO de los animales mutantes *PCD* trasplantados con una médula ósea “sana” (grupo *PCD heterotrasplantado*) y la comparación de estos resultados con los obtenidos de este análisis en los animales del grupo *Silvestre homotrasplantado* nos permite conocer el efecto de la degeneración de las células mitrales del BO –un microambiente degenerativo– en la llegada e integración de CMO en él. Además, la comparación del BO de los animales del grupo *PCD heterotrasplantado* con el BO de animales mutantes del grupo *PCD sin trasplante* nos concede una oportunidad única de estudiar el efecto de una médula ósea “sana” en el BO de animales con degeneración de las células mitrales.

Tipos celulares originados en un ambiente con neurodegeneración

En la misma línea de las regiones encefálicas analizadas anteriormente, en el BO de los animales del grupo *PCD heterotrasplantado*, el tipo celular más abundante originado a par-

tir de la médula ósea del donante fue la **microglía**, tanto reactiva como latente. Así pues, la gran mayoría de las células con marcadores propios de la médula ósea trasplantada expresaban Iba 1. Como en el caso de los BO de los animales del grupo *Silvestre homotrasplantado*, su presencia fue mayoritaria en la parte más externa del BO, en contacto con las meninges. Del mismo modo, no se encontraron diferencias reseñables en cuanto a su localización y abundancia (Figura 37E y F) entre los diferentes animales analizados. Al igual que en todos los casos anteriores, no se encontraron astrocitos producidos a partir de la médula ósea trasplantada en el BO de ninguno de los animales mutantes *PCD* analizados.

Finalmente, y haciendo un paralelismo con los resultados descritos para el grupo *Silvestre homotrasplantado*, se estudió la posible formación de elementos neuronales en el BO de estos animales a partir de la médula ósea. En algunos de ellos se encontraron células que expresaban marcadores propios de la médula ósea trasplantada, y que no colocalizaban con marcadores gliales en la CGr, CCM y CG. Es importante destacar que, en aquellos animales en los que se encontraron, su presencia era extraordinariamente escasa, de la misma manera que en el caso de los animales del grupo *Silvestre homotrasplantado*. En ninguno de los animales analizados se encontraron células mitrales perfectamente caracterizadas originadas a partir de la médula ósea trasplantada. El caso más parecido es el que se recoge en la Figura 40, que se corresponde con una célula GFP positiva, Reelina positiva, localizada en torno a la CCM de un animal mutante del grupo *PCD heterotrasplantado*. Como hemos venido describiendo en todos los casos anteriores, no se observó una distribución preferencial de las escasas neuronas originadas a partir de la médula ósea por ninguna de las capas del BO. Asimismo, tampoco se encontraron diferencias ni en su distribución dorsal-ventral ni medio-lateral.

Efecto de una médula ósea “sana” en el bulbo olfatorio de los mutantes PCD

Ante la ausencia de células mitrales, perfectamente caracterizadas, originadas a partir de la médula ósea en el BO de los ratones mutantes del grupo *PCD heterotrasplantado*, nos propusimos analizar si existía algún efecto relacionado con la supervivencia de las células mitrales. Así pues, como en el caso del cerebelo (ver apartado anterior), nos planteamos que la médula ósea “sana”, a pesar de no originar a nuevas células mitrales, podía estar influyendo en la supervivencia de las células mitrales propias de los animales receptores. Sin embargo, el análisis del marcaje con Reelina del BO de animales mutantes del grupo *PCD heterotrasplantado* y de animales mutantes del grupo *PCD sin trasplante* reveló que no existían

diferencias cualitativas en el número de células mitrales en función de la presencia de una médula ósea “sana” en animales de P60, P110 y P150.

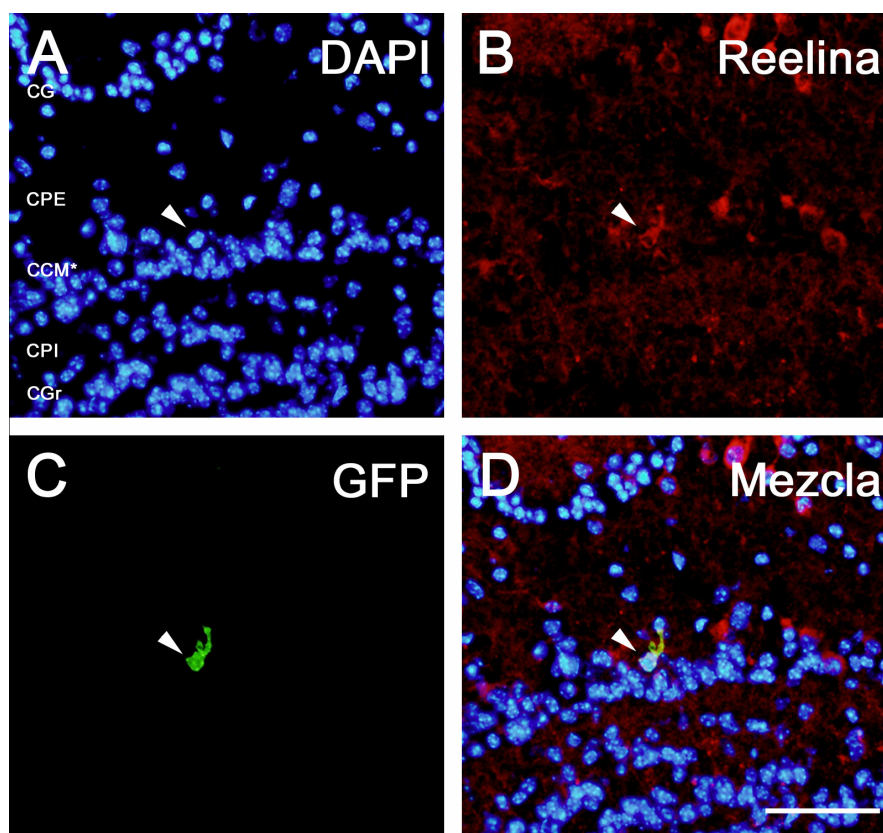


Figura 40. Imágenes de microscopía de epifluorescencia convencional en secciones del bulbo olfatorio de un ratón mutante *PCD* heterotrasplantado con médula ósea “sana” procedente de un donante CRE-GFP en las que se muestra un ejemplo de una célula originada a partir de la médula trasplantada (GFP positiva), localizada en la CCM y que expresa Reelina, marcador de células de proyección, célula mitral o célula empenachada interna. En **A** se presenta la tinción nuclear con DAPI de esa región del BO para localizar su posición (punta de flecha). En **B** se muestra el marcaje de esa misma región con Reelina y se señala la célula de interés (punta de flecha). **C** es la misma región, pero en este caso se presenta la señal producida por la GFP. En **D** se presenta la mezcla de las 3 señales anteriores, donde se puede observar mejor el origen y fenotipo de la célula marcada. **CCM***: capa de células mitrales de un ratón mutante *PCD*. **CG**: capa glomerular. **CGr**: capa de los granos. **CPE**: capa plexiforme externa. **CPI**: capa plexiforme interna. Barra de escala: 50 μ m.

DISCUSIÓN

En este apartado se realiza un análisis de los resultados presentados en la sección anterior, planteando explicaciones sobre sus posibles causas, así como nuevas hipótesis de trabajo para futuros estudios. Para facilitar el seguimiento y comprensión de esta sección se seguirá el mismo esquema que en los apartados anteriores.

Las colonias de animales

El establecimiento de las distintas colonias de animales llevado a cabo en nuestro estudio constituye una base sólida para futuras investigaciones en el campo de la terapia celular en las patologías neurodegenerativas. Estas colonias permiten disponer de animales donantes y receptores idóneos para poder hacer experimentos de trasplante de médula ósea, asegurando tres aspectos fundamentales en este tipo de estudios: a) la ausencia de problemas de consanguinidad, b) la identificación del destino de las células trasplantadas, y c) la capacidad de identificar el mecanismo de plasticidad (transdiferenciación o fusión celular) seguido por las CMO en los diferentes tejidos de los animales receptores. Además, hay que tener en cuenta que este establecimiento no es exclusivo de una línea de animales silvestres, sino que también es extensible a un modelo animal de neurodegeneración, como el ratón mutante *PCD*.

Ausencia de problemas de consanguinidad

El principal factor de riesgo al que hay que hacer frente a la hora de realizar un trasplante de médula ósea (en cualquier mamífero, incluido el humano) viene dado por un fenómeno conocido como “**enfermedad injerto contra huésped**”. Esta respuesta inmunológica puede ocasionar graves complicaciones en los individuos receptores, y llega a constituir una seria amenaza para su vida. La “enfermedad injerto contra huésped” se produce cuando el sistema inmunológico del donante reacciona contra los tejidos del receptor. Las principales regiones afectadas son el tracto gastrointestinal, el hígado, la piel, los pulmones y los órganos linfoides (Korngold y Wettstein, 1990). Su incidencia es muy variada (Baird y Pavletic, 2006) y está asociada con una morbilidad y mortalidad significativas (Chu y Gress, 2008). Para intentar disminuir su incidencia es fundamental realizar los trasplantes entre individuos compatibles. Por lo general, esta compatibilidad va a estar determinada por su grado de consanguinidad. Así, en la mayoría de los experimentos de trasplante de médula ósea en ratones encontrados en la bibliografía se empleó la misma estirpe de ratón como donante y como receptor (Priller *et al.*, 2001; Weimann *et al.*, 2003a; Dahlke *et al.*, 2006; Magrassi *et al.*, 2007; Johansson *et al.*, 2008; Nygren *et al.*, 2008; entre otros).

Bien es cierto que, para evitar los posibles problemas derivados de la falta de consanguinidad, en nuestro trabajo, podríamos haber reducido los experimentos al trasplante de médula ósea entre animales hermanos –donantes machos y receptores hembras–. Sin embargo, como ya se ha comentado en apartados anteriores, este tipo de trasplante limita parcialmente la interpretación de los resultados, por lo que decidimos establecer las colonias de animales necesarias para poder realizar un análisis más completo de todo el proceso. No obstante, el establecimiento de las nuevas colonias llevaba implícito, por un lado, el inconveniente principal de mantener las condiciones adecuadas para la identificación genética de la mutación *pcd*^{fl}; por otro, el de la obtención de animales lo suficientemente compatibles entre las diferentes colonias como para poder llevar a cabo trasplantes de médula ósea sin los problemas derivados de la falta de consanguinidad. El primero de estos dos inconvenientes se solventó realizando los cruces según lo detallado en la sección de Resultados. Los posibles problemas derivados de la utilización de tres estirpes de ratón diferentes se solucionaron con la realización de los sucesivos cruzamientos. Estos cruces entre las distintas estirpes permitieron la obtención de animales híbridos, con una mezcla genética de las tres estirpes, que evitó los problemas de consanguinidad. Esto fue debido fundamentalmente a que tanto la colonia *PCD-R26R* como la colonia *CRE-GFP* fueron establecidas inicialmente entre animales de la estirpe *C57BL/6J* y animales de las estirpes *DBA/2J* y

BALB/c, respectivamente. Así pues, en ambas colonias existía una importante contribución de la estirpe C57BL/6J. Finalmente, para la obtención de la colonia *PCD*-(*CRE-GFP*) se realizó un cruzamiento entre las colonias *PCD* y *CRE-GFP*. Tras sucesivos cruces y generaciones se acabó consiguiendo un fondo genético mixto que contribuyó a la ausencia de problemas de consanguinidad.

Gracias a esta compatibilidad entre los animales de las tres colonias, se han podido realizar sin problemas de consanguinidad todos los trasplantes de este estudio. No sólo eso, sino que, además, permite disponer de animales perfectamente compatibles para futuros experimentos de trasplantes, tanto silvestres como mutantes *PCD*.

Posibilidad de identificar el mecanismo de plasticidad

El mecanismo de plasticidad llevado a cabo por las CMO en los tejidos de los animales receptores –transdiferenciación o fusión celular– ha sido un controvertido objeto de debate durante años (Kozorovitskiy y Gould, 2003; O'Malley y Scott, 2004). Así pues, el poder contar con una herramienta adecuada para su identificación constituye un factor determinante a la hora de llevar a cabo un análisis detallado de los diferentes tejidos de los animales sometidos a un trasplante de médula ósea.

En nuestro caso, no sólo hemos conseguido disponer de un sistema de identificación del mecanismo de plasticidad –basado en la utilización de receptores R26R y donantes *CRE-GFP*, y que ya ha sido empleado anteriormente con éxito (Álvarez-Dolado *et al.*, 2003; Oh *et al.*, 2003; Jin y Ding, 2006)–, sino que, además, hemos sido capaces de incorporarlo en ratones que presentaban la mutación *pcd*^{fl}. Ello permitirá realizar un análisis más detallado de la llegada de CMO al encéfalo de animales con neurodegeneración, a la vez que abre nuevas posibilidades de investigación con este modelo animal (ver más adelante).

Finalmente, es importante destacar que la transdiferenciación y la fusión celular no tienen por qué ser excluyentes entre sí: las dos podrían producirse independientemente bajo diferentes condiciones o, incluso, podrían funcionar en una sucesión de eventos (Álvarez-Dolado, 2007). Por ejemplo, una CMO podría fusionarse con una célula local, reprogramando el genoma de la célula residente y confiriéndole la habilidad para transdiferenciarse, como ocurre tras la fusión de cardiomiocitos con células de la médula ósea *in vitro* (Matsuura *et al.*, 2004).

Si ambos procesos pueden ser compatibles, cabe entonces preguntarse ¿por qué constituye un tema tan polémico en el campo de las células madre adultas? Quizá, una de las principales causas de esta confusión se ha generado por la variedad de condiciones ex-

perimentales tan amplia en las que se han descrito estos procesos y, sobre todo, por el hecho de que el tipo celular empleado en los trasplantes ha variado mucho según los diferentes grupos experimentales (Kozorovitskiy y Gould, 2003; O'Malley y Scott, 2004; Álvarez-Dolado, 2007). Esta variabilidad hace difícil comparar los resultados de distintos grupos y llegar a una conclusión general definitiva. Es por ello por lo que ni la transdiferenciación ni la fusión celular pueden ser descartadas como mecanismos de plasticidad de las células madre. Nuestros resultados aportan evidencias en regiones encefálicas y tipos celulares diferentes: fusión en las células de Purkinje del cerebelo y transdiferenciación en los granos del BO. Independientemente del mecanismo implicado, lo que sí está claro es que una mejor comprensión de la plasticidad de las células madre adultas contribuirá a favorecer el desarrollo posterior de estrategias terapéuticas apropiadas basadas en su utilización.

Nuevas posibilidades de futuro

El disponer de las nuevas colonias de animales establecidas abre numerosas posibilidades futuras de investigación. Por una parte, dentro de la línea de trasplantes de médula ósea como terapia regenerativa, además de profundizar en el análisis de la llegada de las CMO “sanas” al encéfalo de animales silvestres y mutantes *PCD* aquí iniciado, permitirá llevar a cabo nuevos tipos de trasplantes basados en la utilización de donantes CRE-GFP portadores de la mutación *pcd*^{fl}. Este tipo de donantes (*pcd/pcd - cre/cre - gfp/+*) pueden ser empleados para trasplantar CMO a animales de la colonia *PCD*-R26R, tanto mutantes (*homotrasplante*) como silvestres (*heterotrasplante*). En el primer caso –donante *PCD* y receptor *PCD*–, la presencia de una médula ósea CRE-GFP portadora de la mutación *pcd*^{fl} en un animal mutante (*pcd/pcd-lac/lac*) proporciona una oportunidad única de estudiar el proceso de llegada de CMO al encéfalo, propio de los animales mutantes *PCD*. Asimismo, la comparación de los resultados obtenidos de animales mutantes *PCD* *homotrasplantados* y animales mutantes *PCD* trasplantados con médula ósea “sana” permitirá analizar con mayor precisión el efecto de una médula ósea “sana” en un individuo con neurodegeneración, y proporcionará, además, un control del efecto de la radiación sobre el proceso. En el segundo caso, con el trasplante de médula ósea CRE-GFP portadora de la mutación *pcd*^{fl} en animales silvestres se podrán analizar las CMO portadoras de la mutación *pcd*^{fl} fuera de un ambiente degenerativo. Esto permitirá conocer su capacidad de migración, diferenciación e incorporación en un sistema nervioso “sano”. Asimismo, nos ayudará a discernir si la ausencia de células de Purkinje fusionadas en el cerebelo de los animales mutantes *PCD* –aquí descrita– es debida a un problema intrínseco a las CMO o,

por el contrario, como parece más esperable, es consecuencia de alguna alteración propia de sus células de Purkinje. En este segundo supuesto, en el que las CMO portadoras de la mutación *pcd*^f serían capaces de fusionarse con células de Purkinje “sanas”, resultaría muy interesante poder analizar el comportamiento y supervivencia de esas nuevas células fusionadas.

En esta misma línea de los trasplantes de médula ósea, también se podrán llevar a cabo experimentos similares a los aquí descritos; pero, en lugar de utilizando animales mutantes *PCD* (*pcd/pcd*) como receptores, empleando animales heterocigotos para esta mutación (*+/pcd*). En estos animales (*+/pcd*) se ha descrito que las células de Purkinje degeneran de forma progresiva con la edad (Doulazmi *et al.*, 2002). Así pues, nos encontraríamos ante una degeneración de las células de Purkinje en edades mucho más avanzadas que en el caso de los homocigotos recesivos (*pcd/pcd*), lo que permitiría analizar el efecto de la degeneración en la llegada de las CMO al encéfalo con la absoluta certeza de que, en el momento del trasplante, aún no ha comenzado el proceso degenerativo. De un modo similar a lo descrito anteriormente, se podrían realizar experimentos utilizando animales heterocigotos (*+/pcd*) como donantes para ver si existe alguna diferencia en sus CMO con respecto a los animales silvestres (*+/+*).

Por otra parte, disponer de estas colonias de animales permitirá aportar nuevos datos al estudio de la llegada de nuevas células al BO a través de la corriente migratoria rostral (CMR) en el ratón mutante *PCD*. En este sentido, un estudio previo llevado a cabo en nuestro laboratorio (Valero *et al.*, 2007) demostró que la pérdida de las células mitrales inducía cambios en la migración radial de las células de la CMR y en su supervivencia en el BO. Con las nuevas colonias ahora establecidas se podrá conocer, además, si existe algún tipo de alteración en las células de la CMR de los animales mutantes *PCD* que las esté llevando a comportarse de aquella manera. Para ello, se podría llevar a cabo un trasplante de estas células de animales mutantes *PCD* –identificables en los receptores– en animales silvestres, que nos permitiese conocer su comportamiento fuera de un ambiente degenerativo. Del mismo modo, se completaría el estudio realizando el trasplante inverso (células de animales silvestres en animales mutantes *PCD*), lo que permitiría conocer si células “sanas” de la CMR se comportan de un modo diferente en su llegada a un BO en diferentes etapas del proceso degenerativo de las células mitrales.

Como hemos puesto de manifiesto con los ejemplos anteriores, son muchas y variadas las posibilidades de futuro que se abren gracias al establecimiento de estas nuevas colonias de animales. No sólo a través de su identificación tras un trasplante, que, en defini-

tiva, podría realizarse de otras maneras más problemáticas o tediosas (como, por ejemplo, con la utilización de lentivirus), sino también a través del sistema que nos permite diferenciar los fenómenos de transdiferenciación de los de fusión celular. Por ejemplo, nos permitiría discernir si se están produciendo eventos de fusión celular entre células de la CMR y células del BO. Todos estos experimentos, y muchos otros, podrán tener respuesta a través de la utilización de nuestros nuevos modelos experimentales.

Ablación de la médula ósea mediante irradiación

Como hemos comentado en apartados anteriores, para la realización de experimentos de trasplante de médula ósea es necesario eliminar la médula ósea propia del animal receptor. Este proceso de ablación de la médula ósea puede llevarse a cabo mediante tratamiento con sustancias químicas —como el *Busulfan* (Locatelli *et al.*, 1994), el *Treosulfan* (Scheulen *et al.*, 2000) o la *Fludarabina* (Casper *et al.*, 2004)— o mediante irradiación. En nuestro caso, al igual que en la mayoría de los trabajos previos (Brazelton *et al.*, 2000; Priller *et al.*, 2001; Álvarez-Dolado *et al.*, 2003; Weimann *et al.*, 2003a y b; Dahlke *et al.*, 2006; Magrassi *et al.*, 2007; entre otros), se realizó mediante irradiación de todo el cuerpo del animal. La elección de este tipo de tratamiento se debió a su sencillez, repetibilidad y a que presentaba un mayor número de precedentes y que, por tanto, iba a permitir realizar una comparación más adecuada de nuestros resultados con los trabajos ya publicados.

Establecimiento de la dosis letal mínima

La dosis de radiación utilizada en los trabajos previos variaba de unos a otros, desde los 6,5 Gy (Dahlke *et al.*, 2006) hasta los 9 Gy (Magrassi *et al.*, 2007; Nygren *et al.*, 2008), e incluso 2 dosis de 5,5 Gy separadas 3 horas entre sí (Priller *et al.*, 2001). El resto de los trabajos consultados presentaron valores comprendidos dentro del rango anterior. Ante estas discrepancias nos planteamos la necesidad de establecer una dosis de radiación adecuada para las características especiales de nuestros animales —**dosis letal mínima**—, y que nos permitiese limitar los daños colaterales producidos por la radiación (Monje *et al.*, 2002; Monje y Palmer, 2003), al margen de la eliminación de la médula ósea. Además, no debíamos pasar por alto que en nuestros experimentos se iban a emplear animales muy jóvenes

(P19 el día de la irradiación) y, en ocasiones, portadores de la mutación *pcd*^{fl}, lo que les da una fragilidad añadida.

En el caso de la bomba de ⁶⁰Co no se llevó a cabo un análisis tan amplio como el realizado para la fuente de ¹³⁷Cs, ya que las pruebas realizadas por el Dr. Sánchez-Abarca en torno a la dosis empleada fueron suficientes para corroborar su idoneidad (datos no mostrados), y nos evitaron el sacrificio de un mayor número de animales con este fin. Por el contrario, el establecimiento de la “dosis letal mínima” en la fuente de ¹³⁷Cs requirió una serie de pruebas previas. Como resultado de las mismas, pudimos comprobar cómo existía una relación directa entre la dosis de radiación y el tiempo de supervivencia de los animales, en ausencia de trasplante. A mayor dosis de radiación, el tiempo de supervivencia era menor. En cuanto a la dosis seleccionada como “dosis letal mínima”, para esta segunda fuente, fue también de 7,5 Gy, similar a la utilizada previamente con la de ⁶⁰Co. Conviene destacar aquí que el motivo principal de no haber probado también una dosis de 7 Gy (intermedia entre 6,5 Gy –insuficiente– y 7,5 Gy) vino determinado por poder incluir en nuestro estudio a todos los animales trasplantados anteriormente con la fuente de ⁶⁰Co, y el evitar tener que plantearnos si podían existir diferencias en los resultados obtenidos en función de la dosis con la que se había irradiado. Además, hay que tener en cuenta que estábamos buscando una dosis letal –7,5 Gy lo era– que nos asegurase una sustitución completa de la médula del receptor por la del donante.

Influencia de la radiación en el proceso de llegada de células de la médula ósea al encéfalo

La irradiación del cuerpo entero del animal ha sido, y es, el método más utilizado para llevar a cabo la ablación de la médula ósea en experimentos de trasplante. Sin embargo, esta irradiación conlleva una serie de efectos secundarios: aumento de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (Shan *et al.*, 2007), estrés oxidativo (Manda *et al.*, 2007), inflamación encefálica transitoria (Johansson *et al.*, 2008), extravasación de células sanguíneas (Yuan *et al.*, 2006), procesos inflamatorios locales (Chiang *et al.*, 1993) y rotura temporal de la barrera hematoencefálica (Pachter *et al.*, 2003). Estos fenómenos tienen que ser considerados a la hora de interpretar los resultados obtenidos en este tipo de estudios. Recientemente se han publicado dos estudios que han puesto de manifiesto que la irradiación, aunque no es un requisito indispensable para la formación de células de Purkinje a partir de las CMO (Johansson *et al.*, 2008), contribuye a que este proceso se lleve a cabo con una frecuencia mucho mayor que en ausencia de ésta (Johansson *et al.*, 2008;

Nygren *et al.*, 2008). El efecto que la irradiación tiene en este proceso es a través de sus múltiples efectos secundarios detallados anteriormente, los más significativos son la inflamación y la infiltración de células sanguíneas en los tejidos (Nygren *et al.*, 2008).

A raíz de estas publicaciones, cabe plantearnos la importancia que, en nuestros resultados experimentales, puede llegar a tener la irradiación a la que se sometieron nuestros animales. En nuestro estudio, hemos dividido en dos partes la discusión de este posible efecto potenciador de la radiación, en función del tipo de resultados analizados en cada caso. La primera de ellas hace referencia al efecto del ambiente degenerativo en la llegada de las CMO al encéfalo; la segunda, al efecto de una médula ósea “sana” en los ratones mutantes *PCD* (ambos resultados serán discutidos en detalle en sus correspondientes apartados posteriores). En el primer caso, puesto que el análisis se realizó comparando la llegada de las CMO al encéfalo de animales trasplantados silvestres y mutantes, el posible efecto de la radiación fue similar en ambos grupos experimentales. Sin embargo, en el segundo caso, puesto que el análisis se llevó a cabo entre animales mutantes *PCD* con trasplante y sin él, el proceso de radiación podría estar teniendo un efecto en el grupo de animales trasplantados que habría que considerar a la hora de interpretar los resultados obtenidos (ver más adelante). Una forma sencilla de poder descartar este efecto de la radiación sería comparando entre sí dos grupos de animales *PCD* trasplantados (*beterotrasplantados* y *homotrasplantados*), de manera que ambos grupos estuviesen sometidos al mismo proceso experimental. El homotrasplante de animales *PCD* es ahora posible, como hemos comentado en el apartado anterior, gracias al establecimiento de la nueva colonia de animales *PCD*-(*CRE-GFP*). Por otro lado, aunque se consiga obtener dos grupos de animales que permitan descartar el efecto de la radiación, no debemos pasarlo por alto de cara a nuevos experimentos de este tipo. Por ello, debemos plantearnos también la posible eliminación de la médula ósea mediante sustancias químicas, cuyo efecto favorecedor del proceso de llegada de CMO al encéfalo ha quedado descartado (Magrassi *et al.*, 2007). Además, se ha demostrado también, tanto *in vivo* (Bellinzona *et al.*, 1996) como *in vitro* (Gobbel *et al.*, 1998), que la exposición de las neuronas a la radiación puede inducir apoptosis. Este hecho cobra especial relevancia en el caso de las células de Purkinje de los ratones mutantes *PCD*, ya que en el momento de la radiación (P19) se encuentran en pleno proceso degenerativo (Landis y Mullen, 1978), con lo que se podría estar contribuyendo a su neurodegeneración, que, además, se sabe que tiene lugar por procesos apoptóticos (Kyuhou *et al.*, 2006).

Finalmente, hay que reseñar el importante papel del proceso inflamatorio promoviendo los eventos de fusión de las CMO con células de Purkinje. A este respecto, se han

llegado a observar hasta un máximo de 2.364 células fusionadas en el cerebelo de un único animal (Johansson *et al.*, 2008) con encefalitis autoinmune experimental (EAE; modelo animal de la esclerosis múltiple humana; Kornek *et al.*, 2000). Es por ello por lo que cabe plantearnos la posibilidad de promover el proceso inflamatorio en nuestros animales experimentales para conocer si existe una mayor llegada de CMO al encéfalo de los animales mutantes *PCD* con inflamación y, lo que es más importante, si se consigue disminuir, o tal vez ralentizar, el proceso degenerativo.

