



**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

**Terapia celular en el sistema nervioso  
central: recuperación estructural y  
funcional en un modelo murino de  
muerte neuronal selectiva**

**-TESIS DOCTORAL-**

DAVID DÍAZ LÓPEZ

Salamanca, mayo 2011





VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA



INSTITUTO DE  
NEUROCIENCIAS  
CASTILLA Y LEÓN

# Terapia celular en el sistema nervioso central: recuperación estructural y funcional en un modelo murino de muerte neuronal selectiva

Memoria presentada por David Díaz López para optar al Título de *Doctor Europaeus*

Directores:

Prof. Dr. D. José Ramón Alonso Peña

Prof. Dr. D. Eduardo Weruaga Prieto

mayo 2011







VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA

INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS  
DE CASTILLA Y LEÓN

Terapia celular en el sistema nervioso  
central: recuperación estructural y  
funcional en un modelo murino de  
muerte neuronal selectiva

DAVID DÍAZ LÓPEZ

Salamanca, mayo de 2011





VNIVERSIDAD  
D SALAMANCA

LABORATORIO DE PLASTICIDAD NEURONAL Y NEURORREPARACIÓN

INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN

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

HACEMOS CONSTAR:

Que la Tesis Doctoral titulada "Terapia celular en el sistema nervioso central: recuperación estructural y funcional en un modelo murino de muerte neuronal selectiva", ha sido realizada por D. David Díaz López en el Instituto de Neurociencias de Castilla y León, Universidad de Salamanca, bajo nuestra dirección y, en nuestra opinión, reúne todos los requisitos científicos y formales para ser defendida y optar al Título de *Doctor Europaeus*.

Salamanca, a 5 de mayo de 2011

VNIVERSITAS  
STVDII  
SALAMANINNI



Fdo.: José Ramón Alonso Peña

Fdo.: Eduardo Weruaga Prieto



DEPARTEMENT DE MEDECINE  
Division d'Anatomie  
Rte Albert Gockel  
1700 Fribourg

**TO WHOM IT MAY CONCERN**

The thesis of David Diaz Lopez is a very ambitious piece of work on a possibly revolutionary way of treating degenerative lesions in the central nervous system by contributing stem cells derived from homologous bone marrow.



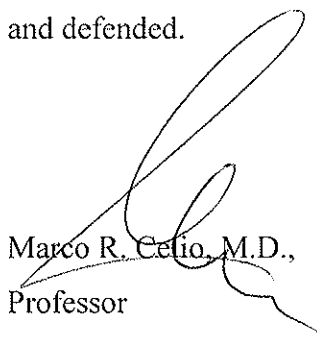
David Diaz Lopez has tested this approach on a murine model of cerebellar degeneration (PCD) by transplanting bone marrow of wild type mice in bone marrow-depleted mutants. Compared to the control mice, the experimental animals improved their motor and olfactory function. In the olfactory bulb, mitral cells loss was slowed down by the cell transplantation, thus probably contributing to the better olfactory discrimination. Since no rescue of Purkinje cells could be observed in the cerebellum, the mechanism underlying the amelioration of dexterity of the experimental mice may happen through other compensatory mechanisms (sprouting, recruiting off other circuits, peripheral effects).

The conclusions reached are based on an impressive variety of anatomical, electrophysiological and behavioural results. The introduction is well written and informative. The methods are described in enough details and the results are sound and presented in a logic and didactic manner. The discussion is subdivided in various parts, dissecting all aspects of the thesis. The literature is discussed in a direct and competent manner. The interpretation of the results is straightforward and exhaustive, but I would have expected a short discussion of some of the most surprising observations (majority of transplanted cells becomes microglial cells, long delay between transplantation and appearance of fused cells in the cerebellum) as well as the caveats of the technique used (irradiation of the brain together with the bone marrow).

Of course, it is always possible to find points of criticism about a contribution of this extent and complexity, but these minor criticisms do not diminish the value of this doctoral thesis.

During the course of his thesis, David Diaz Lopez has learned to experiment with rodents, to deplete mice of (and transplant with) bone marrow, to utilise electrophysiological techniques, to apply behavioural tests and to utilise anatomical experiments. This is panoply of dexterities and accomplishments that will be precious in his future career.

I would like to express my felicitation to David Diaz Lopez for this impressive thesis and make him my best wishes for his future research career. The thesis can be presented and defended.



Marco R. Celio, M.D.,  
Professor

Chair of histology and embryology

Fribourg, April 26<sup>th</sup>, 2011



Institut für Anatomie und Zellbiologie, Postfach 111, 79001 Freiburg



Dr. J.R. Alonso  
Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCyL)  
Universidad de Salamanca  
C/ Pintor Fernando Gallego, 1  
37007 Salamanca, España  
Tfno. 923 294500 ext. 5325  
Fax. 923 294750

Albert-Ludwigs-Universität Freiburg  
Institut für Anatomie und Zellbiologie  
Abteilung für Neuroanatomie

Direktor: Prof. Dr. Michael Frotscher

Albertstraße 17  
79104 Freiburg  
Tel. 0761/203-5056  
Fax 0761/203-5054

Dear Dr. Alonso,

Thank you for inviting me to comment on the thesis of David Díaz López.  
Please, find my appreciation of his work below.

The present thesis by David Díaz López addresses an important issue that in the future might have significant implications for the treatment of human diseases. Being faced with an increasing life expectancy, diseases of the older age that involve the degeneration of neurons in the central nervous system such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease are of growing importance for our society. One very attractive way to compensate for the loss of neurons that underwent degeneration in the course of these diseases is by cell replacement using bone marrow derived pluripotent stem cells.

In the present study Purkinje Cell Degeneration (PCD) has been used as a model of neurodegeneration. In addition to the degeneration of cerebellar Purkinje neurons associated with ataxia, also mitral cells in the olfactory bulb and certain thalamic neurons were found to undergo degeneration.

It has been the aim of the present study to analyze in detail how bone marrow derived cells (BMDCs) survive transplantation, integrate into the host tissue and might eventually ameliorate the pathological phenotype associated

with PCD. As detailed in the Introduction, a potential therapeutic effect may be twofold, i.e., a replacement of the lost neurons by BMDCs and fusion of BMDCs with local neurons. It is obvious that a comprehensive analysis of the various effects of BMDC transplantation including therapeutic effects on the animals' behavior builds up a research program that goes far beyond what is feasible in the framework of a single thesis. I have to say that I was very impressed by the enormous data collection contained in the present thesis by David Díaz López. Using GFP labeling combined with beta galactosidase staining he developed a strategy that enabled him to identify the transplanted cells including the ones that underwent fusion.

The present brief appreciation of the present thesis cannot aim for a comprehensive description of the various results obtained. Of note, in the behavioral studies the transplanted animals appeared to benefit from BMDCs, although differentiated transplant-derived Purkinje cells were not observed in the histological studies. However, analysis of mice subjected to different transplantation regimes provided evidence for cell fusion and transdifferentiation to take place in the transplanted animals.

Taken together, the present work contributes substantially to our understanding of the various effects that BMDC transplantation may have for the treatment of neurodegenerative diseases. Thus I am very much in favor of accepting this work as a PhD thesis.



Michael Frotscher

Professor and Chairman



*A MIS PADRES*

*A CARMEN*



## *Agradecimientos*

*No agradeceré a la mitad de vosotros ni la mitad de lo que querría, y lo que yo querría es menos de la mitad de lo que la mitad de vosotros os merecéis.*

Aunque la realización de esta Tesis haya durado cuatro años, puedo decir que el bagaje que lleva consigo es mucho más extenso. Y no es sólo un bagaje temporal, de formación académica y conocimientos previos, sino también de sentimientos y emociones. Cuatro años dan para mucho y son muchas las personas a las que tengo que agradecer su ayuda y apoyo durante todo este tiempo.

El primer agradecimiento va dirigido a mis directores, al Dr. José Ramón Alonso Peña y Dr. Eduardo Weruaga Prieto, por la posibilidad de desarrollar mi investigación en su laboratorio, así como por sus consejos, su ayuda, sus críticas, su paciencia infinita y, en definitiva, por su dirección.

Continúo con el Dr. José Aijón Noguera, que no nos acompañó al INCyL pero que es nuestro referente en el Campus Miguel de Unamuno. Gracias por permitirme formar parte del Grupo de Biología Celular y Patología, gracias por estar siempre ahí, dispuesto a echar una mano (o una firma) y gracias por ser el nexo de unión de toda esta Gran Familia de biólogos celulares.

Gracias al resto de profesores del área de Biología Celular: Dr. Juan Lara, Dra. Rosario Arévalo, Dra. Almudena Velasco, Dr. Ángel Porteros, Dra. Concepción Lillo, Dr. Jesús G. Briñón y Dra. Isabel Cuadrado. Por enseñarme gran parte de lo que sé, por resolver mis dudas, por los papeleos, por los trámites burocráticos, por vuestra compañía, por vuestra amistad...

Turno ahora de mis compañeros de laboratorio con los que he compartido el día a día codo con codo en una poyata, en una mesa de escritorio o en un animalario. Gracias a todos vosotros, los que seguís ahí y los que os habéis ido a otro lugar, desde la "vieja guardia" a los "padawans": JR (con sus múltiples ideas racionales o irracionales), Eduardo (ex-primo-tercero-político, familia en el trabajo), David, Maite, Carmen, Elenita, Jorge (Maestro...), Azu (que pone orden cuando hace falta), Carmela (que pone guasa cuando hace falta), Marchena, Javisán (el "gigante a cuyos hombros me subí"), Rosarillo, Gloria, Fernandito (que me saca los pájaros de la cabeza), Carmencita (que me metió los pájaros, cantores, en la cabeza), María, Marta, Adrián (compañero de papeles y mostradores), Biviana, Miguelón, Saúl, Maite, Héctor, Fernando, Marina, Giulia, Rodrigo, Clare, Matilde, María, Marisán (que es la única que me defiende), Estefanía y Diana. Gracias por echarme una mano en todo lo que me haya podido hacer falta, por discutir experimentos y resultados, por apoyarme en todo momento, por venir a primera hora, por estar "hasta las tantas", por soportarme.

Gracias a la Dra. Daniela Vogt-Weisenhorn del Helmholtz Zentrum de Munich -donde hice mi primera estancia- y a todo su equipo, especialmente a Angi, Miriam y Jingzhong. Por la ayuda prestada, por desoxidar mi alemán y, sobre todo, por la extraordinaria calidez de su acogida.

Gracias al Dr. Pierre-Marie Lledo, del Institut Pasteur de París -donde hice mi segunda estancia- y a todo su equipo, sobre todo a Gaby, Gilles y Kerren. Por ense-

ñarme cómo funciona un olfatómetro, por las conversaciones en un idioma distinto cada día y por su simpatía.

Para realizar esta Tesis tuve que peregrinar por algunos laboratorios y servicios comunes de ésta u otra universidad. Sería un error no mencionar en estos agradecimientos a los miembros de los mismos que me han ayudado: el Dr. Manuel Álvarez-Dolado y Marina Piquer, del CABIMER de Sevilla; el Dr. Juan Pedro Bolaños y la Dra. María Delgado, del Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular de la USAL; la Dra. Alicia Rodríguez, del Dpto. de Fisiología y Farmacología de la USAL; Mónica del Rey y Ángel Prieto Martín del CIC; Nick Skinner, del SCI; el personal del SEA.

Quiero mencionar a algunas personas de fuera del mundo científico y académico. Aunque mencione a todos ellos al final, no ocupan un lugar menos importante en estos agradecimientos (como en un artículo científico). Gracias a todos mis amigos. Y cuando digo todos, es todos. Vosotros sabéis muy bien quiénes sois y lo importante que es para mí la amistad, aunque destacaré a algunos. A mis dos compañeros de piso a los que quiero como hermanos, Fer y Canarión, por soportarme en casa (que es bastante difícil), por enseñarme a vivir la vida, por estar siempre a las duras y a las maduras, por enseñarme a ser un poco mejor cada día... Destacaré también a esa familia sin parentesco (genético) de Cacabelos: Diego, Dieguín, Pablo, Pablín y Javi, por enseñarme a vivir la vida (aún más si cabe), porque no pasan los años a pesar de la distancia, por todo lo vivido y lo que nos queda por vivir... Y destacaré además a Karmele (versión amiga). Si hay alguien que me ha aguantado realmente durante todo este tiempo es ella. Gracias por compartir los buenos y malos momentos, por estar siempre cuando te he necesitado, por saberte mi tesis sin haberla leído, por la cita de Pasteur, por la caña que me das con los idiomas, por preocuparte día y noche por mí.

Gracias a Carmen, por estos cuatro años y medio de amor, comprensión, complicidad, respeto, devoción... Y, ¿por qué no?, gracias por esas risas, por poner algo de carácter en la relación, por darme la lata y tirarme de las orejas de vez en cuando. Gracias por ser la mano a la que siempre me puedo asir. Gracias por quererme tanto. Gracias, porque contigo soy invencible.

Por último, gracias a mis padres. ¿Qué puedo decir que no os haya dicho ya? ¿Qué mayor agradecimiento puedo brindaros que la devoción que siento por vosotros? ¿Qué vínculo puede ser mayor que el que hay entre unos padres y su hijo? Gracias por educarme, por hacerme crecer en todos los sentidos, por hacer posible lo que soy y cómo soy, gracias por vuestro amor y confianza incondicionales. Gracias por creer en mí.

Gracias a todos aquéllos de los que me he olvidado.