Selección de los animales donantes

La selección del animal utilizado como donante es un punto clave en este proceso experimental, porque tanto las técnicas para el procesamiento del tejido de los animales receptores como las posibilidades posteriores de visualización de las células del donante van a estar determinadas por ello. En nuestro estudio, hemos utilizado dos tipos distintos de donantes, donantes CRE-GFP y donantes machos. A continuación, planteamos las ventajas e inconvenientes de cada uno de ellos.

Donantes CRE-GFP

Las principales ventajas de la utilización de estos donantes son:

1. Facilidad para visualizar las células del donante en el receptor:
 - en sangre periférica.
 - en tejidos sólidos.
2. Alta resolución morfológica.
3. Posibilidad de identificar los eventos de fusión cuando el receptor es un animal R26R.

El primero de estos puntos es muy importante, ya que, por un lado, permite realizar una aproximación al grado de incorporación de la médula ósea trasplantada –mediante citometría de flujo– y, por otro, conlleva un procesado del tejido de forma rápida y sencilla, disminuyendo los tiempos de experimentación. Además, como ha quedado patente en nuestros resultados (Figura 34), proporciona gran información morfológica, llegando incluso a permitir conocer el grado de integración de las células del donante en los tejidos del receptor. Finalmente, el tercero de los puntos resulta clave cuando lo que se quiere identi-

car es el mecanismo de plasticidad seguido por las CMO en el encéfalo, aunque está determinado por la necesidad de un animal receptor R26R.

Los mayores inconvenientes de la utilización de estos donantes vienen determinados por:

1. La posible aparición de problemas de consanguinidad.
2. El porcentaje de células GFP positivas de los donantes.
3. La presencia de falsos negativos (Mezey *et al.*, 2003).

El primero de estos inconvenientes no constituyó un problema en nuestro estudio (discutido en apartados anteriores); sin embargo, hemos creído conveniente mencionarlo ya que se trata de una complicación que puede aparecer si no se utilizan animales compatibles. El segundo de los inconvenientes surgió al utilizar como control positivo para los experimentos de citometría de flujo animales fluorescentes de la colonia CRE-GFP, y darnos cuenta de que no todas sus células eran GFP positivas. Como hemos descrito en los resultados, el valor medio del porcentaje de células GFP positivas de los animales donantes fue de $80,7 \pm 2,5\%$ (ESM). Este hecho conlleva la existencia de un 20% de las células del donante que es posible identificar, lo que constituye un problema grave cuando se trata de realizar un análisis de la llegada de las CMO a los diferentes tejidos de un animal receptor. Este inconveniente está directamente relacionado con el problema de los falsos negativos –tercer punto– puesto de manifiesto por Mezey y colaboradores en 2003. En su estudio, llevaron a cabo trasplantes de médula ósea de animales donantes GFP machos en receptoras hembras, y descubrieron que no todas las células con cromosoma Y eran GFP positivas; luego, había células del donante que no estaban siendo identificadas como tal: falsos negativos (Mezey *et al.*, 2003). Este hecho fue analizado en profundidad por Mothe y colaboradores (2005), quienes sugirieron la posibilidad de un silenciamiento parcial del transgen de la GFP. Este silenciamiento podría ocurrir por cambios en el ADN (como, por ejemplo, metilaciones) o por alteraciones a nivel transcripcional o traduccional (Toth *et al.*, 2007). No obstante, todavía no se conoce con certeza el mecanismo que está detrás de esta disminución de la expresión de GFP en los animales transgénicos. Así pues, la utilización de animales donantes GFP está inevitablemente condicionada por este fenómeno, con los consecuentes problemas a la hora de intentar visualizar la totalidad de las células de un animal donante en los tejidos de un animal receptor. Finalmente, no podemos olvidar que el mismo fenómeno de silenciamiento génico que puede ocurrir en el gen de la GFP podría estar ocurriendo también en el gen de la recombinasa Cre, aunque no se haya descrito hasta el momento.

Donantes machos

Las principales ventajas de la utilización de animales machos como donantes son:

1. La ausencia de problemas de consanguinidad.
2. Todas las células del donante presentan el marcador (cromosoma Y) con la mínima posibilidad de aparición de falsos negativos.
3. Alta especificidad de la técnica de hibridación *in situ*.

La primera de estas ventajas viene determinada por la posibilidad de realizar trasplantes entre individuos hermanos. En cuanto a la segunda, es bastante evidente, ya que todas las células somáticas de los animales machos presentan el cromosoma Y, a diferencia de lo que ocurría en el caso de los donantes GFP. En cuanto a los falsos negativos, hemos querido ser cautos y no hemos planteado la ausencia total de falsos negativos, pues no podemos olvidar que siempre cabe la posibilidad de tener en una sección la parte de una célula seccionada que no contenga el cromosoma Y. No obstante, este problema tiene una incidencia bastante menor que en el caso del silenciamiento de un *transgen*, que, además, siempre puede ser subsanado con el revelado de la sección consecutiva. Finalmente, hay que destacar la elevada especificidad que proporciona la técnica de la hibridación *in situ* a la hora de poder identificar una secuencia (Pardue y Gall, 1969).

Los mayores inconvenientes de la utilización de donantes machos en estudios de trasplantes son los siguientes:

1. Limitación del estudio, fundamentalmente, a la utilización de receptores hembras.
2. Visualización lenta y laboriosa de las células del donante en el receptor.
3. Mínima resolución de la morfología celular.
4. Dificultad para realizar estudios de citometría de flujo.
5. Imposibilidad de identificar los eventos de fusión, en el caso de producirse.

El primero de estos problemas constituye una limitación importante por varios motivos: por un lado, reduce a la mitad el número de animales, producidos en una colonia, que se pueden utilizar. Es verdad que podrían emplearse también receptores machos, pero la dificultad para identificar dos cromosomas Y dentro de un mismo núcleo es muy alta. Por otro lado, siempre cabría la duda de que alguna de esas células, con una información genética de un individuo macho, pudiese llegar a producir algún efecto en las hembras receptoras, como consecuencia de la síntesis de alguna proteína específica de machos (por ejemplo, a nivel hormonal). Así pues, sería conveniente realizar estudios que contemplasen esta posibilidad para poder tener más información sobre su efecto general en el receptor. El se-

gundo de los inconvenientes está relacionado con el procesamiento del tejido, por lo que no debería ser un problema cuando los resultados que se puedan obtener sean importantes, aunque conlleven un lento y laborioso proceso experimental. En cuanto al tercero de los puntos, la única información morfológica que se puede obtener en este caso está relacionada con el tamaño del núcleo en el que se observe el cromosoma Y. No obstante, esta información, aunque sea escasa, puede resultar muy útil, como en el caso presentado en nuestro estudio en la Figura 38 (D y E). Un inconveniente bastante grave es el presentado en cuarto lugar. La imposibilidad de realizar estudios de citometría de flujo hace que no se pueda realizar una aproximación a la efectividad del proceso de trasplante y, lo que es peor, que no se tenga un conocimiento del mismo hasta que no se haya procesado el tejido. Finalmente, la utilización de donantes machos impide identificar, si se estuviesen produciendo, los eventos de fusión. Bien es cierto que cabría la posibilidad de realizar conjuntamente la identificación de los cromosomas X e Y y, por tanto, de conocer su número. No obstante, nunca se podría afirmar rotundamente el mecanismo que ha llevado a la formación de esa célula.

Como se puede observar, las ventajas de uno de los tipos de donantes casi coinciden con los problemas del otro, y viceversa. Es por ello por lo que nosotros planteamos la utilización de un animal **donante macho CRE-GFP**, que permita aglutinar las ventajas y disminuir los inconvenientes de cada uno de ellos por separado. Este particular donante estaría caracterizado mayoritariamente por:

1. Facilidad para visualizar las células del donante en el receptor.
2. Posible realización de estudios de citometría de flujo.
3. Alta resolución morfológica.
4. Posibilidad de identificar los eventos de fusión en receptores R26R.
5. Eliminación de los falsos negativos si se realiza la hibridación *in situ* del cromosoma Y.
6. Alta especificidad para la identificación del marcador, en el caso del cromosoma Y.
7. Presencia del cromosoma Y en todas las células del donante, aunque no todas ellas serían GFP positivas.
8. Probabilidad de aparición de problemas de consanguinidad, solventados al utilizar nuestras colonias.
9. Visualización lenta y laboriosa de las células del donante en el receptor, si lo que se quiere identificar es el cromosoma Y.

Incorporación de las células del donante en el hospedador

Una de las primeras preguntas que nos hicimos al planificar nuestros experimentos fue la de elegir el tipo de trasplante más adecuado para nuestro estudio. Por un lado, era posible realizar los trasplantes por vía intraperitoneal y, por otro, por vía intravenosa. Inicialmente, dado el pequeño tamaño de nuestros animales receptores –de tan sólo 20 días de vida, y más pequeños aún si eran mutantes *PCD*– y la dificultad de inyectar con éxito en venas de pequeño calibre, el trasplante intraperitoneal se planteaba como la opción más atractiva. Sin embargo, nos parecía evidente que debían existir diferencias en cuanto a su efectividad, determinadas principalmente porque, con el trasplante intravenoso, las células trasplantadas se incorporan directamente al torrente sanguíneo, mientras que, con el trasplante intraperitoneal, no: con la consiguiente pérdida de células trasplantadas capaces de llegar al encéfalo. No obstante, puesto que los dos tipos ya habían sido empleados con éxito en estudios previos de trasplante de médula ósea (Brazelton *et al.*, 2000; Mezey *et al.*, 2000; Álvarez-Dolado *et al.*, 2003; Weimann *et al.*, 2003a; entre otros), no debíamos poner en duda la efectividad de ambos procedimientos. Nuestra intención fue la de analizar detalladamente este proceso de incorporación, en función del tipo de trasplante, para conocer si había diferencias que pudiesen afectar a la interpretación de los resultados. Este análisis nos llevó a elegir la vía intravenosa por dos motivos principales: por un lado, porque es el tipo de trasplante con el que se consiguen mayores porcentajes de incorporación de las células trasplantadas en los animales receptores. Por otro lado, porque, con el trasplante intravenoso, la incorporación es mucho más rápida que con el intraperitoneal, un motivo no tan evidente como el anterior, pero sí muy importante por las características propias de nuestro modelo experimental. Como hemos comprobado, a las 4 semanas, el porcentaje de células GFP positivas es casi similar al del donante, dato que concuerda con lo publicado en la bibliografía (Hayakawa *et al.*, 2003). Este hecho es significativo si tenemos en cuenta que, en el momento del trasplante, ya ha comenzado el proceso degenerativo en el cerebelo (Mullen *et al.*, 1976), así como si consideramos los tiempos en los que se va a desarrollar la muerte neuronal en otras regiones encefálicas (Mullen y LaVail, 1975; Blanks *et al.*, 1982; Greer y Shepherd, 1982; LaVail *et al.*, 1982; O’Gorman y Sidman, 1985; O’Gorman, 1985; Baker y Greer, 1990; Bartolomei y Greer, 1998).

El hecho de que no se observasen diferencias en cuanto al porcentaje de células incorporadas tras el trasplante intravenoso en función del tipo de receptor –silvestres (+/+) o mutantes *PCD* (*pcd/pcd*)–, no sólo nos sirvió para saber que los resultados obtenidos eran comparables entre los dos grupos experimentales, sino también para poner de manifiesto que la capacidad de los animales mutantes *PCD* para incorporar una médula ósea no se encuentra afectada por la mutación *pcd*^H.

Finalmente, cabe plantearnos la importancia que puede llegar a tener en nuestro estudio tanto el número de células trasplantadas como el tipo de éstas. En cuanto al número de células trasplantadas en nuestro estudio ($7,5 \times 10^6$ por animal), es más que suficiente si tenemos en cuenta los resultados obtenidos en los trabajos previos y el número de células que fueron inyectadas en ellos. Por lo general, las cantidades variaron entre los 5×10^6 células por animal (Priller *et al.*, 2001; Nygren *et al.*, 2008) y los 8×10^6 células por animal (Weimann *et al.*, 2003a), con múltiples variaciones intermedias. No obstante, es importante destacar que en el estudio llevado cabo por Johansson y colaboradores (2008), que ya ha sido mencionado anteriormente, se llegaron a observar en un único animal 2.364 células de Purkinje fusionadas con CMO, y se habían trasplantado 5×10^6 células. Este trabajo pone de manifiesto que 5×10^6 células son sobradamente suficientes para este tipo de estudios. Además, también se han publicado estudios en los que se demuestra cómo con una única célula madre hematopoyética se regenera todo el sistema hematopoyético de animales irradiados (Smith *et al.*, 1991), y se observan células de Purkinje fusionadas con CMO (Johansson *et al.*, 2008). Por último, para evitar la posible influencia del tipo celular trasplantado en nuestro estudio, no llevamos a cabo ningún fraccionamiento de la médula ósea trasplantada y, por tanto, utilizamos sin purificación subsiguiente todas las células nucleadas que la componían. Al comienzo de nuestro estudio se desconocía el tipo celular implicado en el proceso de llegada de células de la médula ósea al encéfalo, por lo que creímos conveniente el trasplante de médula ósea en su totalidad. Es importante reseñar que, recientemente, se ha publicado que el tipo celular implicado en los procesos de fusión celular con células de Purkinje forma parte de la población de CMH (Johansson *et al.*, 2008), y que puede llevarse a cabo tanto por células de linaje mieloide como linfoide (Nygren *et al.*, 2008).

Pruebas fisiológicas y de comportamiento

Las pruebas fisiológicas y de comportamiento se llevaron a cabo con el objetivo de analizar el efecto funcional del trasplante de una médula ósea “sana” en los ratones mutan-

tes *PCD*. Inicialmente, a la vista de los resultados obtenidos de este tipo de pruebas, se podría decir que existe una mejoría de los animales *PCD* cuando han sido sometidos a un trasplante de médula ósea “sana”. No obstante, analizaremos por separado los datos obtenidos de cada una de estas pruebas para tener un mejor conocimiento de su alcance e implicaciones.

El análisis estadístico de los datos de cada una de las pruebas se realizó a partir de los valores medios (\pm ESM) obtenidos de cada grupo experimental (**Silvestre, *PCD* trasplantado, *PCD* sin trasplante**). No se consideraron para el análisis estadístico las posibles diferencias existentes a lo largo de las diferentes pruebas, ya que no era el objetivo principal del estudio. La discusión sobre esta mejoría en el comportamiento de los animales *PCD* trasplantados con médula ósea “sana” la llevaremos a cabo posteriormente, una vez discutidos los datos sobre la llegada de CMO al cerebelo de los animales mutantes *PCD*.

Campo abierto

Comenzaremos el análisis de los 5 parámetros considerados con el *número de defecaciones*. Este parámetro es comúnmente utilizado como medida de la reactividad emocional y del estrés al que se encuentran sometidos los animales durante la realización de la prueba (Takahashi *et al.*, 2006). En nuestro estudio no se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales. Este hecho resulta muy importante, pues nos asegura que todos los animales estuvieron sometidos a un nivel similar de estrés durante la realización de las diferentes pruebas, y descarta su posible influencia sobre el resto de las variables. Además, también sugiere la ausencia de efectos de la mutación *pcd¹¹* sobre la motilidad intestinal y sobre el sistema nervioso periférico.

Del resto de los parámetros, los dos más importantes en relación con la capacidad motora de los animales fueron los “*cruces completos*” y los “*medios cruces*”. Los “*cruces completos*” son consecuencia de un desplazamiento normal, estable, continuo y en una misma dirección del animal. Por el contrario, los “*medios cruces*” se producen cuando el desplazamiento del animal es inestable, con paradas y cambios de dirección frecuentes. Así pues, los animales con una capacidad de movimiento normal obtendrán altos valores en los “*cruces completos*” y bajos en los “*medios cruces*”, según se observa en nuestro grupo de animales silvestres. Como era de esperar, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ambos parámetros en comparación con el grupo de animales mutantes *PCD* sin trasplante. En cuanto a los resultados obtenidos del grupo de animales *PCD* trasplantados con médula ósea “sana”, en el caso de los “*cruces completos*”, presentaron resultados muy similares a los

del grupo Silvestre, con valores más parecidos a los de un animal de este grupo que a los de un animal *PCD* sin trasplante. Por el contrario, en estos últimos, además de presentar un número mucho menor de “*cruces completos*”, la ataxia empeoraba con el tiempo, lo que se relaciona fácilmente con el desarrollo progresivo de la degeneración.

El número de “*medios cruces*” (bastante bajo en el caso de los animales silvestres en todas las pruebas) fue significativamente superior en los dos grupos de *PCD*, y era siempre mayor en los que no recibieron el trasplante de médula ósea. No resulta fácil encontrar una explicación al descenso del número de “*medios cruces*” en estos dos grupos, aunque resulta evidente –dado el estado en el que se encontraban los animales *PCD* sin trasplante– que no era consecuencia de una mejoría en su comportamiento. Así pues, es muy probable que ese descenso fuese consecuencia de una movilidad general menor, provocada por distintos grados de ataxia. En general, según estos resultados, podríamos inferir que el trasplante de una médula ósea “sana” en los animales mutantes *PCD* tiene un efecto positivo sobre su capacidad motora. No obstante, a la vista de los resultados histológicos posteriores, cabe preguntarse de qué manera se puede estar produciendo (discutido en apartados posteriores).

Finalmente, las otras dos variables consideradas (*limpiezas* y *alzadas*) son difíciles de delimitar como exclusivas de un tipo de comportamiento concreto (exploratorio y/o emocional) y van a estar, además, relacionadas con la diferente capacidad motora de los animales. Es decir, el hecho de que un animal se limpie o se alce en un mayor número de ocasiones no va a estar sólo relacionado con su comportamiento exploratorio o emocional, sino que va a depender también de que físicamente sea capaz de alzarse sobre sus dos patas y de mantenerse en esa posición durante algunos segundos. De ahí que la interpretación de estos datos en los dos grupos de animales *PCD* sea más complicada, ya que muy probablemente se encuentre influenciada por la mutación y el déficit motor subsiguiente. Si tenemos en cuenta que no se encontraron cambios en el número de defecaciones, es muy posible que las diferencias observadas no sean una consecuencia de la reactividad emocional, sino más bien de su capacidad motora. Independientemente del motivo de las diferencias observadas en estos dos parámetros, lo que sí es evidente es que el comportamiento de los animales mutantes *PCD* que fueron trasplantados con una médula ósea “sana” es diferente al del grupo de animales *PCD* sin trasplante. Esto está poniendo de manifiesto, al igual que los resultados relacionados con la capacidad motora, una recuperación funcional parcial relacionada con el trasplante de una médula ósea “sana”.

Velocidad media de desplazamiento

Esta prueba es, quizás, la que permite tener un conocimiento de la capacidad motora de los animales de forma más sencilla y fiable, porque posibilita observar puntualmente su habilidad motora, sin estar influenciada por el cansancio, ya que no solían tardar nunca más de un minuto en realizar la prueba completa. Como era esperable, los animales que presentaron una mayor velocidad de desplazamiento fueron los animales silvestres y los que tuvieron una menor velocidad, los mutantes *PCD* sin trasplante. En un punto intermedio entre los dos grupos anteriores, encontramos al grupo de animales *PCD* con trasplante. Curiosamente, no se observaron grandes diferencias en los resultados de cada grupo a lo largo de las diferentes pruebas, hecho que no concuerda con los resultados obtenidos de la prueba de campo abierto y de los resultados de “*cruces completos*” y de los “*medios cruces*”. Una posible explicación podrían proporcionarla la diferencia en la duración de cada una de las dos pruebas –5 minutos para la de campo abierto; y de 30 segundos a 1 minuto en la de la velocidad– y la menor resistencia de los animales mutantes, que se cansarían mucho antes con la degeneración.

Llegada de las células de la médula ósea al encéfalo de los animales receptores

Dividiremos el análisis de la llegada de las CMO al encéfalo de los animales receptores en dos secciones principales que englobarán la formación de elementos gliales (microglía y astrogliá) y la formación de elementos neuronales, respectivamente. El análisis de los primeros lo haremos de forma conjunta en los dos grupos de animales trasplantados (silvestres *homotrasplantados* y mutantes *PCD heterotrasplantados*) y en las dos regiones encefálicas de interés (cerebelo y BO), ya que los resultados obtenidos fueron similares en todos estos casos. En cuanto a la formación de elementos neuronales, discutiremos por separado los resultados obtenidos en cada una de las dos regiones de interés, infiriendo el posible efecto, tanto del ambiente degenerativo en la llegada de CMO a estas regiones como de una médula ósea “sana” en el cerebelo y BO de los animales mutantes *PCD*.

Formación de elementos gliales a partir de la médula ósea trasplantada

Microglía

En todos los casos, el tipo celular mayoritario formado a partir de la médula ósea trasplantada fue la microglía. Este hecho concuerda con los trabajos previos que han demostrado cómo gran parte de la microglía del cerebro adulto se forma a partir de la médula ósea (Eglitis y Mezey, 1997; Priller *et al.*, 2001; Wagers *et al.*, 2002; Corti *et al.*, 2002; Biffi *et al.*, 2004; Hess *et al.*, 2004; Simard y Rivest, 2004; Simard *et al.*, 2006; Ajami *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2007; entre otros). El hecho de no observarse diferencias cualitativas en cuanto a su abundancia y distribución entre los dos grupos experimentales puede estar determinado principalmente por dos razones. Por un lado, los porcentajes de incorporación de células del donante en los receptores fueron muy similares en todos los casos analizados. Así pues, la probabilidad de formación de nuevas células de microglía a partir de células de la médula ósea trasplantada fue semejante en todos los casos. Además, puesto que los animales donantes fueron siempre silvestres (sin la mutación *pcd^{fl}*), las CMO eran similares en todos los casos, con lo que no existían diferencias en su capacidad de migración o de diferenciación entre los dos grupos. Por otro lado, el haber sometido a todos los animales al mismo tipo de tratamiento (irradiación) conlleva que todos ellos se encontrasen condicionados de la misma manera. No obstante, no podemos olvidar que se trata de un estudio cualitativo y que, pese a la similitud entre los resultados de ambos grupos, no se han cuantificado detalladamente posibles diferencias. Finalmente, cabe preguntarse si el que uno de los dos grupos de animales trasplantados (*PCD heterotrasplantados*) presente una neurodegeneración puede estar influyendo en este proceso. Se han publicado múltiples evidencias de que la microglía que prolifera y que actúa en procesos de daño al SNC, como es el caso de la neurodegeneración del ratón mutante *PCD*, no es la originada a partir de la médula ósea, sino la residente en el encéfalo (Massengale *et al.*, 2005; Solomon *et al.*, 2006; Ajami *et al.*, 2007), lo que explicaría las similitudes en la población de células de microglía GFP positivas, en función de un ambiente degenerativo o no. Así pues, si existiera alguna diferencia en la población de microglía como consecuencia del proceso degenerativo, habría que buscarla en la población de microglía GFP negativa, es decir, la residente en el encéfalo y que no se está produciendo a partir de la médula ósea trasplantada. A este respecto, en nuestro laboratorio se ha comenzado recientemente un estudio de la población de microglía en el cerebelo de ratones silvestres y portadores de la mutación *pcd^{fl}*, con el que se pretende co-

nocer la participación de estas células en el proceso degenerativo que tiene lugar en el ratón mutante. En cuanto a los tipos de microglía originados a partir de las CMO, se encontraron ambos tipos (latente y activada), siendo mayoritaria la latente. Este hecho concuerda también con los datos presentados anteriormente sobre la activación de la microglía residente (Massengale *et al.*, 2005; Solomon *et al.*, 2006; Ajami *et al.*, 2007). Así pues, la mayoría de las células microgliales originadas a partir de la médula ósea pasa a formar parte de la microglía latente, sin descartarse la posibilidad de que alguna de ellas esté también activada (Ladeby *et al.*, 2005). Finalmente, la ausencia aparente de diferencias en la abundancia de células de microglía originadas a partir de la médula ósea trasplantada en distintos tiempos de estudio (P60, P110 y P150), se relaciona directamente con el trabajo publicado por Priller y colaboradores (2001b). En él se realizó un análisis semicuantitativo de la distribución de las células de microglía originadas a partir de la médula ósea trasplantada en diferentes tiempos después del trasplante. Además, estos autores realizaron su estudio en diferentes regiones, entre las que incluyeron el cerebelo y el BO. En estas dos regiones, los porcentajes de células microgliales originadas a partir de la médula ósea fueron muy similares, tanto a las 8 como a las 15 semanas después del trasplante (Priller *et al.*, 2001b), lo que concuerda con los resultados de nuestro estudio.

Astroglía

El otro elemento glial analizado en nuestro estudio fue la astroglía. En ninguno de nuestros animales, independientemente de su edad de sacrificio o de su genotipo para la mutación *pcd^{fl}*, se encontraron células con marcadores de la médula ósea trasplantada –cromosoma Y o expresión de GFP– que pudiesen ser considerados como astrocitos (por la expresión de GFAP o por una morfología característica). Este resultado no es nuevo y, además, concuerda con la mayoría de los trabajos previos (Brazelton *et al.*, 2000; Priller *et al.*, 2001b; Nakano *et al.*, 2001; Wehner *et al.*, 2003; Massengale *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2007). No obstante, hay que destacar que en los primeros estudios que analizaron la llegada de células de la médula ósea al encéfalo sí se describió la formación de este tipo celular (Eglitis y Mezey, 1997; Kopen *et al.*, 1999). Sin embargo, en los estudios posteriores no se ha podido corroborar esa primera observación sobre la formación de astrocitos a partir de la médula ósea, ni siquiera en estudios específicamente dirigidos a profundizar en dicho fenómeno (Wehner *et al.*, 2003). Nuestro estudio confirmaría que este tipo celular no deriva de elementos de la médula ósea, al menos en condiciones de trasplante.

Formación de neuronas a partir de la médula ósea trasplantada

En el cerebelo

Los resultados relacionados con la formación de elementos neuronales en el cerebelo de nuestros animales silvestres corroboran los trabajos previos publicados sobre este fenómeno (Priller *et al.*, 2001a; Wagers *et al.*, 2002; Álvarez-Dolado *et al.*, 2003; Weimann *et al.*, 2003a, b; Corti *et al.*, 2004; Magrassi *et al.*, 2007; Johansson *et al.*, 2008; Nygren *et al.*, 2008). En nuestros animales silvestres, las células de Purkinje con marcadores de la médula ósea trasplantada no presentaron una distribución preferencial por ninguna región específica del cerebelo, algo que concuerda con el trabajo de Johansson y colaboradores (2008) y que pone de manifiesto que este fenómeno puede producirse en cualquier punto del cerebelo con la misma probabilidad. La abundancia de estas células, así como su relación con el tiempo transcurrido después del trasplante, estuvo dentro de los valores descritos en trabajos anteriores que tuvieron un procesamiento parecido al nuestro (ablación de la médula ósea mediante irradiación, trasplante intravenoso y sin un condicionamiento adicional; Weimann *et al.*, 2003a; Magrassi *et al.*, 2007). Hay que reiterar que, en todos estos casos, su abundancia fue extremadamente baja comparada con la población total de células de Purkinje. Recientemente se ha demostrado que, cuando existe algún tipo de daño adicional, como la degeneración de células de Purkinje por sustancias tóxicas (Magrassi *et al.*, 2007) o la muerte neuronal asociada a la EAE (Johansson *et al.*, 2008), se incrementa notablemente el número de estas células y, además, aparecen en tiempos más cortos medidos desde el momento del trasplante.