La investigación recogida en esta Tesis Doctoral ha sido subvencionada por proyectos financiados en convocatorias del Ministerio de Educación (FPU AP2007-00269) Ministerio de Ciencia e Innovación (BFU2010-18284), el Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad (Plan Nacional Sobre Drogas), la Junta de Castilla y León (Consejería de Educación y Consejería de Sanidad), el Centro de Medicina Regenerativa y Terapia Celular de Castilla y León, la Fundación Samuel Solórzano y la Universidad de Salamanca.

*"Permettez-moi de vous révéler le secret qui m'a permis d'atteindre mon but. Ma force réside uniquement dans ma ténacité."*

*"Quiero compartir con ustedes el secreto que me ha llevado a alcanzar todas mis metas: mi fuerza reside únicamente en mi tenacidad."*

*Louis Pasteur*



# Índice

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>¿Qué son las células madre? .....</b>	<b>3</b>
<b>Tipos de células madre .....</b>	<b>5</b>
Células madre embrionarias.....	5
Células madre del cordón umbilical .....	7
Células madre pluripotentes inducidas .....	8
Células madre adultas.....	10
<i>Las células madre y su microambiente: el nicho celular .....</i>	<i>11</i>
<i>Divisiones simétricas y asimétricas .....</i>	<i>13</i>
<i>Transdiferenciación, desdiferenciación y fusión celular .....</i>	<i>15</i>
Transdiferenciación.....	15
Desdiferenciación.....	16
Fusión celular .....	17
<b>Las células madre de la médula ósea.....</b>	<b>18</b>
Tipos de células madre de la médula ósea.....	19
<i>Células madre hematopoyéticas .....</i>	<i>19</i>
<i>Células madre estromales .....</i>	<i>21</i>
<i>Células acompañantes .....</i>	<i>23</i>
Plasticidad de las células madre de la médula ósea .....	23
<i>Plasticidad en el sistema nervioso central.....</i>	<i>25</i>
<i>Plasticidad en el músculo estriado .....</i>	<i>29</i>
Integración de las células derivadas de la médula ósea en el cerebelo.....	30
<i>Mecanismos de plasticidad.....</i>	<i>31</i>
<i>Factores implicados en la integración celular.....</i>	<i>32</i>
Integración de las células derivadas de la médula ósea en el bulbo olfativo .....	35
<b>El ratón mutante PCD .....</b>	<b>36</b>
La mutación “Purkinje Cell Degeneration” .....	37

Efectos generales de la mutación pcd.....	39
Efectos de la mutación pcd en el cerebelo.....	40
<i>Citoarquitectura del cerebelo</i> .....	41
<i>Sinaptología de los circuitos cerebelosos</i> .....	42
<i>Neurodegeneración pcd en el cerebelo</i> .....	44
<i>Alteraciones citológicas y sinaptológicas de las células de Purkinje del ratón PCD</i> .....	46
<i>Ensayos para subsanar la pérdida de las células de Purkinje del ratón mutante PCD</i> .....	48
Trasplantes celulares.....	49
Prevención de la neurodegeneración.....	50
Efectos de la mutación pcd en el bulbo olfativo.....	50
<i>Organización del bulbo olfativo principal</i> .....	51
<i>Neurodegeneración en el bulbo olfativo</i> .....	54
<i>Alteraciones citológicas de las células mitrales del bulbo olfativo principal</i> .....	57
<i>Ensayos para subsanar la pérdida de las células mitrales del bulbo olfativo del ratón mutante PCD</i> .....	58
<b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>61</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>65</b>
<b>Animales de experimentación.....</b>	<b>67</b>
Animales receptores: la colonia PCD-R26R.....	67
<i>Identificación de los animales</i> .....	69
Extracción de ADN.....	70
Amplificación del ADN.....	71
Identificación de los productos de la PCR.....	74
Animales donantes: la colonia PCD-(CRE-GFP).....	75
<i>Identificación de los animales</i> .....	76
Amplificación del ADN.....	76
Identificación de los productos de la PCR.....	77
<b>Trasplante de médula ósea.....</b>	<b>78</b>
Ablación de la médula ósea de los animales receptores.....	78



<i>Ablación física por irradiación</i> .....	79
<i>Ablación química con busulfán</i> .....	79
Extracción de la médula ósea del donante .....	80
Trasplante.....	81
<i>Vía intravenosa</i> .....	82
<i>Vía intrahepática</i> .....	82
<i>Viabilidad de las células trasplantadas</i> .....	83
<i>Seguimiento del trasplante</i> .....	83
Cuidado de los animales trasplantados.....	84
Evolución temporal del trasplante .....	84
<b>Pruebas de comportamiento motor</b> .....	<b>85</b>
Campo abierto.....	86
Velocidad media de desplazamiento.....	87
Rota-rod.....	88
<b>Pruebas de comportamiento olfativo y electrofisiológicas</b> .....	<b>88</b>
Pruebas de comportamiento olfativo.....	89
<i>Características de los olfatómetros</i> .....	89
<i>Sesiones de entrenamiento</i> .....	91
<i>Prueba de sensibilidad olfativa</i> .....	92
<i>Prueba de discriminación olfativa</i> .....	93
Análisis electrofisiológico.....	94
<b>Obtención y preparación del tejido</b> .....	<b>96</b>
Sacrificio y disección .....	96
Corte en microtomo de deslizamiento.....	98
Corte en criostato .....	98
Corte en microtomo de rotación .....	99
Inmunofluorescencia indirecta.....	99
Inmunofluorescencia para PCNA.....	101
Histoquímica del X-Gal.....	102

Técnica TUNEL.....	104
Controles de especificidad.....	105
Tinciones básicas .....	105
<i>Nissl</i> .....	105
<i>Hematoxilina-eosina</i> .....	106
<b>Análisis de muestras de sangre periférica .....</b>	<b>107</b>
Determinación de los niveles de glutatión .....	107
Determinación de los niveles de IGF-I .....	109
<b>Análisis estadísticos.....</b>	<b>110</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>113</b>
<b>Ablación y trasplante de médula ósea.....</b>	<b>115</b>
Viabilidad de las células trasplantadas. Supervivencia de los animales receptores.....	115
Reconstitución de la hematopoyesis de los animales receptores.....	116
<b>Efectos funcionales del trasplante.....</b>	<b>117</b>
Mejoras de la función motora .....	118
<i>Resultados en la prueba de campo abierto</i> .....	118
<i>Resultados en la prueba de velocidad de desplazamiento</i> .....	121
<i>Resultados en la prueba de rota-rod</i> .....	122
Mejoras de la función olfativa .....	123
<i>Análisis comportamental de la capacidad olfativa</i> .....	123
Resultados de las pruebas de detección olfativa.....	124
Resultados de las pruebas de discriminación olfativa .....	126
Evaluación del tiempo de reacción .....	127
<i>Análisis electrofisiológico del bulbo olfativo</i> .....	129
<b>Diferenciación celular y efectos en los tejidos del hospedador .....</b>	<b>132</b>
Efectos del trasplante en regiones encefálicas .....	133
<i>Cerebelo</i> .....	133
Análisis en ratones silvestres .....	133
Análisis en ratones pcd/pcd.....	138