En cuanto a la posible integración funcional de estas células de Purkinje —con marcadores de la médula ósea trasplantada— en el cerebelo de los animales receptores, los resultados anatómicos aquí presentados (largos axones con colaterales recurrentes; Figuras 34 y 35) contribuyen a aportar nuevos datos. Finalmente, la observación de células de Purkinje fusionadas mediante la técnica histoquímica del X-Gal es acorde con las publicaciones que demuestran que el mecanismo seguido por las CMO para originar células de Purkinje es la fusión celular (Álvarez-Dolado *et al.*, 2003; Weimann *et al.*, 2003a; Magrassi *et al.*, 2007; Johansson *et al.*, 2008; Nygren *et al.*, 2008).

Células de Purkinje poliploides

El resultado de un proceso de fusión celular es primariamente una célula con dos núcleos (heterocarionte; Ogle *et al.*, 2005). En nuestro estudio, la mayoría de las células de Purkinje con marcadores de la médula ósea trasplantada presentaron un soma de gran tamaño, y en aquellos casos en los que se analizó el número de núcleos que contenían siempre se encontraron dos (Figura 35J-L). La poliploidía de las células de Purkinje fue descrita en trabajos anteriores (Álvarez-Dolado *et al.*, 2003; Weimann *et al.*, 2003a; Magrassi *et al.*, 2007; Johansson *et al.*, 2008; Nygren *et al.*, 2008), y es consecuencia de un proceso de fusión celular de las células de Purkinje con CMO trasplantada. No obstante, se ha demostrado que el trasplante de médula ósea no es un requisito indispensable para su aparición, ya que en animales de avanzada edad que no han sido sometidos a ningún tipo de tratamiento (irradiación o trasplante) pueden encontrarse células de Purkinje con dos núcleos (Magrassi *et al.*, 2007). En estos casos –animales de avanzada edad sin trasplante– la fusión celular podría estar favorecida por la muerte de las células de Purkinje que se produce con la edad (Magrassi *et al.*, 2007), puesta de manifiesto por un descenso del número total de células de Purkinje en animales senescentes (Sturrock, 1989a,b; 1990). Como quiera que sea, estos resultados indican que la existencia de células de Purkinje poliploides ocurre espontáneamente a lo largo de la vida de animales silvestres sin ningún tipo de manipulación. Finalmente, en el trabajo del grupo de Johansson (2008) se describe cómo la formación de estos heterocariontes está modulada por factores inmunológicos, como los derivados de procesos inflamatorios. Cabe entonces plantearse el papel de estos factores limitando la pérdida de las células de Purkinje, un tipo neuronal que no puede ser reemplazado en adultos (Johansson *et al.*, 2008). Además, ante la llegada de las CMO a todo el encéfalo durante un proceso inflamatorio y su fusión selectiva con células de Purkinje, surge una nueva pregunta sobre componentes estructurales o neuroquímicos de las células de Purkinje que les confieren esa predisposición o posibilidad para llevar a cabo procesos de fusión celular.

Efecto del ambiente degenerativo en el proceso

Como ha sido descrito al comienzo de este trabajo, en la Introducción, el ambiente degenerativo juega un papel muy importante en la llegada de las CMO al encéfalo y está directamente relacionado con la formación de células de Purkinje poliploides. Sin embargo, los resultados obtenidos de nuestro estudio –ausencia total de células de Purkinje originadas a partir de la médula ósea trasplantada en el cerebelo de ratones mutantes *PCD* trasplantados– no concuerdan con los trabajos previos. A nuestro entender, los principales

motivos son tanto la temprana edad a la que comienza el proceso degenerativo en las células de Purkinje en los animales *PCD* como la rapidez con la que acontece (Landis y Mullen, 1978; Kyuhou *et al.*, 2006). Así pues, en el momento del trasplante (P20), el proceso degenerativo se encuentra ya avanzado y es demasiado tarde para poder revertirlo. Del mismo modo, no podemos olvidar que, en nuestros experimentos, realizamos una irradiación completa del animal para eliminar su médula ósea, y que, en el caso de los animales *PCD*, podría estar contribuyendo a la degeneración de las células de Purkinje, que se encuentran en pleno proceso degenerativo en el momento de la irradiación. Es por ello por lo que, en nuestro modelo experimental, la radiación, en vez de estar favoreciendo la aparición de un mayor número de células de Purkinje fusionadas (Johansson *et al.*, 2008; Nygren *et al.*, 2008), podría estar contribuyendo a la muerte de éstas (Bellinzona *et al.*, 1996; Gobbel *et al.*, 1998; Monje *et al.*, 2002; Mizumatsu *et al.*, 2003; Yuan *et al.*, 2006; Manda *et al.*, 2007). Por ello, planteamos como posible alternativa al proceso experimental seguido en este trabajo el realizar los trasplantes en edades más tempranas de las aquí seleccionadas y realizar la eliminación de la médula ósea mediante sustancias químicas, que permitan eliminar el posible efecto de la radiación sobre las células de Purkinje portadoras de la mutación *pcd*^{UJ}. No obstante, no hay que pasar por alto que el empleo de sustancias químicas también podría tener efectos secundarios (Spriggs *et al.*, 1986; Vahdat *et al.*, 1994) y afectar a la interpretación de los resultados.

Efecto del trasplante de una médula ósea “sana” en el cerebelo de los ratones mutantes *PCD*

Ante la ausencia de células de Purkinje, tanto originadas a partir de la médula ósea trasplantada como propias de los animales *PCD* trasplantados, nos planteamos el motivo que podría estar ocasionando la mejoría funcional observada en las pruebas de comportamiento (ver secciones anteriores). Nosotros planteamos dos posibles causas a esta mejoría funcional. La primera estaría relacionada con la presencia de una médula ósea “sana” en los animales mutantes trasplantados. Según esta hipótesis, la médula ósea silvestre (“sana”) podría producir la secreción de diversas quimioquinas y citoquinas, que estimulan la regeneración disminuyendo la incidencia de la apoptosis, suprimiendo reacciones inmunes y aumentando la angiogénesis, promoviendo la proliferación celular endógena y favoreciendo la recuperación funcional (Chen *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006; Prockop y Olson, 2007; Spees *et al.*, 2006; Chopp *et al.*, 2008), lo que contribuiría, de alguna manera, a la mejoría de los animales *PCD* trasplantados; este fenómeno no estaría ocurriendo en el caso de los animales mutantes sin trasplante, cuya médula ósea es portadora de la mutación *pcd*^{UJ}. Para poder

conocer más datos sobre este posible papel de la médula ósea “sana”, habría que realizar análisis mucho más detallados de la sangre de los animales mutantes trasplantados y sin trasplantar, y buscar si existe alguna diferencia en la presencia o en la concentración de diferentes citoquinas o factores de crecimiento. No obstante, no podemos olvidar que, hasta la fecha, no se ha descrito ningún efecto de la mutación *pcd*^{fl} en la médula ósea. La comprobación de la viabilidad de las CMO portadoras de la mutación *pcd*^{fl} se podría realizar a través del trasplante de médula ósea de animales mutantes *PCD* en animales receptores silvestres (trasplante del que ya hemos hablado en apartados anteriores).

Por otro lado, la segunda de nuestras hipótesis se basaría en los efectos producidos por la radiación, comentados anteriormente en esta Discusión. La radiación estaría produciendo procesos inflamatorios locales (Chiang *et al.*, 1993), rotura temporal 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), extravase de células sanguíneas (Yuan *et al.*, 2006) e inflamación encefálica transitoria (Johansson *et al.*, 2008). Fruto de ello se podría estar produciendo algún efecto a nivel sistémico que conllevaría la mejoría funcional observada en las pruebas de comportamiento. Para poder descartar este efecto de la radiación, bien se podrían llevar a cabo análisis paralelos con animales irradiados o tratados con sustancias químicas para eliminar su médula ósea, o bien se podría incluir un nuevo grupo experimental de animales mutantes *PCD* trasplantados con médula ósea portadora de la mutación *pcd*^{fl} (*homotrasplantados*).

Finalmente, no podemos obviar que la mejoría funcional de los animales *PCD* trasplantados podría estar localizada también fuera del SNC, como, por ejemplo, a nivel muscular. No obstante, no disponemos de evidencias sobre la posible llegada de CMO al músculo de los animales mutantes *PCD* trasplantados con médula ósea “sana”.

En el bulbo olfatorio

Los resultados que hemos obtenido sobre la llegada de CMO al BO permiten aportar nuevos datos sobre este fenómeno a los escasos y confusos existentes hasta el momento. La observación de neuronas perfectamente formadas en el BO de nuestros animales (Figura 38) constituye una demostración definitiva de la diferenciación neuronal en el BO a partir de CMO. Como hemos comentado en la Introducción, la llegada de CMO al BO, pese a tratarse de una de las regiones de mayor incorporación de nuevas neuronas durante la vida adulta del animal (Altman, 1969; Lois y Álvarez-Buylla, 1994; Carleton *et al.*, 2003),

era un proceso que requería un análisis en profundidad como el que hemos realizado en nuestro estudio.

El primer trabajo que abordó este análisis (Brazelton *et al.*, 2000) describió un número muy elevado de CMO que estaban expresando marcadores neuronales –del 0,2 al 0,3% del número total de neuronas– en el BO a los 2-3 meses después del trasplante. Sin embargo, si analizamos en detalle las imágenes publicadas en dicho estudio, ninguna de esas células presenta morfología claramente neuronal y, además, carecen de cualquier tipo de arborización. En este estudio fueron identificadas como neuroblastos (Brazelton *et al.*, 2000). Al año siguiente, Priller y colaboradores (2001) pusieron en entredicho las observaciones anteriores, ya que no fueron capaces de encontrar ninguna CMO con características neuronales en el BO de los animales en los que observaron células de Purkinje originadas a partir de CMO (como nosotros). En su trabajo, describen que las CMO sufren procesos de apoptosis antes de su completa diferenciación neuronal (Priller *et al.*, 2001a). Posteriormente, Corti y colaboradores (2002) publicaron un nuevo estudio en la línea de los resultados obtenidos por el grupo de Brazelton *et al.* (2000). En este trabajo, la mayoría de las CMO encontradas en el BO se localizaron en posición perivascular, endovascular y en las meninges. Las diferencias encontradas con el trabajo de Priller (2001) fueron atribuidas a los criterios utilizados para la realización de los recuentos (Corti *et al.*, 2002). El último trabajo que intentó arrojar un poco de luz sobre este campo se publicó en el 2005 (Massengale *et al.*, 2005). En él, no se encontraron CMO con características neuronales en el BO, pese a observarse células de Purkinje que expresaban marcadores del donante.

Así pues, con los resultados obtenidos en nuestro trabajo, contribuimos de una manera especial a acabar con la duda de si las CMO son capaces de llegar al BO y de dar lugar a neuronas en él. El hecho de que el número de estas células sea muy bajo no debe desalentarnos y llevarnos a abandonar la búsqueda de la vía por la que están llegando y el mecanismo que están siguiendo para su incorporación al BO. A este respecto, es importante destacar que ninguna de estas células observadas con marcadores del donante en el BO de los receptores presentaba más de un núcleo, lo que parece indicar que el mecanismo de plasticidad seguido por las CMO en este caso ha sido la transdiferenciación y no la fusión celular. No obstante, para poder confirmar esta observación habrá que llevar a cabo nuevos estudios que permitan conocer el mecanismo seguido por las CMO en el BO, para lo que serán muy útiles las colonias de animales aquí establecidas. Además, ante los resultados obtenidos del estudio de la poliploidía de las células mitrales en animales de avanzada edad (discutidos en el siguiente apartado), sería muy interesante analizar el BO de animales tras-

plantados con tiempos de supervivencia mucho más largos que los empleados en el presente trabajo (P150).

Células mitrales poliploides

La existencia de células poliploides en el BO no ha sido estudiada hasta el momento con el detalle que ha podido ser analizado este fenómeno en el caso de las células de Purkinje. A decir verdad, sólo se ha publicado un único trabajo que haya abordado esta cuestión y, además, fue llevado a cabo en murciélagos (Swartz y Bhatnagar, 1981). Así pues, se trata de un campo completamente nuevo y por explorar. En nuestro caso, el hecho de haber buscado células poliploides en el BO fue consecuencia de la repetida observación de células mitrales con grandes núcleos a lo largo de nuestras investigaciones. Esta circunstancia, junto con las características especiales de este tipo celular –alta actividad metabólica y bioeléctrica (Friedman y Strowbridge, 2000; Lowe, 2003; Djurisic *et al.*, 2004)–, nos llevó a pensar en la posibilidad de que, al igual que sucede en el caso de las células de Purkinje, algunas células mitrales podrían presentar una dotación cromosómica poliploide. Los resultados obtenidos no pueden ser considerados como definitivos, pues se trató de una única prueba y del marcaje para un único cromosoma. Sin embargo, la constatación de la existencia de células mitrales con cuatro copias de un mismo cromosoma –cromosoma 1– resulta una buena aproximación a este fenómeno, y nos sirve como base para la realización de nuevos trabajos orientados a conocer la posible poliploidía de este tipo celular.

Efecto del ambiente degenerativo en el proceso

En ninguno de los escasos trabajos previos que abordaron el estudio de la llegada de CMO al BO (ver apartado anterior) se estudió el efecto que un ambiente degenerativo puede tener en el proceso. En nuestro caso, la comparación de los resultados obtenidos de la llegada de CMO al BO de animales silvestres *homotrasplantados* y al de mutantes *PCD heterotrasplantados* nos permite conocer un poco más sobre si la degeneración de las células de Purkinje en los animales *PCD* está favoreciendo ese proceso con respecto a los animales silvestres. El hecho de no encontrar diferencias cualitativas al comparar los resultados de ambos grupos experimentales nos hace pensar que el ambiente degenerativo en esta región no está teniendo ningún efecto en el proceso. A la vista de estos resultados, cabe preguntarnos qué puede estar sucediendo para que la llegada de las CMO al BO no se vea afectada por un ambiente degenerativo como se ha demostrado en el caso del cerebelo (Bae *et al.*, 2005; Magrassi *et al.*, 2007; Johansson *et al.*, 2008; Nygren *et al.*, 2008). A nuestro entender, el hecho de que el ambiente degenerativo no esté afectando ni a la llegada de CMO ni a la

formación de nuevas neuronas puede estar determinado por la ausencia en el BO de células con capacidad fusogénica, como lo son las células de Purkinje en el caso del cerebelo. Esta afirmación está relacionada con el trabajo de Nygren y colaboradores (2008), quienes demostraron que, al llevar a cabo una lesión en el Cuerpo Estriado de ratones trasplantados, sólo se observaba fusión celular con las células de Purkinje del cerebelo y no en la región en la que se había producido el daño. Además, hay que tener en cuenta que las neuronas que hemos encontrado en el BO originadas a partir de la médula ósea trasplantada parecían haberse originado por procesos de transdiferenciación más que por fusión celular.

Efecto del trasplante de una médula ósea “sana” en el bulbo olfatorio de los ratones mutantes *PCD*

Al igual que hicimos en el caso del cerebelo, nos propusimos analizar si el trasplante de una médula ósea “sana” podría estar teniendo algún efecto en el BO de los animales mutantes *PCD* trasplantados. En este caso, el único resultado que se obtuvo fue a través de los análisis histológicos del BO. No se llevaron a cabo pruebas comportamentales –test olfatorios–, ya que en la bibliografía previa se había publicado que la llegada de la información olfatoria al BO de los ratones mutantes *PCD* era normal (Greer y Shepherd, 1982; Baker y Greer, 1990). Por un lado, la captación de 2-desoxiglucosa por los glomérulos del ratón *PCD* muestra que la llegada de la información aferente desde las neuronas receptoras olfatorias no se ve afectada por la mutación (Greer y Shepherd, 1982). Por otro lado, la actividad e inmunorreactividad de la enzima tiroxina hidroxilasa en el BO, que depende en gran medida de la llegada de información olfatoria (Baker *et al.*, 1983; 1993; Cho *et al.*, 1996; Weruaga *et al.*, 2000; Briñón *et al.*, 2001), permanece intacta en el ratón *PCD* (Baker y Greer, 1990). No obstante, a pesar de estas evidencias, sería conveniente realizar test olfatorios, no sólo en el caso de los animales trasplantados, sino también en el caso de animales mutantes sin trasplante, para poder aportar nuevos datos, más directos, sobre la capacidad olfatoria de estos animales.

En nuestro caso, el análisis histológico de los BO de los animales mutantes *PCD*, con y sin trasplante, no reveló diferencias cualitativas entre ellos. Así pues, a falta de la realización de test olfatorios, podríamos decir que el trasplante de una médula “sana” no tiene ningún efecto en el BO de los animales mutantes *PCD* trasplantados.

Otras regiones de interés

Finalmente, el ratón mutante *PCD* permite estudiar la llegada de las CMO a otras regiones en las que se está produciendo también un proceso degenerativo, al margen del

cerebelo y del bulbo olfatorio. Estas regiones de interés serían el tálamo, en el que se produce la degeneración selectiva de determinadas neuronas de algunos núcleos talámicos (O’Gorman y Sidman, 1985; O’Gorman, 1985), y la retina, en la que se produce una degeneración tardía, lenta y progresiva de los fotorreceptores de características similares a una retinosis pigmentaria (Mullen y LaVail, 1975; Blanks *et al.*, 1982; LaVail *et al.*, 1982, Marchena, 2008). Los resultados obtenidos del presente trabajo han permitido aportar nueva información sobre la llegada de CMO al encéfalo, tanto en un ambiente normal –fisiológico– como ante una neurodegeneración posnatal selectiva. Así pues, el análisis del tálamo y de la retina de animales mutantes *PCD* trasplantados se presenta como un nuevo reto para futuros desarrollos experimentales.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos planteados en este Trabajo de Tesis Doctoral, y como consecuencia de los resultados obtenidos y de la discusión llevada a cabo, hemos llegado a las siguientes conclusiones:

- I. Las colonias de ratones establecidas en este trabajo *-PCD-R26R, CRE-GFP* y *PCD-(CRE-GFP)-* permiten estudiar la llegada de las células de la médula ósea (CMO) al encéfalo de los animales mutantes *PCD*, y discernir entre eventos de transdiferenciación y de fusión celular.
- II. De las variantes analizadas, el procedimiento más adecuado para llevar a cabo experimentos de trasplante de médula ósea en animales de la colonia *PCD-R26R* es la irradiación del cuerpo entero del receptor con 7,5 Gy, seguida de la inyección intravenosa de la médula ósea de un donante macho *CRE-GFP*.
- III. El trasplante de médula ósea procedente de animales donantes silvestres en animales receptores portadores de la mutación *pcd^{fj}* produce una recuperación funcional parcial de su capacidad de movimiento. Esta mejora funcional no se correlaciona con una formación de nuevas células de Purkinje.
- IV. La médula ósea contribuye a la formación de elementos neurales en el encéfalo de animales adultos; de todos ellos, el tipo celular mayoritario es la microglía, aunque también existe una pequeña formación de tipos neuronales concretos de regiones cerebrales específicas, sin una distribución característica. La médula ósea no contribuye a la población de astrocitos del encéfalo de animales adultos.
- V. La degeneración de las células de Purkinje del cerebelo y de las células mitrales del bulbo olfatorio que tiene lugar en los animales mutantes *PCD* no induce la formación de estos tipos celulares a partir de la médula ósea.
- VI. El trasplante de médula ósea procedente de animales donantes silvestres en animales mutantes *PCD* no produce efectos aparentes sobre la población de células mitrales afectada por la expresión de la mutación *pcd^{fj}*.
- VII. Existe una formación de nuevas interneuronas en el bulbo olfatorio adulto a partir de la médula ósea. Este proceso no se encuentra alterado por la degeneración de las células mitrales.

Como conclusión general, podemos decir que el trasplante de células de la médula ósea resulta en cambios histológicos y conductuales. Ello no obstante, determinadas características de este proceso, tales como el bajo número de neuronas formadas, la limitación de los tipos neuronales y gliales resultantes y la ausencia de respuesta ante una pérdida neu-

ronal selectiva, tal como se observa en muchas enfermedades neurodegenerativas, indican la necesidad de continuar los estudios básicos antes de plantear una posible aplicación clínica.

ABSTRACT



VNiVERSiDAD D SALAMANCA

**BONE MARROW TRANSPLANTATION AND
IDENTIFICATION OF THE BONE MARROW DERIVED
NEURAL CELLS IN AN ANIMAL MODEL WITH SELECTIVE
NEURODEGENERATION, THE *PCD* MUTANT MOUSE.
APROXIMATION TO REGENERATIVE THERAPY WITH
ADULT STEM CELLS**

**-DOCTORAL THESIS-
(ABSTRACT)**

JAVIER SÁNCHEZ RECIO

Salamanca, October 2008

INTRODUCTION

In recent years mass media have brought to the attention of the general public a lot of information, unfortunately, in many cases, confusing information, concerning stem cells, and more specifically their perspectives of clinical application. Stem cells have been predicted to have an unlimited potential as a source of spare parts for the human body. Apart from their mediagenic impact, stem cells are one of the most fascinating areas of biology today. However, like many expanding fields of scientific inquiry, research on stem cells raises scientific questions as rapidly as it generates new discoveries.

One of the most significant discoveries in the last few decades in both Stem Cells and the Neuroscience field appeared with Altman's work (1962) about forming new neurons in mammal adult brains. This revolutionary discovery was later demonstrated in most vertebrates (García-Verdugo *et al.*, 2002). Almost forty years later, several papers have been published concerning a new way of forming new cells in adult brains. In this case, the participating stem cells are located outside the Central Nervous System (CNS), particularly in the bone marrow. Accumulating evidence has demonstrated that bone-marrow derived cells (BMC) display the capacity to change their fate, differentiating into hepatocytes (Petersen *et al.*, 1999; Theise *et al.*, 2000), endothelial cells (Jackson *et al.*, 2001), muscle cells (Bittner *et al.*, 1999; Gussoni *et al.*, 1999), cardiomyocytes (Orlic *et al.*, 2001), among others, and even nerve cells (Brazelton *et al.*, 2000; Mezey *et al.*, 2000; Álvarez-Dolado *et al.*, 2003; Weimann *et al.*, 2003a, b). This unexpected finding that BMC can differentiate into neurons has been recognized as a potential tool for the development of innovative therapeutic strategies to treat degenerative, post-traumatic and hereditary diseases of the CNS. Moreover, bone marrow is an ideal tool for regenerative medicine because of its accessibility and because doses and proliferative responses of bone marrow derived cells can be readily investigated. Furthermore, there are a number of well-defined mouse models and cell surface markers that allow an effective study of hematopoiesis in healthy and injured mice. The bone marrow harbours two distinct stem cell populations: hematopoietic stem cells (HSC; Becker *et al.*, 1963) and mesenchymal stem cells (MSC; Friedenstein *et al.*, 1966; Owen, 1988). When we started this work, the population of bone marrow stem cells that contributes to originate new cells in the brain was unknown, so we decided to perform whole bone marrow transplantation, without sorting its populations. However, nowadays,

HSC are considered the most likely population involved in this phenomenon (Johansson *et al.*, 2008; Nygren *et al.*, 2008).

Most of the previous experiments followed a similar procedure for determining the fate of bone marrow derived cells. Intravenous transplantation of genetically marked bone marrow was performed in mice that had received lethal irradiation. This produces a “chimeric mouse” in which the BMC fate is tracked over time by detecting the genetic tag in histological sections. This tagging is often in the form of sex mismatch, in which male Y chromosome bone marrow is transplanted into female receptors or in which the donor’s bone marrow is genetically tagged, usually with *lacZ* or green fluorescent protein (GFP). The arrival of BMC to the brain has been mainly studied in the cerebellum, where BMC contribute to the Purkinje cell population (Priller *et al.*, 2001a; Wagers *et al.*, 2002; Álvarez-Dolado *et al.*, 2003; Corti *et al.*, 2004; Bae *et al.*, 2005; 2007; Magrassi *et al.*, 2007; Johansson *et al.*, 2008; Nygren *et al.*, 2008) even in humans (Weimann *et al.*, 2003b). The responsible mechanism underlying this process has, for a long time, been a very controversial issue. Two possible mechanisms have been proposed: transdifferentiation and cell fusion. Recent evidence supports the second (Magrassi *et al.*, 2007; Johansson *et al.*, 2008; Nygren *et al.*, 2008), but very little is known about its regulation or its physiological/pathological significance. Further support to fusion comes from the observation that most of the Purkinje cells expressing markers of donor origin in grafted mice are binucleated (Álvarez-Dolado *et al.*, 2003; Weimann *et al.*, 2003a). It has also been shown that the frequency of these cells increases linearly with age and that they can survive for months (Magrassi *et al.*, 2007).

What is more, the contribution of BMC to other tissues has been described both in physiological and pathological conditions. The former’s frequency was always very scarce (Priller *et al.*, 2001b; Álvarez-Dolado *et al.*, 2003). However, that low basal frequency described for physiological conditions was always increased when receptors suffered some injury (Gussoni *et al.*, 1999; Lagasse *et al.*, 2000; Jackson *et al.*, 2001). With regard to the CNS, both intracranial transplantation in the damaged region (Bae *et al.*, 2005) and intravenous graft was also observed (Magrassi *et al.*, 2007). Finally, it is important to remark that irradiation, the most common procedure for removing receptor’s bone marrow in these experiments, is not necessary to induce fusion between BMC and Purkinje cells (Magrassi *et al.*, 2007). However, it has recently been reported that irradiation increases this process considerably (Johansson *et al.*, 2008; Nygren *et al.*, 2008).

As previously mentioned, the contribution of BMC to the brain has been mainly studied in the cerebellum. Other encephalic regions require a more extensive review of this

process. This is the case of the main olfactory bulb (OB). The OB is characterized by a continuous recruitment of new neurones throughout adulthood (Altman, 1969; Lois and Álvarez-Buylla, 1994; Carleton *et al.*, 2003). In spite of this, the arrival of BMC in this region has been poorly studied and the scarce previous works concerning this issue are confused and inconsistent (Brazelton *et al.*, 2000; Priller *et al.*, 2001a; Corti *et al.*, 2002; Massengale *et al.*, 2005).

None of these previous studies was accomplished in animals suffering degeneration in the OB. Hence, there is no evidence about the effect of a neurodegenerative environment in the contribution of BMC to the OB. To study this process, we employed the *PCD* (*Purkinje Cell Degeneration*) mouse, which suffers selective postnatal neurodegenerations in different encephalic areas at different ages (Mullen *et al.*, 1976; Fernández-González *et al.*, 2002). Homozygous recessive animals (*pcd/pcd*) are interesting models for neural degeneration, since they are completely normal at birth, thus avoiding prenatal compensatory mechanisms (Greer and Shepherd, 1982). The original mutation, denominated *pcd^{1J}*, is the one used in our study. *pcd/pcd* mice suffer degeneration of the Purkinje cells around 20 postnatal days, which causes severe ataxia (Mullen *et al.*, 1976). Moreover, they have a selective loss of OB mitral cells that begins around 60 days after birth. Prior to this age, the cellular and synaptic organisation in the OB seems to be normal, but during a short time window an accelerated mitral cell loss occurs, leading to an almost complete absence of these projection neurones by P90-P120. They also suffer degeneration of the lateral olfactory tract (Recio *et al.*, 2007), thalamic neurones (O’Gorman and Sidman, 1985) and photoreceptors (Mullen and LaVail, 1975; Blanks *et al.*, 1982; LaVail *et al.*, 1982). Therefore, *PCD* mutant mouse can be considered as a very suitable animal model to study the effect of different stages of a neurodegenerative process in the contribution of the BMC to the olfactory bulb.

OBJECTIVES

The general objective of this work is to contribute to the study of the arrival of the BMC to the adult brain, both in physiological and neurodegenerative conditions, being the latter as a consequence of a mutation. The particular objectives are:

1. To establish the different animal colonies to analyse this process in the *PCD* mutant mice and, thus, be able to discern the mechanism involved in it: cell transdifferentiation or cell fusion.
2. To establish an appropriate procedure for accomplishing bone marrow transplantation in animals carrying the *pcd*^{fj} mutation:
 - 2.1 To optimise the irradiation dose for removing receptor's bone marrow in our particular receptor mice.
 - 2.2 To analyse the differences between intravenous and intraperitoneal bone marrow transplantation.
 - 2.3 To refine the different ways of identifying donor cells in the receptor's brain.
3. To perform a behavioural study of the *PCD* mutant mice, in order to analyse the differences between mutant animals transplanted with wild-type bone marrow and mutant animals without any treatment.
4. To carry out a qualitative analysis of the BMC contribution to both the cerebellum and the olfactory bulb of transplanted animals, in both wild-type and *PCD* mutant mice.
 - 4.1 To analyse the BMC fate and neural differentiation in these regions.
 - 4.2 To investigate the effect of the neurodegenerative environment in this process in both the cerebellum and the olfactory bulb.
 - 4.3 To examine the effect of the wild-type bone marrow transplantation in both Purkinje and mitral cell populations of the *PCD* mutant mice.

The achievement of these objectives will suppose an important step forward towards a better knowledge of the biology of bone marrow cells and their possible uses in neurodegenerative pathologies.

MATERIALS AND METHODS

In bone marrow transplantation studies it is very important to be able to identify the donor's BMC and their progenies in receptor tissues. In our experiments we have refined and compared different methods to carry this out. On the one hand, we have done sex mismatch transplantation –male donors and female receptors– and identified donor BMC and their derived cells by means of their Y chromosome. On the other hand, we have employed CRE-GFP donors into R26R line receptors. In this line, the *LacZ* reporter gene is exclusively expressed after the excision of a loxP-flanked (floxed) stop cassette by Cre mediated recombination (Figure 1). When Cre-expressing cells fuse with R26R cells, Cre recombinase excises the floxed stop cassette of the reporter gene in the R26R nuclei, resulting in the expression of *LacZ* in the fused cells. Therefore, this second kind of transplantation gives the possibility of identifying the plasticity mechanism –transdifferentiation or cell fusion– carried out by the BMC in the encephalon. Thus, at the beginning of our experiments, we first had to generate and establish all the different animal colonies.

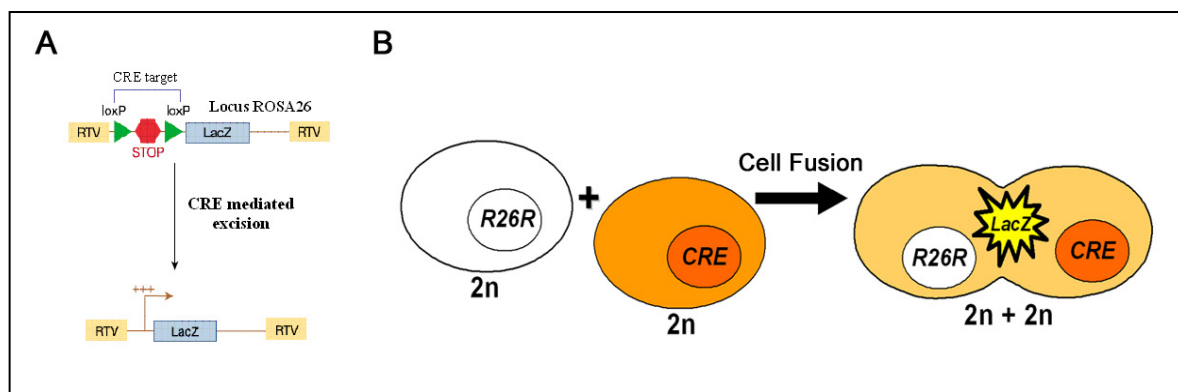


Figure 1. Method to detect cell fusion process. **A**, Schematic representation of R26R mice line and the effect of CRE mediated excision. **B**, A cell expressing CRE recombinase fuses with a R26R cell and *LacZ* reporter is expressed in the fused cell.

Our experimental animals were mice (*Mus musculus*, L. 1758) with or without *pcd*^{fl} mutation and with different genetic characteristics, depending on their colony. We established 3 different colonies: the *PCD*-R26R colony, which allows the animals to give birth to wild-type and *pcd/pcd* animals, both carrying the R26R line genetic properties. The CRE-GFP colony is the one from which CRE-GFP donors can be obtained. The *PCD*-(CRE-GFP) colony is able to produce *PCD* mutant animals that are CRE-GFP. These CRE-GFP

mutants will be used as donors for future experiments to analyse the effect of *PCD* bone marrow transplantation in a wild-type receptor. Mouse genotyping was performed by Polymerase Chain Reaction (PCR). All the experiments were carried out in accordance with the guidelines of the European Community Council (86/609/EEC) and current Spanish legislation for the use and care of laboratory animals (RD 1201/2005).

At 19 postnatal days, the animals undergoing transplantation were irradiated to remove their own bone marrow before graft. We employed a ^{60}Co or ^{137}Cs bomb and, after several tests, the dose selected was 7,5 Gy. This was the minimum lethal dose, most appropriate for the particular characteristics of our receptors (quite young –P19– and some of them were *PCD* animals). $7,5 \times 10^6$ bone marrow cells per animal were grafted the following day (P20). Two different methods of transplantation were tried: intraperitoneal, the easiest to carry out in our particular receptors (see above), and intravenous, more difficult than the former, but donor cells are directly introduced into the receptor's blood. The effectiveness of each method was measured by flow cytometry of peripheral blood at different times post-transplantation (2, 4 and 6 weeks), after using GFP donors. Comparing the results from both kinds of transplantation (see next section), the intravenous one was the method selected for our experiments. Moreover, peripheral blood from all animals transplanted with fluorescent cells was analysed at the moment of sacrifice to know the chimerism grade of receptors. Statistical differences for these analyses between wild-type and *PCD* receptors were assessed by *t test* and the level of significance was set at $p < 0,05$.

Fifteen days after transplantation (P35), we performed behavioural tests to inquire into the possible functional effect of the wild-type BMC in *PCD* mutant mice. Tests were open-field and medium speed of displacement. The tested animals were *PCD* mutants with wild-type bone marrow transplantation and both *PCD* and wild-type animals without graft, as controls. Behavioural tests were repeated 7 times for each group ($n=4$) every 2 weeks. Open-field was performed in a box shown in Figure 2. We counted “*complete cross*”, when the four paws of a mouse crossed a line completely, and “*half cross*” when only two paws crossed it and the animal moved back. In addition, we also quantified the “*grooming*” and “*rearing*” movements, and the number of “*defecations*”. For the medium speed of displacement test, we measured the time taken by the different animals in moving one metre (mm/s). Quantitative differences for behavioural tests were assessed by one-way ANOVA or the *Kruskal-Wallis* test, depending on the normality and homoscedasticity of the data. *Post hoc* analyses were *Bonferroni*, for normal data, and *Mann-Whitney U test* for the rest. The

level of significance was set at $p < 0,05$ (*) and $p < 0,01$ (**). The statistical software employed was SPSS v15.0 for Windows (SPSS, USA).



Figure 2. Photograph of the box where the open-field test was performed.

Experimental animals were sacrificed at 3 different ages: P60, P110 and P150. At P60 (40 days post-transplantation) most Purkinje cells are lost in *PCD* mutants, whereas mitral cell degeneration had not yet begun. At P110 (90 days post-transplantation) Purkinje cell death had already finished and neurodegeneration in the OB was taking place. At the last age, P150 (130 days post-transplantation) both degenerative processes had been completed. Moreover, we sacrificed 4 old (P300) wild-type mice without any treatment to look for polyploid mitral cells in their OB. With the exception of P300 animals, sacrificed by cervical dislocation, the others were anaesthetised and perfused through the ascending aorta with fixative solution. This solution was chosen according to the methods later employed for identifying donor cells (*in situ* hybridisation, X-Gal histochemistry or immunofluorescence). The brains were removed, cut into blocks, carefully rinsed and cryoprotected with 30% (w/v) sucrose in PBS (*Phosphate Buffered Saline*; 0,1M, pH 7,4) overnight at 4 °C. Following this, serial sections were obtained with a freezing microtome (50 μm) or a cryostat (14 μm) depending on the following procedures.

Finally, BMC were visualised and characterised in both wild-type and *PCD* transplanted animals. On the one hand, receptors grafted with CRE-GFP cells were analysed by both X-Gal histochemistry and double or triple immunofluorescence. X-Gal histochemistry allows the recognition of whether BMC contribute to receptor's encephalon through cell fusion. Immunofluorescent techniques were used to identify GFP cells along with other cellular antigens for both neurones (Calbindin for Purkinje cells; Reelin for mitral cells) and glial cells (GFAP for astrocytes; Iba1 for microglia). On the other hand, female receptors grafted with male cells were analysed by double *in situ* hybridisation for Y chro-

mosome-immunofluorescence (to characterise the Y chromosome positive cells). This latter technique was refined for our study thanks to Dr. Mezey, from the “*Adult Stem Cell Research Section*” (NIH; Bethesda, USA), who kindly provided us with her mouse Y chromosome probe (Eglitis and Mezey, 1997; Mezey *et al.*, 2000; Toth *et al.*, 2007). Furthermore, polyploid mitral cells were sought by *in situ* hybridisation for 1 chromosome in P300 wild-type animals. These animals were sacrificed by cervical dislocation, and their fresh OBs were dissected out and mitral cells dissociated to achieve the *in situ* hybridisation. In Figure 3, the general design of this experimental study is briefly summarised.

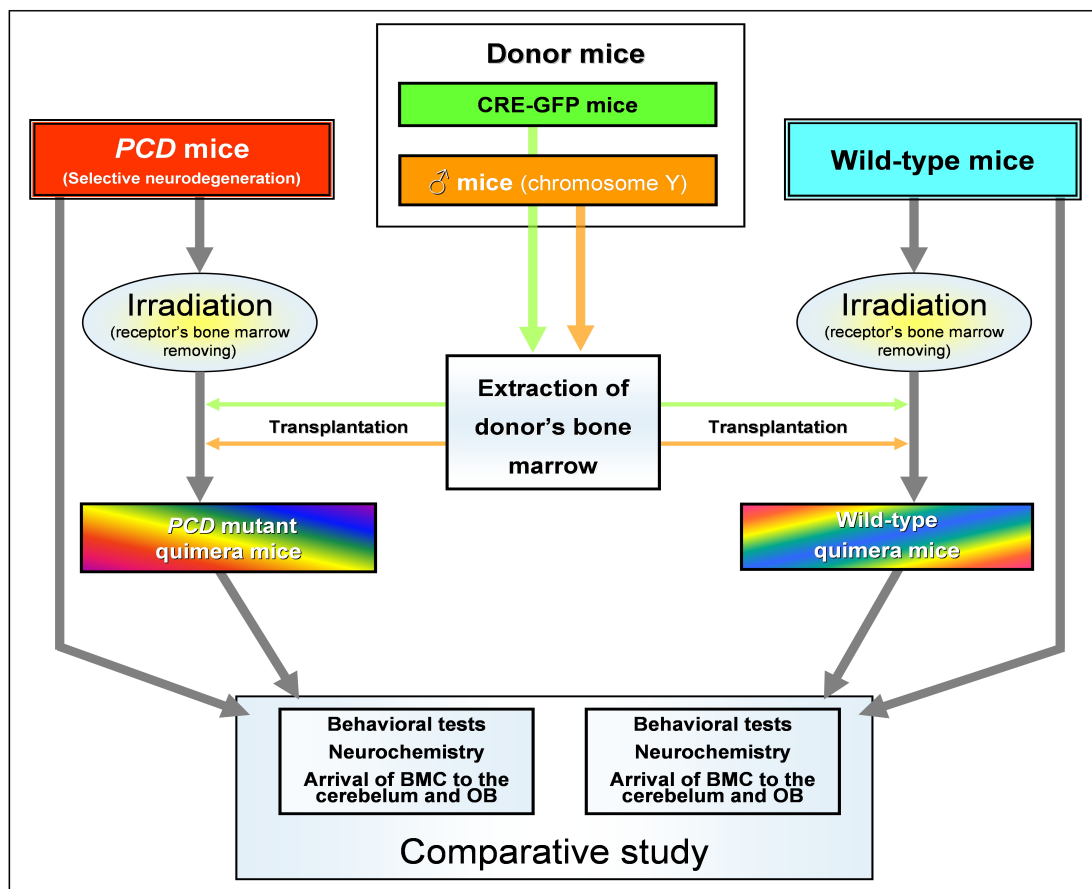


Figure 3. General design of the experimental study.

RESULTS

Once all the animal colonies necessary for our study and 7,5 Gy as the minimum lethal irradiation dose had been established for their particular animals, we looked for differences between intravenous and intraperitoneal transplantation. The results obtained from the analyses of the percentages of GFP positive cells in receptor's peripheral blood at different times post-transplantation are shown in figure 4. We also compared a CRE-GFP donor animal and an R26R animal without treatment as positive and negative controls, respectively. Taking these results into account we concluded that intravenous transplantation was better than the intraperitoneal method.

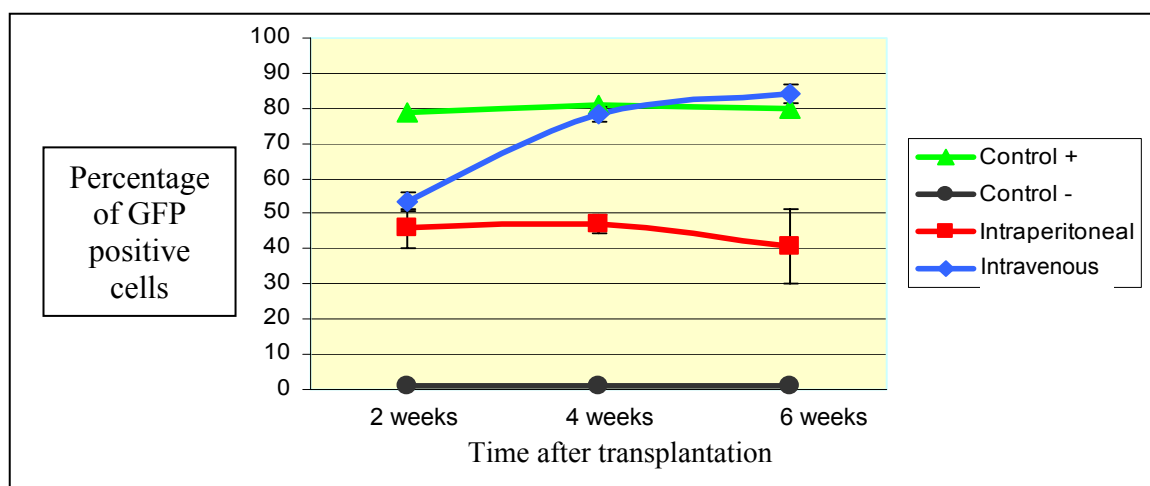


Figure 4. Quantitative analyses of the GFP positive cell percentages in peripheral blood depending on the type of transplantation at different periods.

It is noteworthy that none of the transplanted animals got GFP positive cell percentages higher than 90%. Neither did the positive controls. Furthermore, there was no significant difference (*t test*; $p < 0,05$) in the number of GFP positive cells in peripheral blood between *PCD* ($72,77 \pm 4,95\%$; mean \pm SEM) and wild-type ($74,85 \pm 1,78\%$; mean \pm SEM) transplanted mice.

With regard to the different behavioural tests, in the open-field one, significant differences were observed for all parameters linked with the movement capacity considered when comparing *PCD* and wild-type mice without treatment. In the case of *PCD* mice transplanted with wild-type bone marrow an intermediate behaviour between the other two experimental groups was observed (Figure 5). The results were similar for the medium speed of displacement test, which showed an improvement in the *PCD* mice after wild-type

bone marrow transplantation. All animals showed the same stress level (measured by the *defecation* parameter), which allowed the comparison of the results obtained for the different groups. In Figure 5, we present the results for all measured parameters in both behavioural tests.

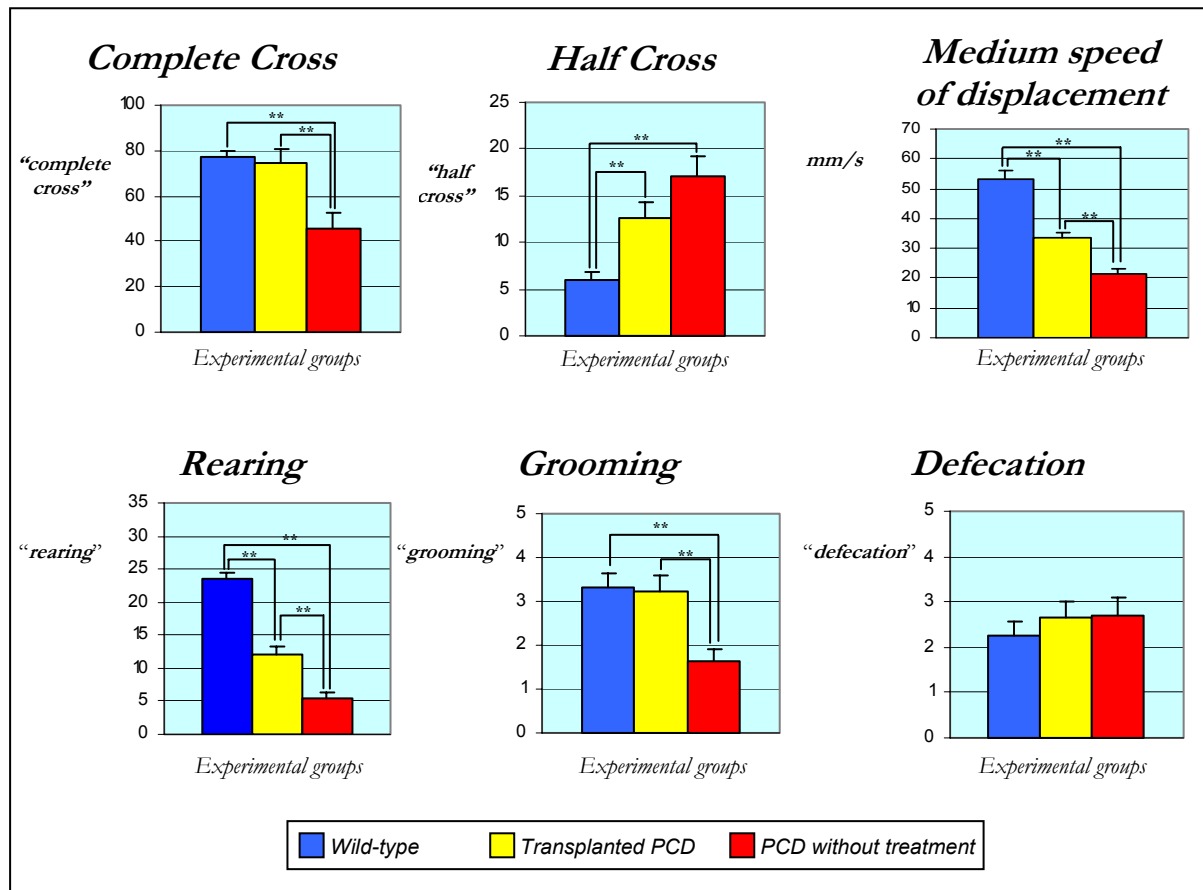


Figure 5. Summary of the results observed in the behavioural tests. The three charts at the top are connected with movement capacity. The two first charts at the bottom are related to exploratory behaviour. The defecation one measures stress level (** = $p < 0,01$). Values are mean \pm SEM.

It is noteworthy that while performing the medium speed of displacement test an important difference in the gait between both *PCD* mutant groups (transplanted and without treatment) was observed. This difference is illustrated in Figure 6, where the pattern of step for each experimental group is shown. Wild-type animals walked on their toes. However, *PCD* mice without treatment walked on their heels. Interestingly, the gait of transplanted *PCD* mice was more similar to wild-type animals than to *PCD* ones. We tried to perform footprinting tests, but the gait of the *PCD* without treatment animals made this impossible.

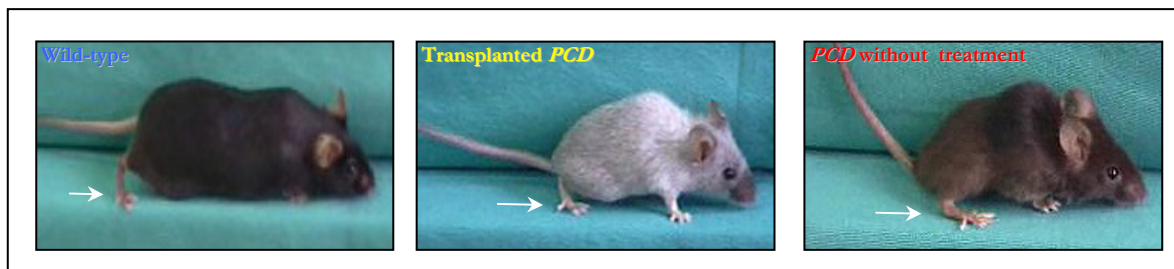


Figure 6. Photograms captured from videos recorded during the medium speed of displacement test of one representative animal from each experimental group.

After sacrificing the experimental animals, we analysed their encephalon looking for the donor BMC in both wild-type and *PCD* transplanted animals and the differences between transplanted *PCD* mice and *PCD* mice without treatment. The examination was focussed on the cerebellum and the OB. We compared the results from wild-type and *PCD* transplanted animals attempting to discover the possible effect of the neurodegenerative environment on the arrival and contribution of the BMC to these areas. In addition, comparing the results from transplanted *PCD* mice and *PCD* mice without treatment we tried to look into the effect of the wild-type bone marrow transplantation in the cerebellum and OB of the *PCD* mice.

The results, regarding the contribution of the BMC to glial elements, astrocytes and microglia, were similar for all transplanted animals (wild-type or *PCD*, at all the different ages), and also for both the cerebellum and the OB. In all the cases, microglial cells were the most prevalent element coming from the grafted bone marrow. Most of them were resting microglial cells, but some activated ones were also observed (Figure 7). With regard to the formation of astrocytes from bone marrow, no (GFAP positive) astrocyte was observed expressing markers of donor BMC (GFP or Y chromosome) in any experimental animal.

The results regarding the contribution of the BMC to neuronal elements were different depending on the receptor animal genotype and age. In the case of the cerebellum of wild-type transplanted animals, the only neuronal element found was Purkinje cells (Figure 8). They did not show any preferential location throughout the cerebellum. The maximum number of these Purkinje cells with donor labeling was 21 per cerebellum. They were only observed in animals sacrificed at P150. In all cases, there was no doubt that they were Purkinje cells, since they had their characteristic morphology and expressed Calbindin (CB; typical Purkinje cell marker) when checked (Figure 9). It was also possible to assess their integration in the cerebellar system through the observation of their long axons, even with recurrent collaterals (Figure 8B). Furthermore, we can affirm that the plasticity mechanism

involved in their contribution to the cerebellum was cell fusion, as displayed by X-Gal staining (Figure 9G-I) and polyploid cells expressing markers of donor BMC (Figure 9J-L).

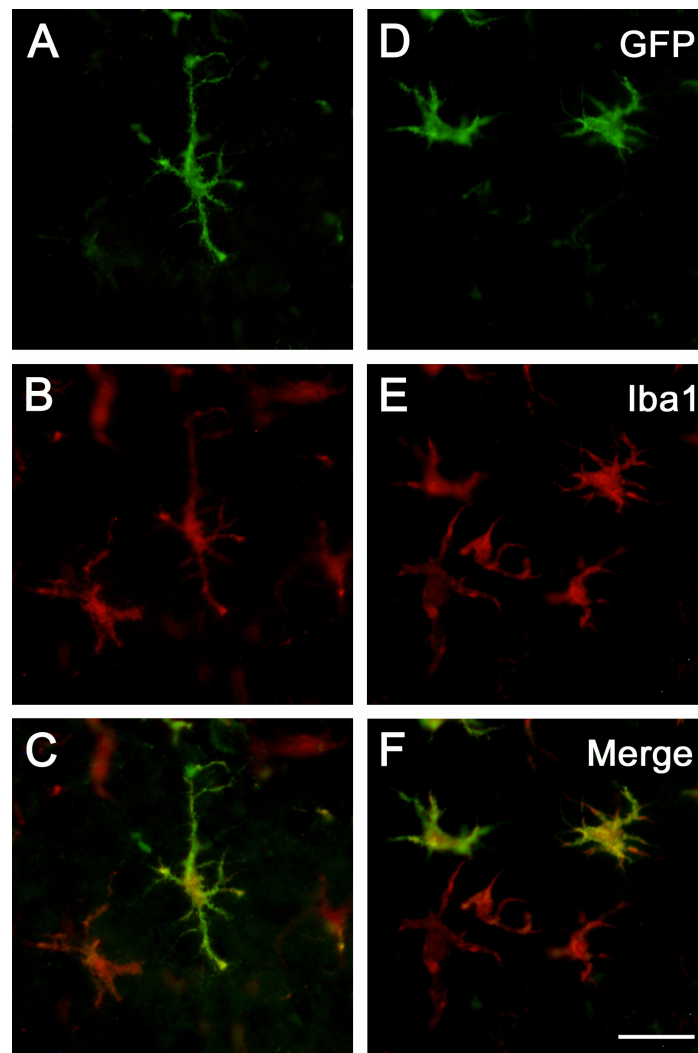


Figure 7. Epifluorescence conventional microscopy images from encephalic sections of a wild-type mouse transplanted with CRE-GFP bone marrow. They display the contribution of the bone marrow to the microglial cell population, both resting microglial cells (A-C) and activated ones (D-F). Upper images (A and D) show GFP labelling, which allows the identification of the newly generated cells coming from the transplanted bone marrow. Images in the central portion (B and E) present the Iba1 signal (microglial cell specific marker). Lower photographs (C and F) correspond with the merge of both previous images for each kind of microglial cell. It can also be observed that not every microglial cell comes from the transplanted bone marrow (microglial cells positive for both GFP and Iba1 marker), but many of them had been formed before. Scale bar: 20 μ m.

In the case of the cerebellum of *PCD* transplanted animals, no Purkinje cell with markers of donor BMC was found. This was similar for the three different ages studied, which was very surprising, considering the results obtained from the behavioural tests. Moreover, the histological comparison of the cerebellum from transplanted *PCD* and *PCD* mice without treatment did not show any differences.