Análisis en ratones +/-pcd .....	141
<i>Bulbo olfativo</i> .....	144
Análisis en ratones silvestres .....	145
Análisis en ratones pcd/pcd .....	147
<i>Eje proliferativo ZSV-CMR-BO</i> .....	152
Muerte celular.....	153
Análisis de proliferación .....	155
Análisis a largo plazo del BO .....	159
Efectos del trasplante fuera del encéfalo .....	160
<i>Médula espinal</i> .....	161
<i>Músculo estriado</i> .....	161
<i>Sangre periférica</i> .....	162
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>165</b>
<b>El trasplante de médula ósea es viable, seguro y efectivo</b> .....	<b>167</b>
<b>Las células procedentes del trasplante se integran de forma progresiva en el encéfalo de los ratones receptores</b> .....	<b>170</b>
Incorporación de elementos gliales .....	170
Células de Purkinje derivadas de la médula ósea .....	172
Formación de interneuronas del bulbo olfativo .....	174
El ambiente neurodegenerativo incrementa la integración en el encéfalo .....	175
<i>La pérdida de células mitrales incrementa la llegada de células de microglía al bulbo olfativo</i> .....	176
<i>La degeneración lenta de las células de Purkinje de los animales +/-pcd aumenta los fenómenos de fusión</i> .....	178
<b>La dosis de radiación empleada afecta a la neurogénesis del encéfalo rostral</b> .....	<b>181</b>
La radiación empleada incrementa los fenómenos de apoptosis, y los desplaza rostralmente hacia el bulbo olfativo .....	181
La radiación empleada afecta la morfología y la proliferación de las regiones neurogénicas sin que exista recuperación con el tiempo .....	183
Las CDMO no tuvieron efectos en las regiones dañadas por la radiación .....	185
La irradiación empleada reduce notablemente el tamaño del bulbo olfativo .....	185

<b>El trasplante de médula ósea mejora la capacidad de movimiento de los ratones PCD.....</b>	<b>187</b>
La mejoras comportamentales son independientes de los cambios del cerebelo estudiados.....	190
<b>El trasplante de médula ósea ralentiza la pérdida de células mitrales de los ratones PCD y mejora su capacidad olfativa .....</b>	<b>193</b>
La pérdida de las células mitrales en los ratones PCD altera la electrofisiología del bulbo olfativo.....	195
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>199</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>203</b>
<b>APÉNDICE I .....</b>	<b>243</b>
<b>Abreviaturas .....</b>	<b>245</b>
<b>Productos químicos generales.....</b>	<b>247</b>
Soluciones generales de uso común.....	251
Sueros inmunológicos .....	254
Anticuerpos primarios .....	254
Anticuerpos secundarios .....	255
<b>Instrumentos.....</b>	<b>256</b>
<b>Material informático .....</b>	<b>258</b>
<b>APÉNDICE II .....</b>	<b>261</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>353</b>

# Introducción

*"Sólo sé que no sé nada."*

*Sócrates*



## ¿Qué son las células madre?

Los Institutos Nacionales de Salud (NIH<sup>1</sup>) de EEUU, una de las organizaciones gubernamentales de investigación y desarrollo biomédico más prestigiosas del mundo, definen a las **células madre** como “aquellas células con la habilidad de dividirse de forma indefinida y de dar lugar a células especializadas” (<http://stemcells.nih.gov/info/basics/basics2.asp>). De forma más precisa, podemos definir las células madre como “células indiferenciadas que presentan una capacidad de autorrenovación ilimitada y que pueden generar múltiples linajes celulares o poblaciones de células progenitoras más restringidas y que contribuyen a la homeostasis de los tejidos, mediante reemplazamiento de células o la regeneración tisular tras un daño” (Mimeault y Batra, 2006). Queda claro entonces que las células madre responden a dos propiedades fundamentales (Fortier, 2005; Mimeault y Batra, 2006):

- **Autorrenovación:** capacidad de las células madre de renovarse a sí mismas, generando por mitosis el mismo tipo celular indiferenciado durante periodos de tiempo muy prolongados y formando un número teóricamente infinito de células.
- **Potencialidad ilimitada:** capacidad para diferenciarse en cualquier tipo de célula madura, de cualquier linaje celular del organismo al que pertenecen.

Aunque se hable de potencialidad ilimitada, no todas las células consideradas como “madre” pueden originar todos los tipos celulares de un organismo. En general, cuanto más indiferenciada esté una célula, mayor será su potencialidad. Así, considerando su potencial de diferenciación (Alison et al., 2002; Young y Black, Jr., 2004; Fortier, 2005; Mimeault y Batra, 2006), las células madre se pueden clasificar en:

- **Células madre totipotentes.** Son las más indiferenciadas y, por lo tanto, las que presentan un potencial de diferenciación máximo: en cualquier tipo celular, tanto embrionario, como extraembrionario. Es decir, las

---

<sup>1</sup> Del inglés: *National Institutes of Health*

células madre totipotentes son capaces de diferenciarse no sólo en cualquier célula de un organismo, sino también en los tejidos extraembrionarios asociados con dicho organismo (como la placenta en los mamíferos). A este tipo celular tan solo pertenecen el cigoto y las células formadas tras sus 2 ó 3 primeras divisiones del mismo después de la fecundación, hasta el estadio de mórula de 4/8 células (Alison et al., 2002; Fortier, 2005).

- **Células madre pluripotentes.** Derivadas directamente de las anteriores, pueden diferenciarse en células de cualquiera de las tres capas germinales (endodermo, mesodermo y 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. Constituyen este tipo celular las células de la masa celular interna del blastocisto.
- **Células madre multipotentes.** Son también denominadas células progenitoras. Más especializadas que las anteriores, son aquéllas que sólo pueden producir células de su propia capa germinal de origen (endodermo, mesodermo o ectodermo). Algunos autores (Young y Black, Jr., 2004) hacen subclasificaciones de estas células progenitoras en bipotentes, tripotentes o multipotentes, según si generan dos, tres, o más de tres tipos celulares, respectivamente.
- **Células madre unipotentes.** Sólo pueden originar un único tipo celular, pero presentan la capacidad de autorrenovación, propiedad que las distingue del resto de células no consideradas como células madre.

Según esta clasificación y considerando la definición anterior de célula madre, sólo podrían ser consideradas como tal las totipotentes y pluripotentes, de forma estricta. Sin embargo, y además de la característica común de autorrenovación, en los últimos años se han demostrado propiedades inesperadas de las células multipotentes y unipotentes que permiten considerarlas como células madre, según detallaremos más adelante.



## Tipos de células madre

La clasificación de las células madre, además de por su potencial, se puede hacer en función de su origen. De esta manera, se pueden encontrar diferentes tipos de células madre en tejidos embrionarios y fetales, en el cordón umbilical, o en diferentes tejidos de órganos distintos de mamíferos adultos (Mimeault y Batra, 2006).