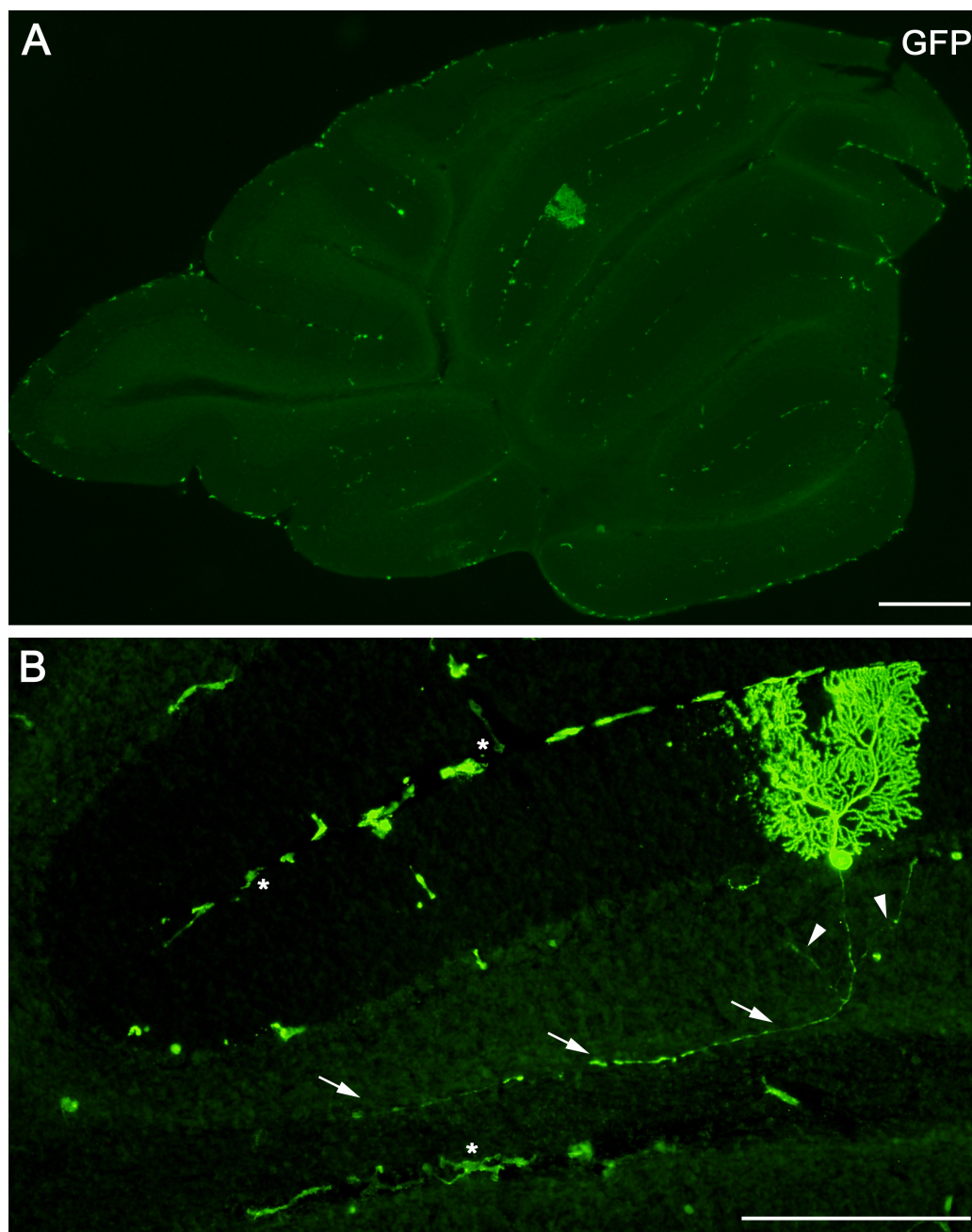


Figure 8. Epifluorescence conventional microscopy images of cerebellum sections from a wild-type mouse grafted with CRE-GFP bone marrow showing the GFP positive cells. **A** is a panoramic image that shows the distribution and abundance of the cells newly generated from the transplanted bone marrow in the cerebellum. A GFP positive Purkinje cell can be observed. **B** is a magnification of the previous image that allows the assessment with more detail of both the GFP positive Purkinje cell and the surrounding microglial cells. This GFP positive 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 characterise Purkinje cells. Furthermore, microglial cells were basically located in a peripheral position. Some of these microglial cells are indicated with asterisks. Scale bars: 200 μm for **A** and **B**.

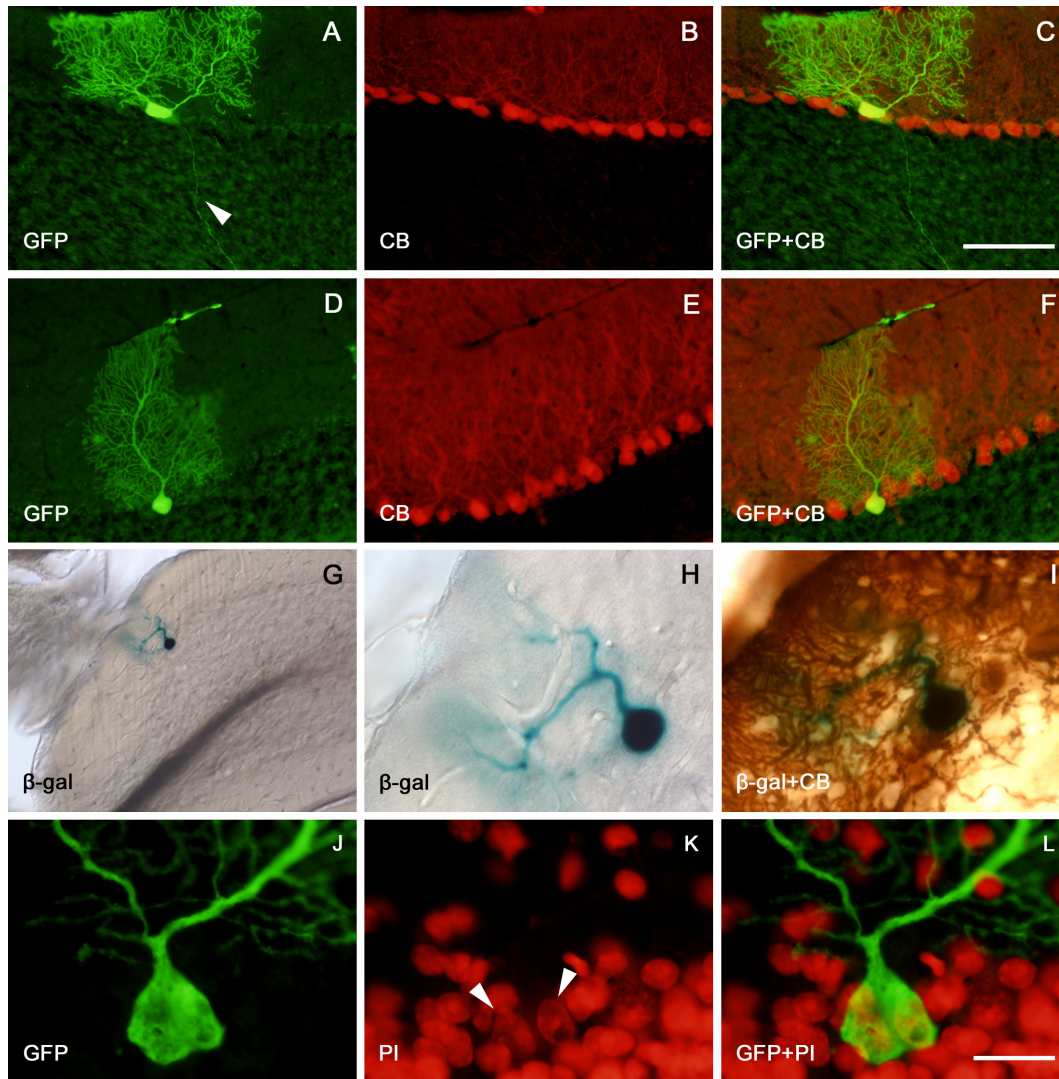


Figure 9. Fluorescence microscopy images of cerebellum sections from wild-type mice grafted with wild-type bone marrow from CRE-GFP donors showing some examples of Purkinje cells originated from the transplanted bone marrow. Images **A** and **D** present two different GFP positive Purkinje cells that are perfectly differentiated. The arrowhead in **A** indicates the axon. **B** and **E** display the Calbindin (CB) labelling for previous images and **C** and **F** the corresponding merge. Purkinje cells produced from the grafted bone marrow not only display the typical morphology of this specific cell type, but also they expressed CB, like the rest of Purkinje cells. **G-I** images show the X-Gal staining of a cerebellum section from a wild-type R26R mouse grafted with CRE-GFP bone marrow. In **G** there is a Purkinje cell that has undergone a fusion cell event with a BMC. **H** is a magnification of the fused cell in **G** and **I** is the double staining of that Purkinje cell for X-Gal and CB (by DAB immunohistochemical technique). Images at the bottom (**J-L**) present high magnifications of the soma from a GFP positive Purkinje cell (**J**), the staining of this region with the nuclear marker Propidium Iodide (PI; **K**) and the merge of both stainings (**L**). Arrowheads in **K** indicate the two nuclei belonging to the previous GFP positive Purkinje cell, which suggests it is a binucleated and presumable polyploid cell. Scale bar in **C**: 100 μm for **A-F**, 200 μm for **G** and 50 μm for **H** and **I**. Scale bar in **L**: 20 μm for **J-L**.

The analyses of the OB of wild-type transplanted animals disclosed very important data (not previously reported) about the contribution of the BMC to this area in normal

conditions. We found mature neurones expressing markers of donor BMC (GFP or Y chromosome). They were very scarce, but they were located throughout the different layers of the OB (Figure 10).

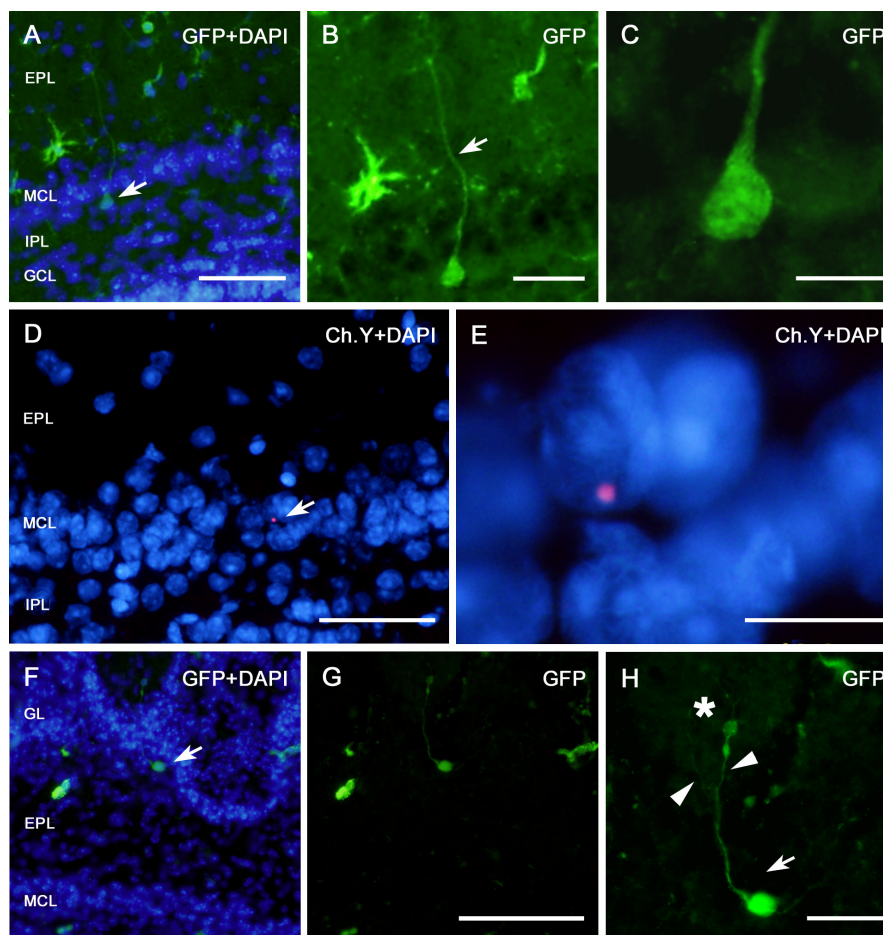


Figure 10. Fluorescence microscopy images of olfactory bulb (OB) sections from wild-type mice grafted with wild-type bone marrow from both CRE-GFP donors (A-C and F-H) and male donors (D and E) showing some examples of typical neuronal types of this region originated from the transplanted bone marrow. A-C present a GFP positive cell (with its nucleus stained with DAPI) in the IPL. It can be considered as a displaced granule cell, considering its typical morphology and location in the OB. B and C display details of its prolongation (arrow) and soma, respectively. D and E show a cell with Y chromosome (Ch. Y) in the MCL of a transplanted wild-type female mouse. E is a magnification of D and permits the observation of the nucleus size and the location of the Y chromosome in the outer region of the nucleus. Considering its position in the MCL and its large size nucleus, it can be considered to be a mitral cell, although these data are insufficient to be definitive. F-H display a GFP positive cell (with its nucleus stained with DAPI) in the GL of the OB. F is the same image without the nuclear staining and H is a magnification of this GFP positive cell in which its prolongation (arrow) can be easily observed projecting into one glomerulus (asterisk), where it divides into branches (arrowheads). Taking into account its location and morphology this cell can be classified as a juxtaglomerular cell. MCL: mitral cell layer. GL: glomerular layer. GCL: granule cell layer. EPL: external plexiform layer. IPL: internal plexiform layer. Scale bars: 50 μm for A, 25 μm for B, 10 μm for C, 50 μm for D, 10 μm for E, 100 μm for F and G, 25 μm for H.

As described for the cerebellum, there was not a preferential distribution of these cells newly generated from BMC. Moreover, in those cases where morphological characteristics were revealed (GFP labelling), they had the typical morphology of neurones belonging to the layer where they were found, displaying their integration in the olfactory bulb. Contrary to what was seen for the Purkinje cells, none of these newly generated cells had two nuclei, which suggests a possible trans-differentiation mechanism underlying their origin. These results were qualitatively similar for the *PCD* transplanted animals' OB, suggesting that the formation of olfactory neurones from BMC is not influenced by mitral cell degeneration. Correspondingly, the histological comparison of the olfactory bulb from transplanted *PCD* mice and *PCD* mice without treatment did not show any difference related to the effect of the wild-type bone marrow. Nevertheless, further studies will be required to clarify this topic quantitatively.

Finally, the analyses of P300 wild-type mitral cells with *in situ* hybridisation for “1” chromosome yielded surprising results. Some of these cells had four copies of the same chromosome, pointing out the existence of polyploid mitral cells (Figure 11). This phenomenon must be confirmed by future additional experiments.

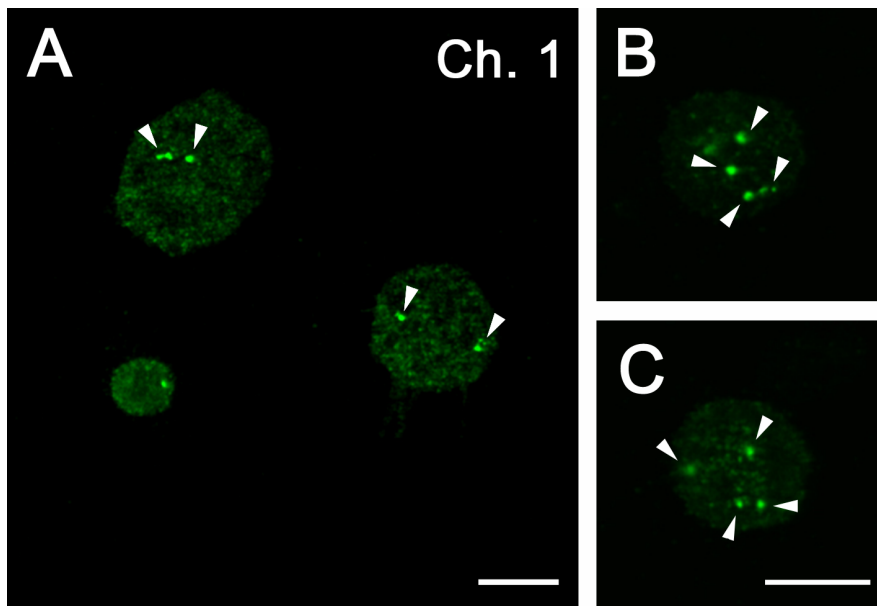


Figure 11. Epifluorescence conventional microscopy images from dissociated OB mitral cells from wild-type P300 animals where fluorescent *in situ* hybridisation for 1 chromosome (Ch. “1”, arrowheads) was performed. **A** shows three different cells, the smallest one is a granule cell and the larger ones are mitral cells. Mitral cells have 4 green dots, demonstrating their polysomy for this chromosome. **B** and **C** are photographs of other mitral cells that also have 4 copies (tetraploids) of the “1” chromosome (arrowheads). Scale bars: 25 μm for **A**, 10 μm for **B** and **C**.

DISCUSSION

The first objective proposed for this study was achieved with the establishment of the *PCD*-R26R, CRE-GFP and *PCD*-(CRE-GFP) colonies. These colonies have been confirmed as useful tools for studying the arrival of BMC in the encephalons of both wild-type and *PCD* mutant mice. Moreover, the graft from CRE-GFP donors to R26R receptors allows the discerning of the plasticity mechanism for BMC contribution to the encephalon (Álvarez-Dolado *et al.*, 2003; Oh *et al.*, 2003; Jin and Ding, 2006), which has been a very controversial issue during recent years (Kozorovitskiy and Gould, 2003; O'Malley and Scott, 2004). Future uses of these new animal colonies also permit the performance of new kinds of transplantations based, for example, on the use of CRE-GFP donors carrying the *pcd*^{fl} mutation in both wild-type and *PCD* receptors.

The second objective proposed was to optimise the irradiation dose for removing the receptor's bone marrow in our particular receptor mice. We decided to use irradiation, instead of chemical treatment to remove the receptor's bone marrow, because the former had been the most common treatment employed in previous studies (Brazelton *et al.*, 2000; Priller *et al.*, 2001a; Álvarez-Dolado *et al.*, 2003; Weimann *et al.*, 2003a, b; Dahlke *et al.*, 2006; Magrassi *et al.*, 2007; among others) and the aim was to compare our results with them. Although whole body irradiation is the most frequently selected method in this kind of experiments, it is important to note that there are some side effects –secretion of proinflammatory cytokines (Shan *et al.*, 2007), oxidative stress (Manda *et al.*, 2007), transient encephalic inflammation (Johansson *et al.*, 2008), extravasation of blood-borne cells into the CNS (Yuan *et al.*, 2006), local inflammatory changes (Chiang *et al.*, 1993), and blood-brain barrier permeability (Pachter *et al.*, 2003)– that must be considered when interpreting the results. Recently, two studies have been published describing that irradiation, although unnecessary for BMC contribution to Purkinje cells (Johansson *et al.*, 2008), promotes a very much higher frequency for this process (Johansson *et al.*, 2008; Nygren *et al.*, 2008).

The importance of these irradiation side effects in our experiments must be considered in two different parts, depending on the kind of results analysed in each case. The first is related to the effect of the neurodegenerative environment on the arrival of the BMC to the encephalon. The second is related to the effect of wild-type bone marrow transplantation into *PCD* mutant mice. In the first case, since we have compared transplanted animals, wild-type and *PCD* mice, the possible effect of the irradiation was similar in both cases.

However, in the second case, as the comparison was between transplanted *PCD* mice and untreated *PCD* mice, the irradiation procedure could affect these results. This is discussed later, in the section on the effect of wild-type bone marrow transplantation into *PCD* mutant mice. An easy way of avoiding this problem in future experiments could be by using CRE-GFP mutant mice as donors –now possible thanks to our newly established animal colonies–, instead of untreated *PCD* mice. Nevertheless, the only certain way of avoiding the irradiation effect would be by removing the receptor's bone marrow through chemical treatment. Furthermore, the fact that the degeneration of Purkinje cells in transplanted *PCD* mice could be affected by the irradiation process should also be considered. Some papers have demonstrated both *in vivo* (Bellinzona *et al.*, 1996) and *in vitro* (Gobbel *et al.*, 1998) that irradiation exposure can induce apoptosis in neurones. This fact is very important in the case of the Purkinje cells of the *PCD* mice, because their degeneration process takes place at the moment of irradiation (P19; Landis and Mullen, 1978) and it could increase this degenerative process, which normally happens due to apoptotic phenomena (Kyuhou *et al.*, 2006).

Another important issue that must be considered in bone marrow transplantation experiments is the correct selection of the donor animals. In this study two different kinds of donors, CRE-GFP and males have been compared. Both have advantages and disadvantages. On the one hand, CRE-GFP donors are mainly characterised by: 1, BMC are easily recognizable in receptor's tissue. 2, GFP offers a very high morphological resolution. It allows the identification of the plasticity mechanism, when the receptor is an R26R animal. Nevertheless, there are some problems with them: 1, consanguinity problems could appear between donors and receptors –not if using our colonies–. 2, It has been observed that there is an important percentage (about 20%) of CRE-GFP BMC that do not express GFP. 3, There is a problem with false negatives (Mezey *et al.*, 2003; Toth *et al.*, 2007). On the other hand male donors are mainly characterised by: 1, there is no problem related to consanguinity, because transplants can be performed using brothers as donors and sisters as receptors. 2, All donor cells have the donor tag (Y chromosome). 3, Problems with false negatives are minimum. 4, The *in situ* hybridisation, used for identifying donor cells, is very specific (Pardue and Gall, 1969). The main problems of using male donors are: 1, receptor animals should only be females. 2, Donor BMC identification in receptor's tissue is slow and laborious. 3, Morphological resolution is pretty low. 4, It is not possible to carry out flow cytometry studies. 5, It does not allow the identification of the plasticity mechanism of BMC in the encephalon. Considering all the points listed above, we propose using a **CRE-**

GFP male mouse as donor. This includes most of the previous advantages and reduces the disadvantages of each donor separately.

The additional objective of this work was to analyse the differences between intravenous and intraperitoneal bone marrow transplantation. We selected the intravenous method for two main causes. Firstly, the most evident reason was that the percentages of GFP positive cells in receptor's peripheral blood grafted intravenously were always higher than in the intraperitoneally grafted. Secondly, the intravenously grafted receptors reached percentages similar to positive controls (GFP animals) in a shorter period of time than the intraperitoneal ones. This fact is very important for our experiments, since when we do the graft, Purkinje cells in *PCD* mice are already in a neurodegenerative process (Mullen *et al.*, 1976). Moreover, the rest of the degenerative processes begin during the following weeks (Mullen and LaVail, 1975; Blanks *et al.*, 1982; Greer and Shepherd, 1982; LaVail *et al.*, 1982; O'Gorman and Sidman, 1985; O'Gorman, 1985; Baker and Greer, 1990; Bartolomei and Greer, 1998). As there were no differences in the percentage of GFP positive cells depending on the kind of intravenously grafted receptor (wild-type or *PCD*), we were able to both compare the results from both receptor groups and discover that *pcd^{fl}* mutation does not affect to the capacity of the *PCD* mutant mouse for accepting a new bone marrow.

Another objective contemplated at the beginning of this study was to carry out a behavioural study of the *PCD* mutant mice and to analyse the differences between mutant animals without any treatment and mutants transplanted with wild-type bone marrow. Taking into account the results described for the behavioural tests we can state that there was an improvement of *PCD* mice after wild-type bone marrow transplantation. However, this functional partial recovery was not corroborated by the histological analyses of their cerebellums. Possible causes for this phenomenon will be discussed later.

Finally, we carried out a qualitative analysis of BMC contribution to the cerebellum and olfactory bulb of transplanted animals, both wild-type and *PCD* mutant mice. In all of them, the most frequent cellular type originated from BMC was microglial. This is in accordance with previous papers that describe how many microglial cells come from the bone marrow (Eglitis and Mezey, 1997; Priller *et al.*, 2001a; Wagers *et al.*, 2002; Corti *et al.*, 2002; Biffi *et al.*, 2004; Hess *et al.*, 2004; Simard and Rivest, 2004; Simard *et al.*, 2006; Ajami *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2007; among others). The results regarding microglial cells were similar for all transplanted animals. We consider that it is a normal consequence, since all receptors underwent the same procedure (irradiation). Moreover, all of them were grafted with the same cell type (wild-type) and the percentages of GFP positive cells in their pe-

ripheral blood were similar for all of them. Nevertheless, it should not be forgotten that this was a qualitative study and quantitative analyses must be performed to confirm this result. We have wondered whether the fact that one of the animal groups studied (transplanted *PCD*) suffered neurodegeneration, did not influence the results. However, some authors have reported that the microglial cells which proliferate and act after injury to the CNS do not originate from the bone marrow, but are resident in the encephalon (Massengale *et al.*, 2005; Solomon *et al.*, 2006; Ajami *et al.*, 2007). Thus, this seems to be the main reason for not finding differences between transplanted animals despite the neurodegeneration. The possible differences in microglial cells' populations should be sought in the GFP negative microglial cells, namely the microglial cells that do not originate from the bone marrow. The other glial cell type studied was astrocytes. We did not find any astrocyte expressing markers of grafted bone marrow. This absence is in accordance with most of the previous studies (Brazelton *et al.*, 2000; Priller *et al.*, 2001b; Nakano *et al.*, 2001; Wehner *et al.*, 2003; Massengale *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2007) and demonstrates that BMC do not contribute to astrocytes.

The results concerning the contribution of the BMC to neuronal elements will be discussed separately for the cerebellum and the olfactory bulb. Regarding the cerebellum, our results from the wild-type animal group corroborated the previous studies about this phenomenon (Priller *et al.*, 2001a; Wagers *et al.*, 2002; Álvarez-Dolado *et al.*, 2003; Weimann *et al.*, 2003a, b; Corti *et al.*, 2004; Magrassi *et al.*, 2007; Johansson *et al.*, 2008; Nygren *et al.*, 2008). Both the frequency of Purkinje cells expressing markers of grafted bone marrow and their relationship with the time post-transplantation were within the values previously described in works which followed a similar procedure to ours (irradiation for removing receptor's bone marrow, intravenous graft and without additional conditioning). The results described in this work present new anatomical information not previously reported (long axons with recurrent collaterals) about the integration of Purkinje cells expressing BMC markers in the cerebellum system. Moreover, we confirm that the BMC fuse with Purkinje cells (Álvarez-Dolado *et al.*, 2003; Weimann *et al.*, 2003a; Magrassi *et al.*, 2007; Johansson *et al.*, 2008; Nygren *et al.*, 2008). This was verified by X-Gal staining and by the observation of Purkinje cells with two nuclei expressing markers of donor BMC. The results for the transplanted *PCD* cerebellum were unexpected, the more so if the results of the behavioural tests are considered. Contrary to our results, authors of previous articles reported that neurodegeneration had an important effect promoting the arrival of BMC and their fusion with Purkinje cells (Bae *et al.*, 2005; 2007; Magrassi *et al.*, 2007). We consider that one important

reason for our results could be the early age when Purkinje cells begin the degenerative process in *PCD* mice and its high speed (Landis and Mullen, 1978; Kyuhou *et al.*, 2006). Therefore, when the transplantation (P20) is performed the neurodegenerative process is already very advanced and perhaps it is too late to be able to change it. Furthermore, it should not be forgotten that the previous irradiation process could be accelerating the Purkinje cell degeneration (Bellinzona *et al.*, 1998; Gobbel *et al.*, 1998; Monje *et al.*, 2002; Mizumatsu *et al.*, 2003; Yuan *et al.*, 2006; Manda *et al.*, 2007). For this reason, we propose to achieve the transplantation at an earlier age than P20 and using a chemical treatment instead of irradiation for removing the receptor's bone marrow.

Taking into account the absence of Purkinje cells in transplanted *PCD* animals, neither originated from BMC nor belonging to them, we considered the functional partial recovery observed in the behavioural tests (aforementioned). We suggest two hypotheses for these results. The recovery in transplanted *PCD* animals could be a consequence of having a wild-type bone marrow. So, this "new" bone marrow without *pcd*^{fl} mutation could be producing some molecule that could reduce apoptosis or stimulate functional recovery (Chen *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006; Chopp *et al.*, 2008). To contribute information about this possibility it would be very interesting to compare blood from transplanted *PCD* mice and untreated *PCD* mice, looking for differences in their cytokine and growth factor levels. Our second hypothesis is based on the side effects of the irradiation process, previously described. As a consequence of it, there would be systemic changes in the transplanted *PCD* mice that would cause the functional recovery. Other possibilities should be considered, such as that the explanation for this observation could be located outside the CNS, for example, at a muscular level.

In addition, the results about the contribution of the BMC to neurones in the olfactory bulb allow us to add new data about this phenomenon to the scarce and confuse existing ones. Our observations are a final demonstration of the BMC contribution to the olfactory bulb neurones. It is true that these olfactory neurones expressing BMC markers were very scarce, however it should motivate researchers to look for the mechanisms that control it and the path that they follow to arrive in the OB. For the time being, since all these cells only had one nucleus, the plasticity mechanism seems to be trans-differentiation rather than cell fusion. With regard to the neurodegeneration effect in this process, if we compare the results from wild-type and *PCD* transplanted animals we do not find qualitative differences. This suggests that the contribution of the BMC to the olfactory neurones is not influenced by mitral cell degeneration. Finally, we investigated whether wild-type bone mar-

row transplantation could have some effect on the mitral cells of the transplanted *PCD* mice. We did not, however, find any significant effect when comparing transplanted *PCD* mice and untreated *PCD* mice. This comparison was assessed by looking for histological differences between the experimental *PCD* groups.

Briefly, this is the first time that the existence of polyploid mitral cells is proposed for mammals. Polyploid mitral cells have been studied only once, in bats (Swartz and Bhatnagar, 1981). Thus, this is an almost brand new field to investigate. We planned this research after many repetitive observations of mitral cells with huge nuclei. The results described here –mitral cells with four copies of the “1” chromosome– cannot be considered as definitive, since it was only one test and we only assayed for one chromosome. However, these results indicate a good approach to this unknown phenomenon.

CONCLUSIONS

In accordance with the objectives proposed for this Doctoral Thesis and as a consequence of the results obtained and the discussion executed, we can conclude the following statements:

- I. The different mouse colonies established in this study –*PCD*-R26R, CRE-GFP and *PCD*-(CRE-GFP)– allow the analysis of the bone marrow derived cells arrival in the encephalon of *PCD* mutant animals and discernment between transdifferentiation and cell fusion events.
- II. Among the different methods analysed, the most suitable procedure for accomplishing bone marrow transplantation in *PCD*-R26R animals is the receptor's whole body irradiation with a 7,5 Gy dose, and latter the intravenous injection of the bone marrow from a CRE-GFP male mouse.
- III. Wild-type bone marrow transplantation in *PCD* mutant mice confers a functional partial recovery of their movement capacity. This functional recovery does not correlate with a formation of new Purkinje cells.
- IV. The bone marrow contributes to the formation of new neural elements in the encephalon of adult animals; among them, the most predominant one is the microglia, although a scarce formation of particular neuronal types in specific encephalic regions, without a distinctive distribution, also exists. The bone marrow does not contribute to the formation of new astrocytes in the encephalon of adult animals.
- V. The degeneration of the Purkinje cells in the cerebellum and the mitral cells in the olfactory bulb, which happens in the *PCD* mutant mice, does not induce the formation of these particular cells from the bone marrow.
- VI. Wild-type bone marrow transplantation in *PCD* mutant mice does not induce apparent changes in the mitral cell population affected by the expression of the *pcd*^{fl} mutation.
- VII. There is a generation of new interneurons in the adult olfactory bulb from bone marrow. This process is not affected by mitral cell degeneration.

As a general conclusion, transplantation of bone marrow cells results in both histological and behavioural changes. Nevertheless, some particular characteristics of this

process, such as the low number of the newly generated neurones, the restriction of the neuronal and glial types formed and the lack of response against a selective neuronal loss, as it is observed in many neurodegenerative diseases, indicate the requirement of continuity with basic studies before planning a possible clinical application.

BIBLIOGRAFÍA

- Abedi M., Greer D. A., Foster B. M., Colvin G. A., Harpel J. A., Demers D. A., Pimentel J., Dooner M. S. y Quesenberry P. J. (2005). Critical variables in the conversion of marrow cells to skeletal muscle. *Blood*, 106: 1488-1494.
- Adams J. C. (1992). Biotin amplification of biotin and horseradish peroxidase signals in histochemical stains. *J. Histochem. Cytochem.*, 40: 1457-1463.
- Ajami B., Bennett J. L., Krieger C., Tetzlaff W. y Rossi F. M. (2007). Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat. Neurosci.*, 10: 1538-1543.
- Albertson D. G., Fishpool R. M. y Birchall P. S. (1995). Fluorescence *in situ* hybridization for the detection of DNA and RNA. *Methods Cell Biol.*, 48: 339-364.
- Alcalde I. (2003). Estudio neuroquímico del encéfalo del ratón mutante *pcd* y control. Tesis de Licenciatura, Universidad de Salamanca, Salamanca.
- Alison M. R., Poulsom R., Jeffery R., Dhillon A. P., Quaglia A., Jacob J., Novelli M., Prentice G., Williamson J. y Wright N. A. (2000). Hepatocytes from non hepatic adult stem cells. *Nature*, 406: 257.
- Allison A. C. (1953). The morphology of the olfactory system in the vertebrates. *Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc.*, 28: 195-244.
- Altman J. (1962). Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science*, 135: 1127-1128.
- Altman J. (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.*, 137: 433-457.
- Andrew W. (1937). The effects of fatigue due to muscular exercise on the Purkinje cells of the mouse, with special reference to the factor of age. *Cell Tissue Res.*, 27: 534-555.
- Andrew W. (1939). Origin and significance of binucleate Purkinje cells in man. *Arch. Pathol.*, 28: 821-826.
- Anjos-Afonso F., Siapati E. K. y Bonnet D. (2004). *In vivo* contribution of murine mesenchymal stem cells into multiple cell types under minimal damage conditions. *J. Cell Sci.*, 117: 5655-5664.
- Awatramani R., Soriano P., Mai J. J. y Dymecki S. (2001). An *Fbp* indicator mouse expressing alkaline phosphatase from the ROSA26 locus. *Nat. Genet.*, 29: 257-259.
- Álvarez-Dolado M. (2007). Cell fusion: biological perspectives and potential for regenerative medicine. *Front. Biosci.*, 12: 1-12.

- Álvarez-Dolado M., Pardal R., García-Verdugo J. M., Fike J. R., Lee H. O., Pfeffer K., Lois C., Morrison S. J. y Álvarez-Buylla A. (2003). Fusion of bone marrow derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature*, 425: 968-973.
- Bae J. S., Furuya S., Shinoda Y., Endo S., Schuchman E. H., Hirabayashi Y. y Jin H. K. (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: 1006-1011.
- Bae J. S., Han H. S., Youn D. H., Carter J. E., Modo M., Schuchman E. H. y Jin H. K. (2007). Bone marrow derived mesenchymal stem cells promote neuronal networks with functional synaptic transmission after transplantation into mice with neurodegeneration. *Stem Cells*, 25: 1307-1316.
- Baird K. y Pavletic S. Z. (2006). Chronic graft versus host disease. *Curr. Opin. Hematol.*, 13: 426-435.
- Baker H., Kawano T., Margolis F. L. y Joh T. H. (1983). Transneuronal regulation of tyrosine hydroxylase expression in olfactory bulb of mouse and rat. *J. Neurosci.*, 3: 69-78.
- Baker H., Kawano T., Albert V., Joh T. H., Reis D. J. y Margolis F. L. (1984). Olfactory bulb dopamine neurons survive deafferentation induced loss of tyrosine hydroxylase. *Neuroscience*, 11: 605-615.
- Baker H. y Greer C. A. (1990). Region specific consequences of *pcd* gene expression in the olfactory system. *J. Comp. Neurol.*, 293: 125-133.
- Baker H., Morel K., Stone D. M. y Maruniak J. A. (1993). Adult naris closure profoundly reduces tyrosine hydroxylase expression in mouse olfactory bulb. *Brain Res.*, 614: 109-116.
- Balsam L. B., Wagers A. J., Christensen J. L., Kofidis T., Weissman I. L. y Robbins R. C. (2004). Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature*, 428: 668-673.
- Bartolomei J. C. y Greer C. A. (1998). The organization of piriform cortex and the lateral olfactory tract following the loss of mitral cells in *pcd* mice. *Exp. Neurol.*, 154: 537-550.
- Bayer S. A. (1983). ³H thymidine radiographic studies of neurogenesis in the rat olfactory bulb. *Exp. Brain Res.*, 50: 329-340.
- Bäurle J. y Grüsser-Cornehls U. (1997). Differential number of glycine- and GABA-immunopositive neurons and terminals in the deep cerebellar nuclei of normal and *Purkinje cell degeneration* mutant mice. *J. Comp. Neurol.*, 382: 443-458.

- Bäurle J., Helmchen C. y Grüsser-Cornehls U. (1997). Diverse effects of Purkinje cell loss on deep cerebellar and vestibular nuclei neurons in *Purkinje cell degeneration* mutant mice: a possible compensatory mechanism. *J. Comp. Neurol.*, 384: 580-596.
- Becker A. J., McCulloch E. A. y Till J. E. (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*, 197: 452-454.
- Bellinzona M., Gobbel G. T., Shinohara C. y Fike J. R. (1996). Apoptosis is induced in the subependyma of young adult rats by ionizing irradiation. *Neurosci. Lett.*, 208: 163-166.
- Bex A., Vooijs M., Horenblas S. y Berns A. (2002). Controlling gene expression in the urothelium using transgenic mice with inducible bladder specific Cre-lox recombination. *J. Urol.*, 168: 2641-2644.
- Biffi A., De Palma M., Quattrini A., Del Carro U., Amadio S., Visigalli I., Sessa M., Fasano S., Brambilla R., Marchesini S., Bordignon C. y Naldini L. (2004). Correction of metachromatic leukodystrophy in the mouse model by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *J. Clin. Invest.*, 113: 1118-1129.
- Bishop C. E., Boursot P., Baron B., Bonhomme F. y Hatat D. (1985). Most classical *Mus musculus domesticus* laboratory mouse strains carry a *Mus musculus musculus* Y chromosome. *Nature*, 315: 70-72.
- Bittner R. E., Schöfer C., Weipoltshammer K., Ivanova S., Streubel B., Hauser E., Freilinger M., Höger H., Elbe-Bürger A. y Wachtler F. (1999). Recruitment of bone marrow derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic *mdx* mice. *Anat. Embryol. (Berl.)*, 199: 391-396.
- Bjornson C. R., Rietze R. L., Reynolds B. A., Magli M. C. y Vescovi A. L. (1999). Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells *in vivo*. *Science*, 283: 534-537.
- Blanks J. C., Mullen R. J. y LaVail M. M. (1982). Retinal degeneration in the *pcd* cerebellar mutant mouse. II. Electron microscopic analysis. *J. Comp. Neurol.*, 212: 231-246.
- Blau H. M., Brazelton T. R. y Weimann J. M. (2001). The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell*, 105: 829-841.
- Bobrow M. N., Harris T. D., Shaughnessy K. J. y Litt G. J. (1989). Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. *J. Immunol. Methods*, 125: 279-285.

- Bonner-Weir S. y Weir G. C. (2005). New sources of pancreatic beta cells. *Nat. Biotechnol.*, 23: 857-861.
- Brazelton T. R., Rossi F. M., Keshet G. I. y Blau H. M. (2000). From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science*, 290: 1775-1779.
- Briñón J. G., Crespo C., Weruaga E., Martínez-Guijarro F. J., Aijón J. y Alonso J. R. (2001). Bilateral olfactory deprivation reveals a selective noradrenergic regulatory input to the olfactory bulb. *Neuroscience*, 102: 1-10.
- Brittan M. y Wright N. A. (2002). Gastrointestinal stem cells. *J. Pathol.*, 197: 492-509.
- Brunjes P. C., Smith-Crafts L. K. y McCarty R. (1985). Unilateral odor deprivation: effects on the development of olfactory bulb catecholamines and behavior. *Brain Res.*, 354: 1-6.
- Burger P. E., Xiong X., Coetzee S., Salm S. N., Moscatelli D., Goto K. y Wilson E. L. (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. USA*, 102: 7180-7185.
- Camargo F. D., Green R., Capetanaki Y., Jackson K. A. y Goodell M. A. (2003). Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates. *Nat. Med.*, 9: 1520-1527.
- Camargo F. D., Finegold M. y Goodell M. A. (2004). Hematopoietic myelomonocytic cells are the major source of hepatocyte fusion partners. *J. Clin. Invest.*, 113: 1266-1270.
- Campbell D. B. y Hess E. J. (1996). Chromosomal localization of the neurological mouse mutations *tottering (tg)*, *Purkinje cell degeneration (pcd)*, and *nervous (nr)*. *Mol. Brain Res.*, 37: 79-84.
- Can A. y Karahuseyinoglu S. (2007). Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus derived stem cells. *Stem Cells*, 25: 2886-2895.
- Caplan A. I. (2000). Mesenchymal stem cells and gene therapy. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 379 (Supl.) S67-S70.
- Carleton A., Petreanu L. T., Lansford R., Álvarez-Buylla A. y Lledo P. M. (2003). Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nat. Neurosci.*, 6: 507-518.
- Carrascosa C., Torres-Alemán I., López-López C., Carro E., Espejo L., Torrado S. y Torrado J. J. (2004). Microspheres containing insulin like growth factor I for treatment of chronic neurodegeneration. *Biomaterials*, 25: 707-714.

- Carro E., Trejo J. L., Busiguina S. y Torres-Alemán I. (2001). Circulating insulin like growth factor I mediates the protective effects of physical exercise against brain insults of different etiology and anatomy. *J. Neurosci.*, 21: 5678-5684.
- Casper J., Knauf W., Kiefer T., Wolff D., Steiner B., Hammer U., Wegener R., Kleine H. D., Wilhelm S., Knopp A., Hartung G., Dolken G. y Freund M. (2004). Treosulfan and fludarabine: a new toxicity reduced conditioning regimen for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 103: 725-731.
- Caviness V. S. y Sidman R. L. (1972). Olfactory structures of the forebrain in the *reeler* mutant mouse. *J. Comp. Neurol.*, 145: 85-104.
- Caviness V. S. y Rakic P. (1978). Mechanisms of cortical development: a view from mutations in mice. *Annu. Rev. Neurosci.*, 1: 297-326.
- Chakrabarti L., Neal J. T., Miles M., Martínez R. A., Smith A. C., Sopher B. L. y La Spada A. R. (2006). The Purkinje cell degeneration 5J mutation is a single amino acid insertion that destabilizes *Nna1* protein. *Mamm. Genome*, 17: 103-110.
- Chang A. C. y Ghetti B. (1993). Embryonic cerebellar graft development during acute phase of gliosis in the cerebellum of *pcd* mutant mice. *Chin. J. Physiol.*, 36: 141-149.
- Chang Y. J., Shih D. T., Tseng C. P., Hsieh T. B., Lee D. C. y Hwang S. M. (2006). Disparate mesenchyme lineage tendencies in mesenchymal stem cells from human bone marrow and umbilical cord blood. *Stem Cells*, 24: 679-685.
- Chen J., Li Y., Katakowski M., Chen X., Wang L., Lu D., Lu M., Gautam S. C. y Chopp M. (2003). Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. *J. Neurosci. Res.*, 73: 778-786.
- Chen Y., Teng F. Y. y Tang B. L. (2006). Coaxing bone marrow stromal mesenchymal stem cells towards neuronal differentiation: progress and uncertainties. *Cell Mol. Life Sci.*, 63: 1649-1657.
- Chiang C. S., McBride W. H. y Withers H. R. (1993). Radiation induced astrocytic and microglial responses in mouse brain. *Radiother. Oncol.*, 29: 60-68.
- Chien K. R. (2006). Lost and found: cardiac stem cell therapy revisited. *J. Clin. Invest.*, 116: 1838-1840.
- Cho J. Y., Min N., Franzen L. y Baker H. (1996). Rapid down regulation of tyrosine hydroxylase expression in the olfactory bulb of naris occluded adult rats. *J. Comp. Neurol.*, 369: 264-276.

- Cho K. J., Trzaska K. A., Greco S. J., McArdle J., Wang F. S., Ye J. H. y Rameshwar P. (2005). Neurons derived from human mesenchymal stem cells show synaptic transmission and can be induced to produce the neurotransmitter substance P by interleukin 1 alpha. *Stem Cells*, 23: 383-391.
- Chopp M., Li Y. y Zhang J. (2008). Plasticity and remodeling of brain. *J. Neurol. Sci.*, 265: 97-101.
- Chu Y. W. y Gress R. E. (2008). Murine models of chronic graft versus host disease: insights and unresolved issues. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 14: 365-378.
- Chung S. S., Cuzin F., Rassoulzadegan M. y Wolgemuth D. J. (2004). Primary spermatocyte specific Cre recombinase activity in transgenic mice. *Transgenic Res.*, 13: 289-294.
- Clayton H., Titley I. y Vivanco M. (2004). Growth and differentiation of progenitor/stem cells derived from the human mammary gland. *Exp. Cell Res.*, 297: 444-460.
- Cohen Y. y Nagler A. (2004). Umbilical cord blood transplantation, how, when and for whom? *Blood Rev.*, 18: 167-179.
- Conconi M. T., Burra P., Di Liddo R., Calore C., Turetta M., Bellini S., Bo P., Nussdorfer G. G. y Parnigotto P. P. (2006). CD105(+) cells from Wharton's jelly show *in vitro* and *in vivo* myogenic differentiative potential. *Int. J. Mol. Med.*, 18: 1089-1096.
- Corti S., Locatelli F., Strazzer S., Salani S., Del Bo R., Soligo D., Bossolasco P., Bresolin N., Scarlato G. y Comi G. P. (2002). 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.
- Corti S., Locatelli F., Donadoni C., Guglieri M., Papadimitriou D., Strazzer S., Del Bo R. y Comi G. P. (2004). 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.
- Courville J. y Faraco-Cantin F. (1978). On the origin of the climbing fibers of the cerebellum. An experimental study in the cat with an autoradiographic tracing method. *Neuroscience*, 3: 797-809.
- Dahlke M. H., Loi R., Warren A., Holz L., Popp F. C., Weiss D. J., Piso P., Bowen D. G., McCaughan G. W., Schlitt H. J. y Bertolino P. (2006). Immune mediated hepatitis drives low level fusion between hepatocytes and adult bone marrow cells. *J. Hepatol.*, 44: 334-341.

- De Vries E. G., Vellenga E., Kluin-Nelemans J. C. y Mulder N. H. (2004). The happy destiny of frozen haematopoietic stem cells: from immature stem cells to mature applications. *Eur. J. Cancer*, 40: 1987-1992.
- Delacour A., Nepote V., Trumpp A. y Herrera P. L. (2004). Nestin expression in pancreatic exocrine cell lineages. *Mech. Dev.*, 121: 3-14.
- Desclin J. C. (1974). Histological evidence supporting the inferior olive as the major source of cerebellar climbing fibers in the rat. *Brain Res.*, 77: 365-384.
- Devine S. M., Cobbs C., Jennings M., Bartholomew A. y Hoffman R. (2003). Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood*, 101: 2999-3001.
- Djouad F., Plence P., Bony C., Tropel P., Apparailly F., Sany J., Noel D. y Jorgensen C. (2003). Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood*, 102: 3837-3844.
- Djurisic M., Antic S., Chen W. R. y Zecevic D. (2004). Voltage imaging from dendrites of mitral cells: EPSP attenuation and spike trigger zones. *J. Neurosci.*, 24: 6703-6714.
- Doetsch F. (2003). A niche for adult neural stem cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 13: 543-550.
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D. y Horwitz E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8: 315-317.
- Donadoni C., Corti S., Locatelli F., Papadimitriou D., Guglieri M., Strazzer S., Bossolasco P., Salani S. y Comi G. P. (2004). Improvement of combined FISH and immunofluorescence to trace the fate of somatic stem cells after transplantation. *J. Histochem. Cytochem.*, 52: 1333-1339.
- Doulazmi M., Hadj-Sahraoui N., Frederic F. y Mariani J. (2002). Diminishing Purkinje cell populations in the cerebella of aging heterozygous Purkinje cell degeneration but not heterozygous *nervous* mice. *J. Neurogenet.*, 16: 111-123.
- Doyonnas R., LaBarge M. A., Sacco A., Charlton C. y Blau H. M. (2004). Hematopoietic contribution to skeletal muscle regeneration by myelomonocytic precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 13507-13512.
- Duelli D. y Lazebnik Y. (2003). Cell fusion: a hidden enemy? *Cancer Cell*, 3: 445-448.
- Eccles J. C. (1967). Circuits in the cerebellar control of movement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 58: 336-343.

- Eglitis M. A. y Mezey E. (1997). Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 4080-4085.
- Erices A. A., Allers C. I., Conget P. A., Rojas C. V. y Minguell J. J. (2003). Human cord blood derived mesenchymal stem cells home and survive in the marrow of immunodeficient mice after systemic infusion. *Cell Transplant.*, 12: 555-561.
- Eriksson P. S., Perfilieva E., Björk-Eriksson T., Alborn A. M., Nordborg C., Peterson D. A. y Gage F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.*, 4: 1313-1317.
- Farbman A. I. (1992). The cell biology of olfaction. Cambridge University Press, Cambridge.
- Fawcett D. W. (1987). Tratado de Histología. 12ª edición. Interamericana-McGraw-Hill. Madrid.
- Fernández-González A., La Spada A. R., Treadaway J., Higdon J. C., Harris B. S., Sidman R. L., Morgan J. I. y Zuo J. (2002). *Purkinje cell degeneration (pcd)* phenotypes caused by mutations in the axotomy induced gene, *Nna1*. *Science*, 295: 1904-1906.
- Ferrari G., Cusella-De Angelis G., Coletta M., Paolucci E., Stornaiuolo A., Cossu G. y Mavilio F. (1998). Muscle regeneration by bone marrow derived myogenic progenitors. *Science*, 279: 1528-1530.
- Fine E. J., Ionita C. C. y Lohr L. (2002). The history of the development of the cerebellar examination. *Semin. Neurol.*, 22: 375-384.
- Fortier L. A. (2005). Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Vet. Surg.*, 34: 415-423.
- Friedenstein A. J., Piatetzky-Shapiro I. I. y Petrakova K. V. (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 16: 381-390.
- Friedenstein A. J., Chailakhjan R. K. y Lalykina K. S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.*, 3: 393-403.
- Friedenstein A. J., Chailakhyan R. K., Latsinik N. V., Panasyuk A. F. y Keiliss-Borok I. V. (1974a). Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning *in vitro* and retransplantation *in vivo*. *Transplantation*, 17: 331-340.
- Friedenstein A. J., Deriglasova U. F., Kulagina N. N., Panasuk A. F., Rudakowa S. F., Luria E. A. y Ruadkow I. A. (1974b). Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the *in vitro* colony assay method. *Exp. Hematol.*, 2: 83-92.

- Friedman D. y Strowbridge B. W. (2000). Functional role of NMDA autoreceptors in olfactory mitral cells. *J. Neurophysiol.*, 84: 39-50.
- Friedrich G. y Soriano P. (1991). Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Dev.*, 5: 1513-1523.
- Fuchs E., Tumber T. y Guasch G. (2004). Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell*, 116: 769-778.
- García-Verdugo J. M., Ferrón S., Flames N., Collado L., Desfilis E. y Font E. (2002). The proliferative ventricular zone in adult vertebrates: a comparative study using reptiles, birds, and mammals. *Brain Res. Bull.*, 57: 765-775.
- Ghetti B., Lyea C. J. y Uller J. (1978). Studies on the Purkinje cell degeneration (*pcd*) mutant: primary pathology and transneuronal change. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 37: 617.
- Ghetti B., Norton J. y Triarhou L. C. (1987). Nerve cell atrophy and loss in the inferior olivary complex of "Purkinje cell degeneration" mutant mice. *J. Comp. Neurol.*, 260: 409-422.
- Ghoumari A. M., Dusart I., El Etr M., Tronche F., Sotelo C., Schumacher M. y Baulieu E. E. (2003). Mifepristone (RU486) protects Purkinje cells from cell death in organotypic slice cultures of postnatal rat and mouse cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 7953-7958.
- Gibson A. J., Karasinski J., Relvas J., Moss J., Sherratt T. G., Strong P. N. y Watt D. J. (1995). Dermal fibroblasts convert to a myogenic lineage in *mdx* mouse muscle. *J. Cell Sci.*, 108: 207-214.
- Gobbel G. T., Bellinzona M., Vogt A. R., Gupta N., Fike J. R. y Chan P. H. (1998). Response of postmitotic neurons to X-irradiation: implications for the role of DNA damage in neuronal apoptosis. *J. Neurosci.*, 18: 147-155.
- Gong Q. y Shipley M. T. (1995). Evidence that pioneer olfactory axons regulate telencephalon cell cycle kinetics to induce the formation of the olfactory bulb. *Neuron*, 14: 91-101.
- Graham D. I., Thomas A. y Gennarelli A. (1997). *Greenfield's Neuropathology*. Oxford University Press, Nueva York.
- Granados-Fuentes D., Saxena M. T., Prolo L. M., Aton S. J. y Herzog E. D. (2004). Olfactory bulb neurons express functional, entrainable circadian rhythms. *Eur. J. Neurosci.*, 19: 898-906.

- Greer C. A. y Shepherd G. M. (1982). Mitral cell degeneration and sensory function in the neurological mutant mouse *Purkinje cell degeneration (pcd)*. *Brain Res.*, 235: 156-161.
- Greer C. A. y Halász N. (1987). 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.
- Greer C. A. (1987a). Golgi analyses of dendritic organization among denervated olfactory bulb granule cells. *J. Comp. Neurol.*, 257: 442-452.
- Greer C. A. (1987b). Conjugate internalization of apposed dendritic membranes during synaptic reorganization in the olfactory bulbs of adult *pcd* mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 510: 318-320.
- Griffiths M. J., Bonnet D. y Janes S. M. (2005). Stem cells of the alveolar epithelium. *Lancet*, 366: 249-260.
- Grillo M. A. (1970). Cytoplasmic inclusions resembling nucleoli in sympathetic neurons of adult rats. *J. Cell Biol.*, 45: 100-117.
- Grove J. E., Bruscia E. y Krause D. S. (2004). Plasticity of bone marrow derived stem cells. *Stem Cells*, 22: 487-500.
- Guettier C. (2005). Which stem cells for adult liver? *Ann. Pathol.*, 25: 33-44.
- Gussoni E., Soneoka Y., Strickland C. D., Buzney E. A., Khan M. K., Flint A. F., Kunkel L. M. y Mulligan R. C. (1999). Dystrophin expression in the *mdx* mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*, 401: 390-394.
- Gussoni E., Bennett R. R., Muskiewicz K. R., Meyerrose T., Nolte J. A., Gilgoff I., Stein J., Chan Y. M., Lidov H. G., Bonnemann C. G., Von Moers A., Morris G. E., Den Dunnen J. T., Chamberlain J. S., Kunkel L. M. y Weinberg K. (2002). Long term persistence of donor nuclei in a Duchenne muscular dystrophy patient receiving bone marrow transplantation. *J. Clin. Invest.*, 110: 807-814.
- Halász N., Johansson O., Hökfelt T., Ljungdahl A. y Goldstein M. (1981). Immunocytochemical identification of two types of dopamine neuron in the rat olfactory bulb as seen by serial sectioning. *J. Neurocytol.*, 10: 251-259.
- Handel M. A. y Dawson M. (1981). Effects on spermiogenesis in the mouse of a male sterile neurological mutation, *Purkinje cell degeneration*. *Gamete Res.*, 4: 185-192.
- Harding J. P., Graziadei P. P. C., Monti-Graziadei G. A. y Margolis F. L. (1977). Denervation in the primary olfactory pathway of mice. IV. Biochemical and morphological evidence for neuronal replacement following nerve section. *Brain Res.*, 132: 11-32.