### *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 lesiva.

Dentro de este grupo, podemos también clasificar a las células derivadas de la transferencia nuclear de células somáticas. Este procedimiento consiste en incorporar el núcleo de una célula somática en un ovocito al que previamente se le ha eliminado su propio núcleo (Whitworth y Prather, 2010). De esta manera, se puede conseguir una célula madre totipotente con las características genéticas del organismo del que procede la célula somática utilizada; es decir, se pueden generar (clonar) organismos completos. El ejemplo más conocido del uso de este tipo celular y esta técnica es la oveja Dolly (Wilmut et al., 1997).

Hasta ahora se ha considerado a las CME como un tipo celular que presentaba la ventaja de no desencadenar fenómenos de rechazo tras un trasplante. Sin embargo, se ha descubierto recientemente que estas células presentan propiedades inmunológicas no del todo conocidas, de forma que el riesgo de rechazo existe, siendo necesaria una investigación más profunda en este campo para asegurar terapias celulares efectivas a largo plazo (Saric et al., 2008).

La gran ventaja que presenta este tipo de células radica en su poca diferenciación y enorme potencial. Sin embargo, estas características hacen que sean proclives a desarrollar ciertos tipos de tumores denominados teratomas o teratocarcinomas. Estos tumores, benignos en principio, presentan tejidos derivados de las tres hojas embrionarias, desorganizados y en diferente grado de diferenciación, desde tejido embrionario a pelo o dientes (O'Hare, 1978; Andrews et al., 2005). De hecho, uno de los rasgos distintivos de las CME es la formación de estos tumores al inyectarse directamente en ratones inmunodeprimidos (Yao et al., 2006). Por todo ello, la aplicación clásica de las CME suele requerir una cierta diferenciación previa (Andrews et al., 2005; Mimeault y Batra, 2006).

Las células madre fetales y las células epiteliales amnióticas pueden considerarse también CME, o relacionadas con las mismas. Las células madre fetales presentan un nivel de diferenciación un poco mayor que las CME y, por tanto, un potencial algo menor. Su ventaja radica en que no forman teratomas al ser trasplantadas y que su frecuencia de rechazo es baja. Las células epiteliales amnióticas derivan de la membrana amniótica y, al igual que las CME, pueden diferenciarse en células de las tres hojas embrionarias. No presentan telomerasa y tampoco forman teratomas (Mimeault y Batra, 2006). Durante el proceso de gestación hay que tener en cuenta que existe un tráfico recíproco materno-fetal de células, a través de la placenta. Este trasiego celular se ha visto que contribuye a reparar daños tisulares tanto en la madre como en el feto, llegando incluso las células migrantes a cruzar la barrera hematoencefálica e instalarse en el cerebro (Mimeault y Batra, 2006).

Debido al origen embrionario de estas células, su utilización en medicina regenerativa, así como la propia investigación básica, conllevan una enorme controversia, en especial en el caso de la transferencia nuclear de células somáticas (McLaren, 2001). Existen diferentes regulaciones para el uso de células madre embrionarias humanas según los países (Caulfield et al., 2010; Hyun, 2010). Algunos, como Alemania o Italia, tienen leyes fuertemente restrictivas que prohíben la transferencia nuclear de células somáticas o la investigación con células embrionarias derivadas de programas de fertilización *in vitro*, y permiten sólo el uso de líneas celulares importadas de otros países. En otros,

como España, Dinamarca o Canadá, la legislación es algo más permisiva y permite la investigación con células derivadas de programas de fertilización *in vitro*, pero no se permite la transferencia nuclear de células somáticas. Finalmente, existen países que admiten ambos procedimientos, como Japón o el Reino Unido, y países sin legislación aplicable, como los de Europa del Este, gran parte de Latinoamérica y parte de Asia (Caulfield et al., 2010; Hyun, 2010). En Estados Unidos, la investigación con CME ha pasado de estar fuertemente restringida durante el gobierno del presidente George W. Bush a una mayor permisividad en la presente legislación de Barack H. Obama, aunque existen variaciones legales según los diferentes estados (Hyun, 2010).

La importancia de la investigación con CME no sólo radica en la esperanza sobre su aplicación terapéutica directa, sino que dicha investigación está interrelacionada con el estudio de otros tipos de células madre. Así, es necesario conocer cómo se comportan las CME para un desarrollo adecuado de líneas de células pluripotentes inducidas (ver más adelante; Pfannkuche et al., 2010; Hyun, 2010), o para la caracterización de aquellos factores de crecimiento o de diferenciación que permitan una manipulación adecuada de las células madre adultas (Blau et al., 2001).

### ***Células madre del cordón umbilical***

Englobamos en este apartado a las células madre procedentes del cordón umbilical, tanto de su epitelio (Sanmano et al., 2005) como del tejido conectivo que lo compone, la gelatina de Wharton (Can y Karahuseyinoglu, 2007), y de la sangre que contiene (Cohen y Nagler, 2004; 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; Broxmeyer, 2010). Así pues, se ha conseguido diferenciar a las diferentes células madre del cordón umbilical en diversos progenitores de células funcionales entre las que se incluyen células hematopoyéticas, progenitores de células neurales, hepatocitos, células pancreáticas, epiteliales y endoteliales, bajo condiciones específicas tanto *in vivo* como *in vitro*. Además, en la sangre del cordón umbilical humano existe una subpoblación de células madre mesenquimales más primiti-

va que las de la médula ósea adulta y, por tanto, con mayor potencialidad (Erices et al., 2003; Mimeault y Batra, 2006). Estas células madre mesenquimales de la sangre del cordón umbilical pueden, diferenciarse *in vitro* en múltiples linajes celulares bajo condiciones específicas (Mimeault y Batra, 2006).

Por todo ello, la diferenciación de las células madre del cordón umbilical en células progenitoras específicas de tejido adulto se presenta como una posible estrategia alternativa para terapias celulares (Mimeault y Batra, 2006). Dado que el complejo mayor de histocompatibilidad de las células madre del cordón umbilical no está completamente desarrollado, el índice de rechazo es relativamente bajo (Cohen y Nagler, 2004) y su uso está exento de controversias éticas. Sin embargo, presentan problemas prácticos derivados sobre todo del escaso número de células utilizables que se pueden conseguir (Cohen y Nagler, 2004; Broxmeyer, 2010), por lo que la aplicación más común de este tipo celular es como sustituto de trasplantes de médula ósea en pacientes, sobre todo niños, con baja compatibilidad a los mismos. Por otra parte, el mantenimiento a lo largo del tiempo de las células derivadas del cordón umbilical de un recién nacido para posibles terapias futuras presenta un coste muy elevado (Broxmeyer, 2010).