- Harris A., Morgan J. I., Pecot M., Soumare A., Osborne A. y Soares H. D. (2000). Regenerating motor neurons express *Nna1*, a novel ATP/GTP binding protein related to zinc carboxypeptidases. *Mol. Cell Neurosci.*, 16: 578-596.
- Hatten M. E., Alder J., Zimmerman K. y Heintz N. (1997). Genes involved in cerebellar cell specification and differentiation. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 7: 40-47.
- Hayakawa J., Migita M., Ueda T., Shimada T. y Fukunaga Y. (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: 456-462.
- Heckers S., Ohtake T., Wiley R. G., Lappi D. A., Geula C. y Mesulam M. M. (1994). Complete and selective cholinergic denervation of rat neocortex and hippocampus but not amygdala by an immunotoxin against the p75 NGF receptor. *J. Neurosci.*, 14: 1271-1289.
- Heissig B., Ohki Y., Sato Y., Rafii S., Werb Z. y Hattori K. (2005). A role for niches in hematopoietic cell development. *Hematology*, 10: 247-253.
- Hentze H., Graichen R. y Colman A. (2007). Cell therapy and the safety of embryonic stem cell derived grafts. *Trends Biotechnol.*, 25: 24-32.
- Hess D. C., Abe T., Hill W. D., Studdard A. M., Carothers J., Masuya M., Fleming P. A., Drake C. J. y Ogawa M. (2004). Hematopoietic origin of microglial and perivascular cells in brain. *Exp. Neurol.*, 186: 134-144.
- Hinds J. W. (1968). Autoradiographic study of histogenesis in the mouse olfactory bulb. I. Time of origin of neurons and neuroglia. *J. Comp. Neurol.*, 134: 287-304.
- Hirano A. y Dembitzer H. M. (1973). Cerebellar alterations in the *weaver* mouse. *J. Cell Biol.*, 56: 478-486.
- Hirao A., Arai F. y Suda T. (2004). Regulation of cell cycle in hematopoietic stem cells by the niche. *Cell Cycle*, 3: 1481-1483.
- Houghton J., Stoicov C., Nomura S., Rogers A. B., Carlson J., Li H., Cai X., Fox J. G., Goldenring J. R. y Wang T. C. (2004). Gastric cancer originating from bone marrow derived cells. *Science*, 306: 1568-1571.
- Hudson J. E., Chen N., Song S., Walczak P., Jendelova P., Sykova E., Willing A. E., Saporta S., Bickford P., Sánchez-Ramos J. y Zigova T. (2004). Green fluorescent protein bone marrow cells express hematopoietic and neural antigens in culture and migrate within the neonatal rat brain. *J. Neurosci. Res.*, 76: 255-264.

- Hunyady B., Krempels K., Harta G. y Mezey E. (1996). Immunohistochemical signal amplification by catalyzed reporter deposition and its application in double immunostaining. *J. Histochem. Cytochem.*, 44: 1353-1362.
- Inukai T. (1928). On the loss of Purkinje cells, with advancing age, from the cerebellar cortex of the albino rat. *J. Comp. Neurol.*, 45: 1-31.
- Ishikawa F., Drake C. J., Yang S., Fleming P., Minamiguchi H., Visconti R. P., Crosby C. V., Argraves W. S., Harada M., Key L. L., Jr., Livingston A. G., Wingard J. R. y Ogawa M. (2003). Transplanted human cord blood cells give rise to hepatocytes in engrafted mice. *Ann. NY Acad. Sci.*, 996: 174-185.
- Iwano M., Plieth D., Danoff T. M., Xue C., Okada H. y Neilson E. G. (2002). Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J. Clin. Invest.*, 110: 341-350.
- Jackson K. A., Mi T. y Goodell M. A. (1999). Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 14482-14486.
- 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. y Goodell M. A. (2001). Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J. Clin. Invest.*, 107: 1395-1402.
- Jiang Y., Jahagirdar B. N., Reinhardt R. L., Schwartz R. E., Keene C. D., Ortiz-González X. R., Reyes M., Lenvik T., Lund T., Blackstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low W. C., Largaespada D. A. y Verfaillie C. M. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418: 41-49.
- Jin J. Z. y Ding J. (2006). Analysis of cell migration, transdifferentiation and apoptosis during mouse secondary palate fusion. *Development*, 133: 3341-3347.
- Johansson C. B., Youssef S., Koleckar K., Holbrook C., Doyonnas R., Corbel S. Y., Steinman L., Rossi F. M. y Blau H. M. (2008). Extensive fusion of haematopoietic cells with Purkinje neurons in response to chronic inflammation. *Nat. Cell Biol.*, 10: 575-583.
- Joseph N. M. y Morrison S. J. (2005). Toward an understanding of the physiological function of mammalian stem cells. *Dev. Cell*, 9: 173-183.
- Kaplan M. S., McNelly N. A. y Hinds J. W. (1985). Population dynamics of adult formed granule neurons of the rat olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.*, 239: 117-125.

- Karahuseyinoglu S., Cinar O., Kilic E., Kara F., Akay G. G., Demiralp D. O., Tukun A., Uckan D. y Can A. (2007). Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: *in situ* and *in vitro* surveys. *Stem Cells*, 25: 319-331.
- Kennedy C., DesRosiers M. H., Jehle J. W., Reivich M., Sharp F. R. y Sokoloff L. (1975). Mapping of functional neural pathways by autoradiographic survey of local metabolic rate with ¹⁴C-deoxyglucose. *Science*, 87: 850-853.
- Komuro H., Yacubova E., Yacubova E. y Rakic P. (2001). Mode and tempo of tangential cell migration in the cerebellar external granular layer. *J. Neurosci.*, 21: 527-540.
- Kondo M., Wagers A. J., Manz M. G., Prohaska S. S., Scherer D. C., Beilhack G. F., Shizuru J. A. y Weissman I. L. (2003). Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu. Rev. Immunol.*, 21: 759-806.
- Kopen G. C., Prockop D. J. y Phinney D. G. (1999). Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 10711-10716.
- Kornek B., Storch M. K., Weissert R., Wallstroem E., Stefferl A., Olsson T., Linington C., Schmidbauer M. y Lassmann H. (2000). Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions. *Am. J. Pathol.*, 157: 267-276.
- Korngold R. y Wettstein P. J. (1990). Immunodominance in the graft versus host disease T cell response to minor histocompatibility antigens. *J. Immunol.*, 145: 4079-4088.
- Kosaka K., Heizmann C. W. y Kosaka T. (1994). Calcium binding protein parvalbumin immunoreactive neurons in the rat olfactory bulb. 1. Distribution and structural features in adult rat. *Exp. Brain Res.*, 99: 191-204.
- Kozorovitskiy Y. y Gould E. (2003). Stem cell fusion in the brain. *Nat. Cell Biol.*, 5: 952-954.
- Krause D. S., Theise N. D., Collector M. I., Henegariu O., Hwang S., Gardner R., Neutzel S. y Sharkis S. J. (2001). Multi organ, multi lineage engraftment by a single bone marrow derived stem cell. *Cell*, 105: 369-377.
- Kushida T., Inaba M., Hisha H., Ichioka N., Esumi T., Ogawa R., Iida H. y Ikehara S. (2001). Intrabone marrow injection of allogeneic bone marrow cells: a powerful new strategy for treatment of intractable autoimmune diseases in MRL/lpr mice. *Blood*, 97: 3292-3299.
- Kyuhou S., Kato N. y Gemba H. (2006). Emergence of endoplasmic reticulum stress and activated microglia in *Purkinje cell degeneration* mice. *Neurosci. Lett.*, 396: 91-96.

- Ladeby R., Wirenfeldt M., Dalmau I., Gregersen R., García-Ovejero D., Babcock A., Owens T. y Finsen B. (2005). Proliferating resident microglia express the stem cell antigen CD34 in response to acute neural injury. *Glia*, 50: 121-131.
- Lagasse E., Connors H., Al Dhalimy M., Reitsma M., Dohse M., Osborne L., Wang X., Finegold M., Weissman I. L. y Grompe M. (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat. Med.*, 6: 1229-1234.
- Laine J. y Axelrad H. (1994). The candelabrum cell: a new interneuron in the cerebellar cortex. *J. Comp. Neurol.*, 339: 159-173.
- Landis D. M., Rosenberg R. N., Landis S. C., Schut L. y Nyhan W. L. (1974). Olivopontocerebellar degeneration. Clinical and ultrastructural abnormalities. *Arch. Neurol.*, 31: 295-307.
- Landis S. C. (1973). Ultrastructural changes in the mitochondria of cerebellar Purkinje cells of *nervous* mutant mice. *J. Cell Biol.*, 57: 782-797.
- Landis S. C. y Mullen R. J. (1978). The development and degeneration of Purkinje cells in *pcd* mutant mice. *J. Comp. Neurol.*, 177: 125-143.
- Lapham L. W. (1968). Tetraploid DNA content of Purkinje neurons of human cerebellar cortex. *Science*, 159: 310-312.
- Larramendi L. M. (1969). Electron microscopic studies of cerebellar interneurons. *UCLA Forum Med. Sci.*, 11: 289-307.
- LaVail M. M., Blanks J. C. y Mullen R. J. (1982). Retinal degeneration in the *pcd* cerebellar mutant mouse. I. Light microscopic and autoradiographic analysis. *J. Comp. Neurol.*, 212: 217-230.
- Leri A., Kajstura J. y Anversa P. (2005). Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiol. Rev.*, 85: 1373-1416.
- Li L. y Xie T. (2005). Stem cell niche: structure and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 21: 605-631.
- Li Y., Chopp M., Chen J., Wang L., Gautam S. C., Xu Y. X. y Zhang Z. (2000). Intrastriatal transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 20: 1311-1319.
- Li Y., McIntosh K., Chen J., Zhang C., Gao Q., Borneman J., Raginski K., Mitchell J., Shen L., Zhang J., Lu D. y Chopp M. (2006). Allogeneic bone marrow stromal cells promote glial axonal remodeling without immunologic sensitization after stroke in rats. *Exp. Neurol.*, 198: 313-325.

- Liao R., Pfister O., Jain M. y Mouquet F. (2007). The bone marrow cardiac axis of myocardial regeneration. *Prog. Cardiovasc. Dis.*, 50: 18-30.
- Locatelli F., Pession A., Bonetti F., Maserati E., Prete L., Pedrazzoli P., Zecca M., Prete A., Paolucci P. y Cazzola M. (1994). Busulfan, cyclophosphamide and melphalan as conditioning regimen for bone marrow transplantation in children with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, 8: 844-849.
- Lois C. y Álvarez-Buylla A. (1994). Long distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*, 264: 1145-1148.
- Lowe G. (2003). Electrical signaling in the olfactory bulb. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 13: 476-481.
- López-Mascaraque L. y de Castro F. (2002). The olfactory bulb as an independent developmental domain. *Cell Death Differ.*, 9: 1279-1286.
- Lu L. L., Liu Y. J., Yang S. G., Zhao Q. J., Wang X., Gong W., Han Z. B., Xu Z. S., Lu Y. X., Liu D., Chen Z. Z. y Han Z. C. (2006). Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis supportive function and other potentials. *Haematologica*, 91: 1017-1026.
- Ma Y., Xu Y., Xiao Z., Yang W., Zhang C., Song E., Du Y. y Li L. (2006). Reconstruction of chemically burned rat corneal surface by bone marrow derived human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 24: 315-321.
- Macrides F. y Schneider S. P. (1982). Laminar organization of mitral and tufted cells in the main olfactory bulb of the adult hamster. *J. Comp. Neurol.*, 208: 419-430.
- Magrassi L., Grimaldi P., Ibatici A., Corselli M., Ciardelli L., Castello S., Podesta M., Frasoni F. y Rossi F. (2007). Induction and survival of binucleated Purkinje neurons by selective damage and aging. *J. Neurosci.*, 27: 9885-9892.
- Mahmood A., Lu D., Wang L., Li Y., Lu M. y Chopp M. (2001). Treatment of traumatic brain injury in female rats with intravenous administration of bone marrow stromal cells. *Neurosurgery*, 49: 1196-1203.
- Manda K., Ueno M., Moritake T. y Anzai K. (2007). Radiation induced cognitive dysfunction and cerebellar oxidative stress in mice: protective effect of alpha lipoic acid. *Behav. Brain Res.*, 177: 7-14.
- Manuelidis L. y Manuelidis E. E. (1974). On the DNA content of cerebellar Purkinje cells *in vivo* and *in vitro*. *Exp. Neurol.*, 43: 192-206.

- Mao X., Fujiwara Y. y Orkin S. H. (1999). Improved reporter strain for monitoring Cre recombinase mediated DNA excisions in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 5037-5042.
- Mao X., Fujiwara Y., Chapdelaine A., Yang H. y Orkin S. H. (2001). Activation of EGFP expression by Cre mediated excision in a new ROSA26 reporter mouse strain. *Blood*, 97: 324-326.
- Marchena M. A. (2008). El ratón *pcd/pcd* como modelo de degeneración de fotorreceptores. Estudio estructural y funcional. Tesis Doctoral, Universidad de Salamanca, Salamanca.
- Mares V., Lodin Z. y Sacha J. (1973). A cytochemical and autoradiographic study of nuclear DNA in mouse Purkinje cells. *Brain Res.*, 53: 273-289.
- Massengale M., Wagers A. J., Vogel H. y Weissman I. L. (2005). Hematopoietic cells maintain hematopoietic fates upon entering the brain. *J. Exp. Med.*, 201: 1579-1589.
- Matsuura K., Wada H., Nagai T., Iijima Y., Minamino T., Sano M., Akazawa H., Molkenin J. D., Kasanuki H. y Komuro I. (2004). Cardiomyocytes fuse with surrounding noncardiomyocytes and reenter the cell cycle. *J. Cell Biol.*, 167: 351-363.
- Mayhall E. A., Paffett-Lugassy N. y Zon L. I. (2004). The clinical potential of stem cells. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 16: 713-720.
- McKercher S. R., Torbett B. E., Anderson K. L., Henkel G. W., Vestal D. J., Baribault H., Klemsz M., Feeney A. J., Wu G. E., Paige C. J. y Maki R. A. (1996). Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J.*, 15: 5647-5658.
- McLean J. H. y Shipley M. T. (1987a). Serotonergic afferents to the rat olfactory bulb: I. Origins and laminar specificity of serotonergic inputs in the adult rat. *J. Neurosci.*, 7: 3016-3028.
- McLean J. H. y Shipley M. T. (1987b). Serotonergic afferents to the rat olfactory bulb: II. Changes in fiber distribution during development. *J. Neurosci.*, 7: 3029-3039.
- McLean J. H., Shipley M. T., Nickell W. T., Aston-Jones G. y Reyher C. K. (1989). Chemoanatomical organization of the noradrenergic input from *locus coeruleus* to the olfactory bulb of the adult rat. *J. Comp. Neurol.*, 285: 339-349.
- Mezey E., Chandross K. J., Harta G., Maki R. A. y McKercher S. R. (2000). Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated *in vivo* from bone marrow. *Science*, 290: 1779-1782.

- Mezey E., Nagy A., Szalayova I., Key S., Bratincsak A., Baffi J. y Shahar T. (2003). Comment on "Failure of bone marrow cells to transdifferentiate into neural cells *in vivo*". *Science*, 299: 1184.
- Miale I. L. y Sidman R. L. (1961). An autoradiographic analysis of histogenesis in the mouse cerebellum. *Exp. Neurol.*, 4: 277-296.
- Miller F. R., Mohamed A. N. y McEachern D. (1989). Production of a more aggressive tumor cell variant by spontaneous fusion of two mouse tumor subpopulations. *Cancer Res.*, 49: 4316-4321.
- Mimeault M. y Batra S. K. (2006). Concise review: recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. *Stem Cells*, 24: 2319-2345.
- Mizoguchi M., Suga Y., Sanmano B., Ikeda S. y Ogawa H. (2004). Organotypic culture and surface plantation using umbilical cord epithelial cells: morphogenesis and expression of differentiation markers mimicking cutaneous epidermis. *J. Dermatol. Sci.*, 35: 199-206.
- Mizumatsu S., Monje M. L., Morhardt D. R., Rola R., Palmer T. D. y Fike J. R. (2003). Extreme sensitivity of adult neurogenesis to low doses of X-irradiation. *Cancer Res.*, 63: 4021-4027.
- Modlin I. M., Kidd M., Lye K. D. y Wright N. A. (2003). Gastric stem cells: an update. *Keio J. Med.*, 52: 134-137.
- Monje M. L., Mizumatsu S., Fike J. R. y Palmer T. D. (2002). Irradiation induces neural precursor cell dysfunction. *Nat. Med.*, 8: 955-962.
- Monje M. L. y Palmer T. (2003). Radiation injury and neurogenesis. *Curr. Opin. Neurol.*, 16: 129-134.
- Mori K., Kishi K. y Ojima H. (1983). Distribution of dendrites of mitral, displaced mitral, tufted, and granule cells in the rabbit olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.*, 219: 339-355.
- Mothe A. J., Kulbatski I., van Bendegem R. L., Lee L., Kobayashi E., Keating A. y Tator C. H. (2005). Analysis of green fluorescent protein expression in transgenic rats for tracking transplanted neural stem/progenitor cells. *J. Histochem. Cytochem.*, 53: 1215-1226.
- Mugnaini E. (1972). The histology and cytology of the cerebellar cortex. En: *The comparative anatomy and histology of the cerebellum: the human cerebellum, cerebellar connections, and cerebellar cortex* (Larsell O. y Jansen J., eds.), pp. 201-264. The University of Minnesota Press, Minneápolis.

- Mullen R. J. y LaVail M. M. (1975). Two types of retinal degeneration in cerebellar mutant mice. *Nature*, 258: 528-530.
- Mullen R. J., Eicher E. M. y Sidman R. L. (1976). *Purkinje cell degeneration*, a new neurological mutation in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73: 208-212.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G. y Erlich H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 51 Pt 1: 263-273.
- Muñoz-Eliás G., Marcus A. J., Coyne T. M., Woodbury D. y Black I. B. (2004). Adult bone marrow stromal cells in the embryonic brain: engraftment, migration, differentiation, and long term survival. *J. Neurosci.*, 24: 4585-4595.
- Murry C. E., Soonpaa M. H., Reinecke H., Nakajima H., Nakajima H. O., Rubart M., Pasumarthi K. B., Virag J. I., Bartelmez S. H., Poppa V., Bradford G., Dowell J. D., Williams D. A. y Field L. J. (2004). Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*, 428: 664-668.
- Naik K., Pittman I., Wolfe A., Miller R. S., Radovick S. y Wondisford F. E. (2006). A novel technique for temporally regulated cell type specific Cre expression and recombination in the pituitary gonadotroph. *J. Mol. Endocrinol.*, 37: 63-69.
- Nakano K., Migita M., Mochizuki H. y Shimada T. (2001). Differentiation of transplanted bone marrow cells in the adult mouse brain. *Transplantation*, 71: 1735-1740.
- Neiva K., Sun Y. X. y Taichman R. S. (2005). The role of osteoblasts in regulating hematopoietic stem cell activity and tumor metastasis. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 38: 1449-1454.
- Nygren J. M., Jovinge S., Breitbach M., Sawen P., Roll W., Hescheler J., Taneera J., Fleischmann B. K. y Jacobsen S. E. (2004). Bone marrow derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat. Med.*, 10: 494-501.
- 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. y Jacobsen S. E. (2008). Myeloid and lymphoid contribution to non haematopoietic lineages through irradiation induced heterotypic cell fusion. *Nat. Cell Biol.*, 10: 584-592.
- O'Gorman S. (1985). Degeneration of thalamic neurons in "*Purkinje cell degeneration*" mutant mice. II. Cytology of neuron loss. *J. Comp. Neurol.*, 234: 298-316.

- O'Gorman S. y Sidman R. L. (1985). Degeneration of thalamic neurons in "Purkinje cell degeneration" mutant mice. I. Distribution of neuron loss. *J. Comp. Neurol.*, 234: 277-297.
- O'Malley K. y Scott E. W. (2004). Stem cell fusion confusion. *Exp. Hematol.*, 32: 131-134.
- Ogle B. M., Butters K. A., Plummer T. B., Ring K. R., Knudsen B. E., Litzow M. R., Cascalho M. y Platt J. L. (2004). Spontaneous fusion of cells between species yields transdifferentiation and retroviral transfer *in vivo*. *FASEB J.*, 18: 548-550.
- Ogle B. M., Cascalho M. y Platt J. L. (2005). Biological implications of cell fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 6: 567-575.
- Oh H., Bradfute S. B., Gallardo T. D., Nakamura T., Gaussin V., Mishina Y., Pocius J., Michael L. H., Behringer R. R., Garry D. J., Entman M. L. y Schneider M. D. (2003). Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 12313-12318.
- Oh S. H., Muzzonigro T. M., Bae S. H., LaPlante J. M., Hatch H. M. y Petersen B. E. (2004). Adult bone marrow derived cells transdifferentiating into insulin producing cells for the treatment of type I diabetes. *Lab. Invest.*, 84: 607-617.
- Okada T. S. (1991). Transdifferentiation. Flexibility in cell differentiation. En: *Current Topics in Developmental Biology* (Denis-Donini S. y Augusti-Tocco G., eds.), pp. 349-380. Oxford Sci. Publ., Oxford.
- Oppenheim R. W. (1991). Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.*, 14: 453-501.
- Orlic D. y Bodine D. M. (1994). What defines a pluripotent hematopoietic stem cell (PHSC): will the real PHSC please stand up! *Blood*, 84: 3991-3994.
- 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. y Anversa P. (2001). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, 410: 701-705.
- Orona E., Rainer E. C. y Scott J. W. (1984). Dendritic and axonal organization of mitral and tufted cells in the rat olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.*, 226: 346-356.
- Ortiz-González X. R., Keene C. D., Verfaillie C. M. y Low W. C. (2004). Neural induction of adult bone marrow and umbilical cord stem cells. *Curr. Neurovasc. Res.*, 1: 207-213.
- Ortiz L. A., Gambelli F., McBride C., Gaupp D., Baddoo M., Kaminski N. y Phinney D. G. (2003). Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to

- bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 8407-8411.
- Owen M. (1988). Marrow stromal stem cells. *J. Cell Sci. Suppl.*, 10: 63-76.
- Pachter J. S., de Vries H. E. y Fabry Z. (2003). The blood brain barrier and its role in immune privilege in the central nervous system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 62: 593-604.
- Palay S. L. y Chan-Palay V. (1974). Cerebellar cortex: cytology and organization. Springer-Verlag. Berlín.
- Palkovits M., Leranath C., Zaborszky L. y Brownstein M. J. (1977). Electron microscopic evidence of direct neuronal connections from the lower brain stem to the median eminence. *Brain Res.*, 136: 339-344.
- Pardue M. L. y Gall J. G. (1969). Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 64: 600-604.
- Pawelek J. M. (2000). Tumour cell hybridization and metastasis revisited. *Melanoma Res.*, 10: 507-514.
- Petersen B. E., Bowen W. C., Patrene K. D., Mars W. M., Sullivan A. K., Murase N., Boggs S. S., Greenberger J. S. y Goff J. P. (1999). Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*, 284: 1168-1170.
- Pinching A. J. y Powell T. P. S. (1971). The neuron types of the glomerular layer of the olfactory bulb. *J. Cell Sci.*, 9: 305-345.
- Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C., Jaiswal R. K., Douglas R., Mosca J. D., Moorman M. A., Simonetti D. W., Craig S. y Marshak D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284: 143-147.
- Pittenger M. F. y Martin B. J. (2004). Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ. Res.*, 95: 9-20.
- Price J. L. y Powell T. P. S. (1970). The mitral and short axon cells in of the olfactory bulb. *J. Cell Sci.*, 7: 631-651.
- Price J. L. y Sprich W. W. (1975). Observations on lateral olfactory tract of rat. *J. Comp. Neurol.*, 162: 321-336.
- Priller J., Persons D. A., Klett F. F., Kempermann G., Kreutzberg G. W. y Dirnagl U. (2001a). Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene marked bone marrow cells *in vivo*. *J. Cell Biol.*, 155: 733-738.
- 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. y Dirnagl U. (2001b). Targeting gene modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nat. Med.*, 7: 1356-1361.
- Prockop D. J., Gregory C. A. y Spees J. L. (2003). One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100 Suppl 1: 11917-11923.
- Prockop D. J. y Olson S. D. (2007). Clinical trials with adult stem/progenitor cells for tissue repair: let's not overlook some essential precautions. *Blood*, 109: 3147-3151.
- Puvion-Dutilleul F., Mazan S., Nicoloso M., Pichard E., Bachellerie J. P. y Puvion E. (1992). Alterations of nucleolar ultrastructure and ribosome biogenesis by actinomycin D. Implications for U3 snRNP function. *Eur. J. Cell Biol.*, 58: 149-162.
- Rabb H. (2005). Paracrine and differentiation mechanisms underlying stem cell therapy for the damaged kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 289: F29-F30.
- Raff M. (2003). Adult stem cell plasticity: fact or artifact? *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 19: 1-22.
- Rakic P. y Sidman R. L. (1973). Organization of cerebellar cortex secondary to deficit of granule cells in *weaver* mutant mice. *J. Comp. Neurol.*, 152: 133-161.
- Ramón y Cajal S. (1911). *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés*, I. Maloine, París.
- Ramón y Cajal S. (1914). *Estudios sobre la degeneración y regeneración del Sistema Nervioso*. Madrid.
- Recio J. S., Weruaga E., Gómez C., Valero J., Briñón J. G. y Alonso J. R. (2007). Changes in the connections of the main olfactory bulb after mitral cell selective neurodegeneration. *J. Neurosci. Res.*, 85: 2407-2421.
- Reyes M., Lund T., Lenvik T., Aguiar D., Koodie L. y Verfaillie C. M. (2001). Purification and *ex vivo* expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*, 98: 2615-2625.
- Rodríguez M., Álvarez-Erviti L., Blesa F. J., Rodríguez-Oroz M. C., Arina A., Melero I., Ramos L. I. y Obeso J. A. (2007). Bone marrow derived cell differentiation into microglia: a study in a progressive mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.*, 28: 316-325.
- Rojas M., Xu J., Woods C. R., Mora A. L., Spears W., Román J. y Brigham K. L. (2005). Bone marrow derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 33: 145-152.