### ***Células madre pluripotentes inducidas***

Las células madre pluripotentes inducidas son conocidas como células IPS<sup>2</sup>. Se trata de células somáticas que han sido reprogramadas genéticamente para comportarse como células embrionarias pluripotentes (Xu et al., 2008; Pfannkuche et al., 2010). Fueron descritas por vez primera en 2006 por el equipo de Yamanaka (Takahashi y Yamanaka, 2006), al descubrir que con sólo la expresión de 4 genes (*Klf4*, *Sox2*, *Oct4* y *c-Myc*) se podía transformar células somáticas en otras con un fenotipo pluripotente, similar a las CME. La comunidad científica se mostró escéptica al respecto hasta que diferentes grupos repitieron los experimentos llegando a resultados similares utilizando éstos u otros genes (Pfannkuche et al., 2010).

---

<sup>2</sup> Del inglés: *Induced Pluripotent Stem (Cells)*.

Existen diferentes formas de realizar la reprogramación del material genético: la fusión celular, la transferencia nuclear de células somáticas, la transformación mediante vectores retrovirales, lentivirales o adenovirales, la incubación de las células con factores proteicos (de transcripción) permeables, transfección con ARNm, BACs<sup>3</sup>, etc., todos ellos encaminados a mejorar la eficiencia del proceso de reprogramación y disminuir los riesgos de alteraciones genéticas (Pfannkuche et al., 2010; Yamanaka y Blau, 2010). De hecho, el principal problema que tienen estas células es que se desconoce si el proceso de reprogramación genética es completo y si se comportan realmente como CME. Así pues, aunque existen diversos estudios que demuestran que las células IPS y las CME tienen una potencialidad y un transcriptoma prácticamente idénticos, se ha comprobado que ambos tipos celulares difieren en el patrón de expresión de unos 318 genes (Chin et al., 2009). La controversia reside en si estos genes son importantes para el comportamiento como auténticas CME o si, por el contrario, son genes redundantes o simplemente la marca genética, sin mayores consecuencias, de un tipo celular u otro (Pfannkuche et al., 2010). También hay que tener en cuenta que la comparación entre ambos tipos celulares nunca se ha hecho entre células derivadas de un mismo organismo (Pfannkuche et al., 2010), luego las diferencias entre ambas pueden ser tan sólo meras diferencias intraespecíficas de dos individuos diferentes. Por otra parte, la eficiencia en el proceso de generación de este tipo celular es relativamente baja, por lo que se tiende a reducir el número de genes modificados y a utilizar productos químicos, como el ácido valproico, para estandarizar protocolos, aumentar la producción y tender hacia una reprogramación genética completa (Huangfu et al., 2008; Pfannkuche et al., 2010).

Las células IPS carecen de los problemas éticos característicos de las CME, presentando como ventajas su misma potencialidad y carecer de fenómenos de rechazo al poder derivarse de las células de un mismo paciente (Xu et al., 2008; Pfannkuche et al., 2010). Aun así, las células IPS constituyen un grupo poco conocido y en cuya investigación es necesario profundizar para conocer más sobre su naturaleza y posibles aplicaciones. Dicha investigación, además, va de la mano con la referente a las CME (Hyun, 2010).

---

<sup>3</sup> Del inglés: *Bacterial Artificial Chromosome*.

## **Células madre adultas**

Las células madre adultas (CMA) muestran generalmente un potencial de diferenciación más restringido que las CME, las células IPS y las células madre del cordón umbilical, y dan lugar a un número más limitado de progenitores celulares diferentes. En general, se considera a las CMA células multipotentes o unipotentes, aunque muchas poseen ciertas propiedades que aumentan su potencial de diferenciación y que detallaremos más adelante. A pesar de su potencialidad más restringida, las CMA no poseen los inconvenientes éticos, políticos y legales, o los relativos a la seguridad o eficiencia característicos de los tipos celulares anteriores (Mimeault y Batra, 2006; Lindroos et al., 2010).

Numerosos estudios han demostrado la existencia de poblaciones de CMA en áreas específicas que, junto con otras células llamadas acompañantes, constituyen los denominados nichos. Estos nichos de CMA se encuentran en la mayoría de órganos y tejidos de mamíferos adultos, entre los que se incluyen: el tracto gastrointestinal (Brittan y Wright, 2002), el cerebro (Lois y Álvarez-Buylla, 1993; Doetsch et al., 1997, 2002, 2003; García-Verdugo et al., 1998), el epitelio corneal (Sun y Lavker, 2004), la piel (Tumbar, 2006; Clayton et al., 2007; Gurtner et al., 2008), las glándulas mamarias (Clayton et al., 2004), el tejido adiposo (Lindroos et al., 2010), el páncreas (Seaberg et al., 2004), el corazón (Leri et al., 2005), el hígado (Ogawa y Miyagawa, 2009), los pulmones (Griffiths et al., 2005), los ovarios y 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, algunos muy largos (Li y Xie, 2005; Mimeault y Batra, 2006). 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). Según estas interacciones, las CMA latentes pueden activarse en determinadas condiciones, tanto fisiológicas como patológicas, bien para mantener la homeostasis, bien para reparar posibles daños de los tejidos en los que se encuentran (Mimeault y Batra, 2006).

Cada uno de los diferentes tipos de CMA presenta propiedades diferentes referentes a su plasticidad, potencialidad e inmunogenicidad. En la presente Tesis Doctoral se han utilizado las CMA de la médula ósea como posible herramienta terapéutica, por lo que merecen una descripción más detallada en un capítulo aparte.

## **Las células madre y su microambiente: el nicho celular**

El concepto de nicho celular fue propuesto por primera vez en 1978 por Schofield como "...aquel microambiente fisiológico que envuelve y mantiene a las células madre" (Schofield, 1978). El concepto de nicho se ha utilizado de forma histórica para hacer referencia a la localización de las células madre de un tejido determinado. Sin embargo, el nicho es mucho más que eso. Podemos decir que los nichos celulares son estructuras anatómicas, generalmente de gran complejidad, constituidas no sólo por las propias células madre, sino también por sus células acompañantes, la matriz extracelular secretada por éstas y las señales producidas entre ambos tipos celulares (Fuchs et al., 2004; Li y Xie, 2005).

La estructura y las características de los nichos celulares son muy variables, pero comparten una serie de rasgos comunes tanto en vertebrados como en invertebrados. El nicho celular de las células madre:

1. Está compuesto por un grupo de células en una localización determinada de un tejido concreto y sirve para el mantenimiento y protección de las células de dicho tejido. Su estructura es variable y puede estar compuesta por diversos tipos celulares (Fuchs et al., 2004; Li y Xie, 2005).
2. Tiene como función primaria el anclaje físico de las células al tejido al que pertenecen (Li y Xie, 2005).
3. Genera factores extrínsecos que regulan el destino y el número de las células (Li y Xie, 2005).
4. Presenta una estructura asimétrica. Esto quiere decir que tras la división de una célula madre, una de sus células hijas se queda en el nicho como remanente, mientras que la otra lo abandona para proliferar y diferenciarse (Li y Xie, 2005).

Los nichos son fundamentales para el control de la proliferación y diferenciación de las células madre que contienen, pudiendo así responder a las necesidades de homeostasis o reparación de los tejidos en que se encuentran. Tomemos como ejemplo el caso de las CME: en su ambiente (nicho) normal, presentan una regulación absoluta y la capacidad de formar un organismo completo. Fuera de su microambiente, trasplantadas en un tejido extraño, sin más, estas células desarrollan las masas informes que constituyen los teratomas (Fuchs et al., 2004).

En la regulación de las células madre en un nicho es de especial interés la unión física de éstas con sus células acompañantes. En esta interacción podemos destacar la importancia de las uniones adherentes, constituidas por las proteínas de membrana cadherinas y cateninas (en especial destacamos las N- y DE-cadherinas y la  $\beta$ -catenina en vertebrados; Zhang et al., 2003; Fuchs et al., 2004). Las integrinas también desempeñan un papel importante en esta regulación al unir a las células madre con la lámina basal, a menudo sintetizada por las células acompañantes (Fuchs et al., 2004). En términos generales, a medida que una célula madre se va separando de sus células acompañantes y va perdiendo su contacto con ellas, se vuelve cada vez más proliferativa, formando rápidamente nuevas células que se irán diferenciando progresivamente. Según esta hipótesis, los nichos celulares actuarían como inhibidores tanto de la proliferación como de la diferenciación de las células madre manteniéndolas en un estado quiescente (Fuchs et al., 2004; Li y Xie, 2005). Se han propuesto (Fuchs et al., 2004) dos mecanismos generales de salida del estado de quiescencia de las células madre:

1. Las células madre de un nicho determinado se van dividiendo lentamente hasta que físicamente se van empujando unas a otras fuera del mismo. En este momento, al perder el contacto con las células acompañantes y su ambiente químico, las células madre comienzan el proceso de proliferación rápida y de diferenciación. Este mecanismo es más común durante el desarrollo.
2. Las células madre de un nicho, normalmente quiescentes, comienzan su proliferación ante una señal externa o por cambios en su microambiente,



como los producidos por muerte celular, señales paracrinas, etc. Este mecanismo es más frecuente cuando se produce un daño tisular.

La señalización por la que las células acompañantes activan a las células madre es muy variada, compleja y no del todo conocida. Podemos destacar las señales a través del receptor Notch, la superfamilia de proteínas TGF $\beta$ /Bmp o morfógenos como Wnts (Zhang et al., 2003; Fuchs et al., 2004; Li y Xie, 2005). Hay que tener en cuenta que muchos de los experimentos realizados *in vitro* para analizar la señalización de las células acompañantes, se han llevado a cabo con un solo tipo celular. Es posible que ciertas señalizaciones sólo sean activas con la combinación de varias moléculas procedentes de diferentes células acompañantes (Fuchs et al., 2004).

La habilidad de los nichos para anclar o retener a sus propias células madre también está relacionada con el proceso denominado *homing*, que consiste en la capacidad que tiene un nicho “vacío” de atraer hacia él a sus propias células madre (Whetton y Graham, 1999). Este fenómeno es de especial interés, por ejemplo, en aquellas terapias y procedimientos que implican la ablación de la médula ósea de un paciente, con la subsecuente sustitución por otra nueva, procedimiento utilizado en esta Tesis Doctoral.

## **Divisiones simétricas y asimétricas**

Las dos células hijas resultantes de la división de una célula madre pueden o bien ser idénticas a ésta (e idénticas entre sí) ó bien quedar una como célula madre y diferenciarse la otra. La regulación de este proceso es muy importante para asegurar un número constante y suficiente de células madre en un nicho determinado y, a la vez, satisfacer los requisitos de células diferenciadas del tejido en el que se encuentran (homeostasis o reparación). En relación con la estructura asimétrica del nicho propuesta anteriormente, se asume la división asimétrica de las células madre como uno de los mecanismos que regulan este balance (Li y Xie, 2005; Morrison y Kimble, 2006).

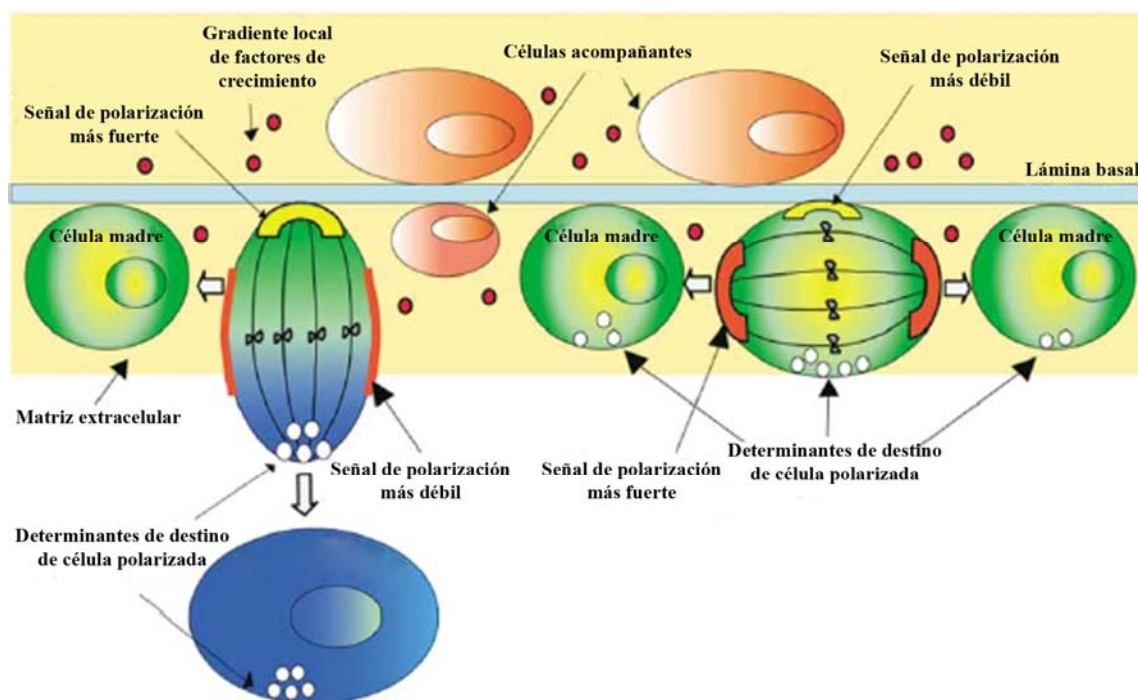
El concepto de la división asimétrica se basa en tres mecanismos (Fuchs et al., 2004):

1. La generación de polaridad celular.

2. La orientación del huso mitótico.
3. La segregación de factores de diferenciación o de quiescencia, de forma similar o diferente entre las dos células hijas.

Por ejemplo, si la señal más fuerte que produce la orientación del huso mitótico llega a través del polo de la célula madre orientado hacia las células acompañantes (o su lámina basal), la célula madre sufrirá una división asimétrica. Por el contrario, si la señal es más fuerte en los sitios de contacto entre dos células madre, el huso mitótico quedará orientado de forma paralela a la lámina basal y la división será simétrica (figura 1; Fuchs et al., 2004).