- Rosselli-Austin L. y Altman J. (1979). The postnatal development of the main olfactory bulb of the rat. *J. Dev. Physiol.*, 1: 295-313.
- Rossi F., Borsello T., Vaudano E. y Strata P. (1993). Regressive modifications of climbing fibres following Purkinje cell degeneration in the cerebellar cortex of the adult rat. *Neuroscience*, 53: 759-778.
- Russo F. P., Alison M. R., Bigger B. W., Amofah E., Florou A., Amin F., Bou-Gharios G., Jeffery R., Iredale J. P. y Forbes S. J. (2006). The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis. *Gastroenterology*, 130: 1807-1821.
- Sanmano B., Mizoguchi M., Suga Y., Ikeda S. y Ogawa H. (2005). Engraftment of umbilical cord epithelial cells in athymic mice: in an attempt to improve reconstructed skin equivalents used as epithelial composite. *J. Dermatol. Sci.*, 37: 29-39.
- Sánchez-Ramos J., Song S., Cardozo-Peláez F., Hazzi C., Stedeford T., Willing A., Freeman T. B., Saporta S., Janssen W., Patel N., Cooper D. R. y Sanberg P. R. (2000). Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells *in vitro*. *Exp. Neurol.*, 164: 247-256.
- Scheulen M. E., Hilger R. A., Oberhoff C., Casper J., Freund M., Josten K. M., Bornhauser M., Ehninger G., Berdel W. E., Baumgart J., Harstrick A., Bojko P., Wolf H. H., Schindler A. E. y Seeber S. (2000). Clinical phase I dose escalation and pharmacokinetic study of high-dose chemotherapy with *treosulfan* and autologous peripheral blood stem cell transplantation in patients with advanced malignancies. *Clin. Cancer Res.*, 6: 4209-4216.
- Schneider S. P. y Macrides F. (1978). Laminar distributions of interneurons in the main olfactory bulb of the adult hamster. *Brain Res. Bull.*, 3: 73-82.
- Schnell S. A., Staines W. A. y Wessendorf M. W. (1999). Reduction of lipofuscin like autofluorescence in fluorescently labeled tissue. *J. Histochem. Cytochem.*, 47: 719-730.
- Schönfeld T. A. y Macrides F. (1984). Topographic organization of connections between the main olfactory bulb and *pars externa* of the anterior olfactory nucleus in the hamster. *J. Comp. Neurol.*, 227: 121-135.
- Seaberg R. M., Smukler S. R., Kieffer T. J., Enikolopov G., Asghar Z., Wheeler M. B., Korbitt G. y van der Kooy D. (2004). Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages. *Nat. Biotechnol.*, 22: 1115-1124.

- Sekerikova G., Katarova Z., Joo F., Wolff J. R., Prodan S. y Szabo G. (1997). Visualization of beta galactosidase by enzyme and immunohistochemistry in the olfactory bulb of transgenic mice carrying the LacZ transgene. *J. Histochem. Cytochem.*, 45: 1147-1155.
- Shan Y. X., Jin S. Z., Liu X. D., Liu Y. y Liu S. Z. (2007). Ionizing radiation stimulates secretion of proinflammatory cytokines: dose response relationship, mechanisms and implications. *Radiat. Environ. Biophys.*, 46: 21-29.
- Shepherd G. M. (1972). Synaptic organization of the mammalian olfactory bulb. *Physiol. Rev.*, 52: 864-917.
- Shimomura O. (2005). The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *J. Microsc.*, 217: 1-15.
- Shipley M. T., Nickell W. T. y McLean J. H. (1986). Organization of afferents from the nucleus of the diagonal band to the olfactory bulb. *Chem. Senses (Abstr.)*, 11: 663.
- Shipley M. T., McLean J. H. y Ennis M. (1995). Olfactory system. En: *The rat nervous system* (Paxinos G., ed.), pp. 899-926. Academic Press, Nueva York.
- Shipley M. T., McLean J. H., Zimmer L. A. y Ennis M. (1996). The olfactory system. En: *Handbook of chemical neuroanatomy. Integrated systems of the CNS.* (Swanson L. W., Björklund A., y Hökfelt T., eds.), pp. 469-573. Elsevier, Amsterdam.
- Shojaeian H., Delhaye-Bouchaud N. y Mariani J. (1988). Stability of inferior olivary neurons in rodents. I. Moderate cell loss in adult Purkinje cell degeneration mutant mouse. *Brain Res.*, 466: 211-218.
- Sidman R. L., Appel S. H. y Fullier J. F. (1965). Neurological mutants of the mouse. *Science*, 150: 513-516.
- Sillitoe R. V. y Joyner A. L. (2007). Morphology, molecular codes, and circuitry produce the three dimensional complexity of the cerebellum. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 23: 549-577.
- Simard A. R. y Rivest S. (2004). Bone marrow stem cells have the ability to populate the entire central nervous system into fully differentiated parenchymal microglia. *FASEB J.*, 18: 998-1000.
- Simard A. R., Soulet D., Gowing G., Julien J. P. y Rivest S. (2006). Bone marrow derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron*, 49: 489-502.
- Siminovitch L., McCulloch E. A. y Till J. E. (1963). The distribution of colony forming cells among spleen colonies. *J. Cell Physiol.*, 62: 327-336.

- Smith L. G., Weissman I. L. y Heimfeld S. (1991). Clonal analysis of hematopoietic stem cell differentiation *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 2788-2792.
- Solomon J. N., Lewis C. A., Ajami B., Corbel S. Y., Rossi F. M. y Krieger C. (2006). 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.
- Soriano P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat. Genet.*, 21: 70-71.
- Sotelo C. (1975). Anatomical, physiological and biochemical studies of the cerebellum from mutant mice. II. Morphological study of cerebellar cortical neurons and circuits in the *weaver* mouse. *Brain Res.*, 94: 19-44.
- Sotelo C. y Alvarado-Mallart R. M. (1986). Growth and differentiation of cerebellar suspensions transplanted into the adult cerebellum of mice with hereditary degenerative ataxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 1135-1139.
- Sotelo C. y Alvarado-Mallart R. M. (1987a). Reconstruction of the defective cerebellar circuitry in adult Purkinje cell degeneration mutant mice by Purkinje cell replacement through transplantation of solid embryonic implants. *Neuroscience*, 20: 1-22.
- Sotelo C. y Alvarado-Mallart R. M. (1987b). Embryonic and adult neurons interact to allow Purkinje cell replacement in mutant cerebellum. *Nature*, 327: 421-423.
- Spees J. L., Olson S. D., Whitney M. J. y Prockop D. J. (2006). Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 1283-1288.
- Spriggs D. R., Stopa E., Mayer R. J., Schoene W. y Kufe D. W. (1986). Fludarabine phosphate (NSC 312878) infusions for the treatment of acute leukemia: phase I and neuropathological study. *Cancer Res.*, 46: 5953-5958.
- Stewart W. B., Kauer J. S. y Shepherd G. M. (1979). Functional organization of rat olfactory bulb analysed by the 2-deoxyglucose method. *J. Comp. Neurol.*, 185: 715-734.
- Strathdee D., Ibbotson H. y Grant S. G. (2006). Expression of transgenes targeted to the Gt(ROSA)26Sor locus is orientation dependent. *PLoS ONE*, 1: e4.
- Sturrock R. R. (1989a). Changes in neuron number in the cerebellar cortex of the ageing mouse. *J. Hirnforsch.*, 30: 499-503.
- Sturrock R. R. (1989b). Age related changes in Purkinje cell number in the cerebellar nodulus of the mouse. *J. Hirnforsch.*, 30: 757-760.

- Sturrock R. R. (1990). A comparison of quantitative histological changes in different regions of the ageing mouse cerebellum. *J. Hirnforsch.*, 31: 481-486.
- Sun T. T. y Lavker R. M. (2004). Corneal epithelial stem cells: past, present, and future. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.*, 9: 202-207.
- Swartz F. J. y Bhatnagar K. P. (1981). Are CNS neurons polyploid? A critical analysis based upon cytophotometric study of the DNA content of cerebellar and olfactory bulbar neurons of the bat. *Brain Res.*, 208: 267-281.
- Takahashi A., Kato K., Makino J., Shiroishi T. y Koide T. (2006). Multivariate analysis of temporal descriptions of open field behavior in wild derived mouse strains. *Behav. Genet.*, 36: 763-774.
- Tanaka J., Nakamura H. y Miyawaki S. (1988). Cerebellar involvement in murine sphingomyelinosis: a new model of Niemann Pick disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 47: 291-300.
- Terada N., Hamazaki T., Oka M., Hoki M., Mastalerz D. M., Nakano Y., Meyer E. M., Morel L., Petersen B. E. y Scott E. W. (2002). Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*, 416: 542-545.
- Theise N. D., Badve S., Saxena R., Henegariu O., Sell S., Crawford J. M. y Krause D. S. (2000a). Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation induced myeloablation. *Hepatology*, 31: 235-240.
- Theise N. D., Nimmakayalu M., Gardner R., Illei P. B., Morgan G., Teperman L., Henegariu O. y Krause D. S. (2000b). Liver from bone marrow in humans. *Hepatology*, 32: 11-16.
- Tolar J., Nauta A. J., Osborn M. J., Panoskaltsis M. A., McElmurry R. T., Bell S., Xia L., Zhou N., Riddle M., Schroeder T. M., Westendorf J. J., McIvor R. S., Hogendoorn P. C., Szuhai K., Oseth L., Hirsch B., Yant S. R., Kay M. A., Peister A., Prockop D. J., Fibbe W. E. y Blazar B. R. (2007). Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 25: 371-379.
- Tondravi M. M., McKercher S. R., Anderson K., Erdmann J. M., Quiroz M., Maki R. y Teitelbaum S. L. (1997). Osteopetrosis in mice lacking haematopoietic transcription factor PU.1. *Nature*, 386: 81-84.
- Toth Z. E., Shahar T., Leker R., Szalayova I., Bratincsak A., Key S., Lonyai A., Nemeth K. y Mezey E. (2007). Sensitive detection of GFP utilizing tyramide signal amplification to overcome gene silencing. *Exp. Cell Res.*, 313: 1943-1950.

- Tögel F., Weiss K., Yang Y., Hu Z., Zhang P. y Westenfelder C. (2007). Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 292: 1626-1635.
- Tögel F. y Westenfelder C. (2007). Adult bone marrow derived stem cells for organ regeneration and repair. *Dev. Dyn.*, 236: 3321-3331.
- Triarhou L. C., Norton J., Alyea C. J. y Ghetti B. (1985). A quantitative study of the granule cells in the *Purkinje Cell Degeneration (pcd)* mutant. *Ann. Neurol.*, 18: 146.
- Triarhou L. C., Norton J. y Ghetti B. (1987). Anterograde transsynaptic degeneration in the deep cerebellar nuclei of *Purkinje cell degeneration (pcd)* mutant mice. *Exp. Brain Res.*, 66: 577-588.
- Triarhou L. C. y Ghetti B. (1991). Stabilisation of neurone number in the inferior olivary complex of aged 'Purkinje cell degeneration' mutant mice. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 81: 597-602.
- Triarhou L. C., Zhang W. y Lee W. H. (1995). Graft induced restoration of function in hereditary cerebellar ataxia. *Neuroreport*, 6: 1827-1832.
- Triarhou L. C., Zhang W. y Lee W. H. (1996). Amelioration of the behavioral phenotype in genetically ataxic mice through bilateral intracerebellar grafting of fetal Purkinje cells. *Cell Transplant.*, 5: 269-277.
- Trounson A. (2006). The production and directed differentiation of human embryonic stem cells. *Endocr. Rev.*, 27: 208-219.
- Tumbar T., Guasch G., Greco V., Blanpain C., Lowry W. E., Rendl M. y Fuchs E. (2004). Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science*, 303: 359-363.
- Vahdat L., Wong E. T., Wile M. J., Rosenblum M., Foley K. M. y Warrell R. P., Jr. (1994). Therapeutic and neurotoxic effects of 2-chlorodeoxyadenosine in adults with acute myeloid leukemia. *Blood*, 84: 3429-3434.
- Valero J., Berciano M. T., Weruaga E., Lafarga M. y Alonso J. R. (2006). Preneurodegeneration of mitral cells in the *pcd* mutant mouse is associated with DNA damage, transcriptional repression, and reorganization of nuclear speckles and Cajal bodies. *Mol. Cell. Neurosci.*, 33: 283-295.
- Valero J. (2007). Degeneración de las células mitrales y sus efectos en la neurogénesis adulta del bulbo olfatorio del ratón mutante *pcd*. Tesis Doctoral, Universidad de Salamanca, Salamanca.

- Valero J., Weruaga E., Murias A. R., Recio J. S., Curto G. G., Gómez C. y Alonso J. R. (2007). Changes in cell migration and survival in the olfactory bulb of the *pcd/pcd* mouse. *Dev. Neurobiol.*, 67: 839-859.
- Vassilopoulos G., Wang P. R. y Russell D. W. (2003). Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature*, 422: 901-904.
- Vieyra D. S., Jackson K. A. y Goodell M. A. (2005). Plasticity and tissue regenerative potential of bone marrow derived cells. *Stem Cell Rev.*, 1: 65-69.
- Von Schalburg K. R., McCarthy S. P., Rise M. L., Hutson J. C., Davidson W. S. y Koop B. F. (2006). Expression of morphogenic genes in mature ovarian and testicular tissues: potential stem cell niche markers and patterning factors. *Mol. Reprod. Dev.*, 73: 142-152.
- Voogd J., Gerrits N. M. y Marani E. (1985). Cerebellum. En: *The rat nervous system* (Paxinos G., ed.), pp. 251-291. Academic Press, Orlando.
- Voogd J. y Glickstein M. (1998). The anatomy of the cerebellum. *Trends Neurosci.*, 21: 370-375.
- Wagers A. J., Sherwood R. I., Christensen J. L. y Weissman I. L. (2002). Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science*, 297: 2256-2259.
- Wang T. y Morgan J. I. (2007). The *Purkinje cell degeneration (pcd)* mouse: an unexpected molecular link between neuronal degeneration and regeneration. *Brain Res.*, 1140: 26-40.
- Wang X., Willenbring H., Akkari Y., Torimaru Y., Foster M., Al Dhalimy M., Lagasse E., Finegold M., Olson S. y Grompe M. (2003). Cell fusion is the principal source of bone marrow derived hepatocytes. *Nature*, 422: 897-901.
- Wang Y., Huso D. L., Harrington J., Kellner J., Jeong D. K., Turney J. y McNiece I. K. (2005). Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture. *Cytotherapy*, 7: 509-519.
- Wassef M., Simons J., Tappaz M. L. y Sotelo C. (1986). Non Purkinje cell GABAergic innervation of the deep cerebellar nuclei: a quantitative immunocytochemical study in C57BL and in *Purkinje cell degeneration* mutant mice. *Brain Res.*, 399: 125-135.
- Watt F. M. y Hogan B. L. (2000). Out of Eden: stem cells and their niches. *Science*, 287: 1427-1430.
- 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. y Priller J. (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: 5004-5011.
- Weimann J. M., Johansson C. B., Trejo A. y Blau H. M. (2003a). Stable reprogrammed heterokaryons form spontaneously in Purkinje neurons after bone marrow transplant. *Nat. Cell Biol.*, 5: 959-966.
- Weimann J. M., Charlton C. A., Brazelton T. R., Hackman R. C. y Blau H. M. (2003b). Contribution of transplanted bone marrow cells to Purkinje neurons in human adult brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 2088-2093.
- Weruaga E., Briñón J. G., Porteros A., Arévalo R., Aijón J. y Alonso J. R. (2000). Expression of neuronal nitric oxide synthase/NADPH-diaphorase during olfactory deafferentation and regeneration. *Eur. J. Neurosci.*, 12: 1177-1193.
- Whetton A. D. y Graham G. J. (1999). Homing and mobilization in the stem cell niche. *Trends Cell Biol.*, 9: 233-238.
- Willenbring H., Bailey A. S., Foster M., Akkari Y., Dorrell C., Olson S., Finegold M., Fleming W. H. y Grompe M. (2004). Myelomonocytic cells are sufficient for therapeutic cell fusion in liver. *Nat. Med.*, 10: 744-748.
- Wiley T. J., Maeda G., Schultz R. L., Seibly W. S. y Horowitz J. M. (1983). The principal projection pathway between the olfactory bulb and the prepyriform cortex in the cat. *J. Neurosci. Res.*, 9: 253-277.
- Wilson A. y Trumpp A. (2006). Bone marrow haematopoietic stem cell niches. *Nat. Rev. Immunol.*, 6: 93-106.
- Woodard P., Cunningham J. M., Benaim E., Chen X., Hale G., Horwitz E., Houston J., Kasow K., Leung W., Wang W., Yusuf U. y Handgretinger R. (2004). Effective donor lymphohematopoietic reconstitution after haploidentical CD34+ selected hematopoietic stem cell transplantation in children with refractory severe aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant.*, 33: 411-418.
- Ying Q. L., Nichols J., Evans E. P. y Smith A. G. (2002). Changing potency by spontaneous fusion. *Nature*, 416: 545-548.
- Young H. E. y Black A. C., Jr. (2004). Adult stem cells. *Anat. Rec.*, 276: 75-102.
- Yuan H., Gaber M. W., Boyd K., Wilson C. M., Kiani M. F. y Merchant T. E. (2006). Effects of fractionated radiation on the brain vasculature in a murine model: blood brain barrier permeability, astrocyte proliferation, and ultrastructural changes. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 66: 860-866.

- Yuasa S., Kawamura K., Ono K., Yamakuni T. y Takahashi Y. (1991). Development and migration of Purkinje cells in the mouse cerebellar primordium. *Anat. Embryol. (Berl)*, 184: 195-212.
- Zambrowicz B. P., Imamoto A., Fiering S., Herzenberg L. A., Kerr W. G. y Soriano P. (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. USA*, 94: 3789-3794.
- Zhang J., Niu C., Ye L., Huang H., He X., Tong W. G., Ross J., Haug J., Johnson T., Feng J. Q., Harris S., Wiedemann L. M., Mishina Y. y Li L. (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*, 425: 836-841.
- Zhang W., Lee W. H. y Triarhou L. C. (1996). Grafted cerebellar cells in a mouse model of hereditary ataxia express IGF-I system genes and partially restore behavioral function. *Nat. Med.*, 2: 65-71.
- Zhang W., Ghetti B. y Lee W. H. (1997). Decreased IGF-I gene expression during the apoptosis of Purkinje cells in *pcd* mice. *Dev. Brain Res.*, 98: 164-176.
- Zhao D. C., Lei J. X., Chen R., Yu W. H., Zhang X. M., Li S. N. y Xiang P. (2005). Bone marrow derived mesenchymal stem cells protect against experimental liver fibrosis in rats. *World J. Gastroenterol.*, 11: 3431-3440.

APÉNDICE

Soluciones de uso común

ARN mix: compuesto de ADN de esperma de salmón (D7656, Sigma-Aldrich) 100 µg/ml, ARN total de levadura de tipo XI (R6750, Sigma-Aldrich) 250 µg/ml, ARNt de levadura (15401-011, Gibco-BRL) 250 µg/ml en H₂O_{DEPC}.

Fijador de la técnica del X-Gal: compuesto por un 2% (p/v) de paraformaldehído despolimerizado tamponado a pH 7,4 con PB 0,1 M y 0,25% (v/v) de glutaraldehído.

Fijador de Zamboni: compuesto por un 4% (p/v) de paraformaldehído despolimerizado y un 0,2% (v/v) de ácido pícrico, tamponados a pH 7,4 con PBS.

Medio de montaje para fluorescencia “anti-desvanecimiento”: constituido por glicina 0,42% (p/v), NaOH 0,021% (p/v), NaCl 0,51% (p/v), *N*-propil-galato 5% (p/v), glicerol 70% (v/v) y timerosal 0,002% (p/v). Ha de guardarse protegido de la luz a 4 °C.

Medio líquido 2xTY para el cultivo de bacterias: compuesto por 0,16 g/l de Triptona, 0,10 g/l de extracto de levadura y 0,5 g/l de NaCl en agua destilada. El pH se ajusta a 7,4 con NaOH.

Medio sólido TYE para el cultivo de bacterias: compuesto por 10 g/l de Triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 8 g/l de NaCl y 15 g/l de Agar-agar en agua destilada. El pH se ajusta a 7,4 con NaOH.

Solución de azul de toluidina: se obtiene mezclando 4 g de azul de toluidina con 5 g de Na₂B₄O₇ · 10H₂O en 500 ml de agua destilada.

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 para gelatinizar portaobjetos: se disuelven 4,5 g de gelatina en polvo y 0,44 g de cromo III potasio sulfato en 900 ml de H₂O, calentando hasta 80°C. Se filtra la solución y los portaobjetos limpios se sumergen en ella a 70°C durante 5 min. Luego, se dejan secar en la estufa una noche. Se repite la operación y se guardan en lugar seco.

Tampón citrato sódico salino (SSC) 20x: para preparar 50 ml, se disuelven 8,76 g de NaCl y 4,41 g de citrato sódico en H_2O_{DEPC} , ajustando el pH a 7,0. Se enrasa hasta 50 ml con H_2O_{DEPC} . Las distintas concentraciones utilizadas (10x, 2x, 0,5x, 0,1x) se preparan a partir de ésta haciendo las correspondientes diluciones con H_2O_{DEPC} .

Tampón de hibridación: compuesto por tampón Tris-HCl 1 M pH 7,4 (20 mM), EDTA 250 mM pH 8,0 (1 mM), NaCl 4 M (300 mM), Formamida (47670, FLUKA) 100% (50%), Sulfato de dextrano (D8906, Sigma-Aldrich) 50% (10%), Solución de Denhardt (D9905, Sigma-Aldrich) 50x (1x) y H_2O_{DEPC} .

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 H_2O destilada.

Tampón fosfato 0,2 M, pH 7,4 (25 °C): se obtiene mezclando soluciones 0,2 M de Na_2HPO_4 y NaH_2PO_4 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 Na_2HPO_4 y 0,21 g de KH_2PO_4 . Se ajusta el pH a 7,4 con HCl y se enrasa a 1 litro.

Tampón TNB: compuesto por el tampón 'TNT' con "blocking reagent" al 0,5% (PerkinElmer Life Sciences), siguiendo las especificaciones del comerciante.

Tampón TNT: compuesto por 0,1 M de Tris-HCl a pH 7,6, 0,15 M de NaCl y 0,05% Tween-20 en agua destilada.

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 H_2O .

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 H_2O_{DEPC} .

Tampón X-Gal: compuesto por 100 μ l de una solución de $MgCl_2$ 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 $MgCl_2$ 1 M se prepara disolviendo 0,9521 g de $MgCl_2$ en 10 ml de H_2O 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 so-

lución 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.

Sueros inmunológicos

Anticuerpos primarios

Anti-calbindina (anti-CB) monoclonal: IgG de ratón anti-calbindina D-28K 300, Swant, Bellinzona, Suiza. Está dirigido contra la proteína calbindina D-28K de ratón. Tiene reacción cruzada con las proteínas de mono, conejo, rata, ratón y pollo, pero no con la de pez. No presenta reacción cruzada con la calretinina u otra proteína ligante de calcio conocida.

Anti-calbindina (anti-CB) policlonal: IgG de conejo anti-calbindina D-28k, Swant (CB-38), Bellinzona, Suiza. Está dirigido contra la proteína recombinante de rata calbindina D-28k. Tiene reacción cruzada con otras especies, incluido el humano.

Anti-digoxigenina (anti-DIG) monoclonal: IgG de ratón anti-DIG, Roche (11 333 062 910), Mannheim, Alemania. Es específico contra moléculas de digoxigenina, tanto libres como unidas a otras moléculas. Permite detectar moléculas marcadas con digoxigenina, como, por ejemplo, proteínas y ácidos nucleicos.

Anti-digoxigenina (anti-DIG) policlonal: IgG de oveja anti-DIG, Roche (11 333 089 001), Mannheim, Alemania. Es específico contra moléculas de digoxigenina, y no presenta reacción cruzada contra otros esteroides. Permite detectar moléculas marcadas con digoxigenina, como, por ejemplo, proteínas y ácidos nucleicos.

Anti-Iba 1 policlonal de cabra: IgG de cabra anti-Iba1, Everest Biotech (EB07174), Oxford, Inglaterra. Está dirigido contra un péptido sintético de la región interna de la secuencia de la proteína Iba1. Es específico contra microglía y macrófagos, y no presenta reacción cruzada con neuronas o astrocitos. Reconoce el Iba1 de humano, de rata, de ratón y de perro.

Anti-Iba 1 policlonal de conejo. IgG de conejo anti-Iba1, Wako, Osaka, Japón. Está dirigido contra un péptido sintético que corresponde a la zona carboxilo terminal de la proteína Iba1. Reconoce el Iba1 de humano, rata y ratón.

Anti-proteína ácida fibrilar glial (Anti-GFAP) policlonal: IgG de conejo anti-GFAP, Sigma-Aldrich (G 3893), Missouri, EE. UU. Es específico contra una proteína de

50 kDa de los filamentos intermedios de los astrocitos. El anticuerpo presenta reacción cruzada con la GFAP de humano, conejo y rata.

Anti-proteína verde fluorescente (anti-GFP) policlonal de cabra: IgG de cabra anti-GFP, Abcam (ab290), Cambridge, Inglaterra. Está dirigido contra toda la molécula entera de la GFP. El anticuerpo presenta reacción contra todas las variantes de la proteína GFP de *Aequorea victoria*, tales como S65T-GFP, RS-GFP, YFG y EGFP.

Anti-proteína verde fluorescente (anti-GFP) policlonal de conejo: IgG de conejo anti-GFP, Abcam (ab290), Cambridge, Inglaterra. Está dirigido contra toda la molécula entera de la GFP. El anticuerpo presenta reacción contra todas las variantes de la proteína GFP de *Aequorea victoria*, tales como S65T-GFP, RS-GFP, YFG y EGFP.

Anti-Reelina monoclonal: IgG de ratón anti-Reelina, Chemicon (MAB5366), California, EE. UU. Este anticuerpo monoclonal muestra reactividad con el epítipo de Reelina situado entre los aminoácidos 164 y 189 de la proteína de ratón. También presenta reactividad cruzada con la Reelina humana y con la de animales no mamíferos.

Anticuerpos secundarios

Anti-cabra conjugado con Cy3 hecho en burro. Laboratorios Jackson (705-165-003), Pensilvania, EE. UU.

Anti-cabra conjugado con Cy5 hecho en burro. Laboratorios Jackson (705-175-003), Pensilvania, EE. UU.

Anti-conejo biotinado. IgG biotinada de cabra anti-IgG de conejo. Vector (BA-1000), California, EE. UU.

Anti-conejo conjugado con Cy2 hecho en burro. Laboratorios Jackson (711-225-152), Pensilvania, EE. UU.

Anti-conejo conjugado con Cy2 hecho en cabra. Laboratorios Jackson (111-225-003), Pensilvania, EE. UU.

Anti-conejo conjugado con Cy3 hecho en cabra. Laboratorios Jackson (111-165-003), Pensilvania, EE. UU.

Anti-oveja conjugado con Cy3 hecho en conejo. Laboratorios Jackson (313-165-003), Pensilvania, EE. UU.

Anti-ratón biotinado. IgG biotinada de caballo anti-IgG de ratón. Vector (BA-2000), Pensilvania, EE. UU.

Anti-ratón conjugado con Cy2 hecho en cabra. Laboratorios Jackson (115-225-003), Pensilvania, EE. UU.

Anti-ratón conjugado con Cy3 hecho en cabra. Laboratorios Jackson (115-165-166), Pensilvania, EE. UU.

Anti-ratón conjugado con Cy3 hecho en burro. Laboratorios Jackson (715-165-150), Pensilvania, EE. UU.

Estreptavidina conjugada con Cy3. Estreptavidina conjugada con el fluorocromo Cy3. Laboratorios Jackson (016-160-084), Pensilvania, EE. UU.

Estreptavidina conjugada con Cy2. Estreptavidina conjugada con el fluorocromo Cy2. Laboratorios Jackson (016-220-084), Pensilvania, EE. UU.