La alternancia entre las divisiones simétricas y asimétricas de las células madre está relacionada con la regulación del balance entre proliferación y diferenciación para mantener la homeostasis de un tejido o reparar lesiones en el mismo (Li y Xie, 2005; Morrison y Kimble, 2006). De esta manera, según se orienten estas divisiones, se conseguirá aumentar o mantener la población de células madre residentes de un tejido, o bien permitir su diferenciación.



**Figura 1.** Esquema explicativo de la importancia de la orientación del huso mitótico para determinar las divisiones simétricas o asimétricas de las células madre. Modificado de Fuchs *et al.* (2004).

## Transdiferenciación, desdiferenciación y fusión celular

A diferencia de las CME, se ha considerado tradicionalmente que el potencial de diferenciación y regeneración de las CMA se encuentra restringido a los tejidos a los que pertenecen. De esta manera, las CMA de cada tejido, como lo son las células madre hematopoyéticas, gastrointestinales, hepáticas o epiteliales, asegurarían el reemplazo fisiológico de las células somáticas de sus tejidos (homeostasis) a la vez que participarían en la reparación de los mismos tras radiaciones letales, heridas, hepatectomías parciales, etc. (Blau et al., 2001)

### *Transdiferenciación*

Existen numerosas evidencias de que las CMA de un tejido determinado pueden cambiar su destino y diferenciarse en células de otros tejidos, proceso conocido como *transdiferenciación*. El ejemplo más llamativo es el hecho que CMA del sistema nervioso de ratón trasplantadas en la cavidad amniótica de embriones de pollo de 4 días forman quimeras y dan lugar a células de las tres hojas embrionarias (Clarke et al., 2000). Asimismo, existen otras muchas evidencias de este fenómeno, como que células madre de la médula ósea puedan originar no sólo células sanguíneas, sino también células del músculo estriado y cardiaco, hepatocitos, células del epitelio vascular o células neurales (Blau et al., 2001). Más aun, también se ha comprobado el fenómeno inverso, de forma que células madre de tejidos diversos pueden adquirir características similares a las de la médula ósea (Blau et al., 2001). Muchos de estos procesos de transdiferenciación se han observado en condiciones de daño tisular, pero cada vez es mayor el número de evidencias de este fenómeno en condiciones fisiológicas (Blau et al., 2001; Khosrotehrani y Bianchi, 2005). El hecho de que las CMA puedan inicialmente residir en un tejido y luego contribuir a otro sugiere un grado de plasticidad mucho mayor que el que se había supuesto previamente y una biología mucho más compleja. 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 (Blau et al., 2001; Khosrotehrani y Bianchi, 2005).

En los fenómenos de transdiferenciación, el sistema circulatorio adquiere una notable importancia, al actuar como un medio de comunicación a través del cual las células madre pueden desplazarse de unos órganos a otros (Blau et al., 2001). En relación con este intercambio celular, es de especial interés el hecho de que puede existir un intercambio de células entre una madre gestante y el feto, proceso observado incluso en humanos (Khosrotehrani y Bianchi, 2005). Se ha demostrado que las células derivadas de un feto pueden persistir en la sangre y otros tejidos maternos durante décadas, un fenómeno que es conocido como *microquimerismo*. El hecho de que las células derivadas del feto se mantengan durante tanto tiempo en los tejidos maternos hace suponer que al menos una porción de estas células son células madre. De hecho, se ha demostrado que estas células pueden ser de naturaleza hematopoyética y/o mesenquimal, que pueden derivar tanto del propio embrión como de la placenta y que se pueden diferenciar en diversos tipos celulares, tanto *in vitro* como en el propio cuerpo materno (Khosrotehrani y Bianchi, 2005). El microquimerismo afecta a un elevado porcentaje de mujeres sanas (30-50%), demostrando que se trata de un fenómeno fisiológico, aunque está influido por numerosos factores, como la histocompatibilidad materno-fetal, anomalías fetales o placentarias o abortos. También se ha sugerido que el microquimerismo está relacionado con ciertas enfermedades autoinmunes. Más aún, las células derivadas del feto pueden migrar hacia órganos lesionados o afectados por alguna enfermedad, pudiendo incluso ayudar a su recuperación, como si de una “terapia celular natural” se tratase (Khosrotehrani y Bianchi, 2005).

### **Desdiferenciación**

Otro fenómeno interesante es el de la *desdiferenciación*, consistente en que una célula determinada pierde especialización y gana potencialidad, como si fuese “hacia atrás” en el proceso normal de maduración. Este fenómeno se ha conseguido recientemente de forma artificial reprogramando células somáticas para formar las células IPS (Pfannkuche et al., 2010). Sin embargo, existen datos que demuestran que esta desdiferenciación se puede producir de forma natural, de manera que progenitores parcialmente diferenciados pueden recuperar posibilidades de diferenciación más amplias revirtiendo a células madre (Morrison y Kimble, 2006), llegando incluso al extremo de que células comple-

tamente diferenciadas entren de nuevo en el ciclo celular, volviendo a formar parte de la población de células madre de un tejido determinado (Blau et al., 2001).

### ***Fusión celular***

La *fusión celular* es un proceso natural y fisiológico presente en procesos de gran importancia biológica como es el caso de la fecundación, la formación de tejidos durante el desarrollo o determinados procesos inmunológicos. Las células madre también pueden experimentar este fenómeno, basado en la unión de una célula madre determinada con un precursor local o con una célula madura, de forma que los dos citoplasmas se mezclan, pudiendo o no fusionarse los núcleos (Álvarez-Dolado, 2007; Yamanaka y Blau, 2010). De esta manera, la célula recién formada adquiere un nuevo fenotipo, cambia su programa genético (al poder expresarse la información original de ambas células) y, en consecuencia, se pueda eliminar la restricción de la célula original a una determinada estirpe celular (Álvarez-Dolado, 2007). Teniendo en cuenta que este cambio de programa genético puede suponer una cierta desdiferenciación, la fusión celular es una de las herramientas utilizadas para la formación de células IPS (Pfannkuche et al., 2010; Yamanaka y Blau, 2010). La fusión celular entre fibras musculares y células madre de la médula ósea o fibroblastos dérmicos ya se demostró hace más de una década en experimentos de terapia celular en patologías musculares (Gibson et al., 1995; Ferrari et al., 1998; Gussoni et al., 1999). Sin embargo, la primera vez que se propuso este mecanismo como alternativa a la transdiferenciación fue con 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). Además, hay que tener en cuenta que –previa a la aparición de estos dos trabajos- muchos experimentos en los que se proponía la transdiferenciación como único mecanismo de plasticidad celular, no llevaban parejo un análisis adecuado de los derivados de las células utilizadas. Así, por ejemplo, no se contempló la posibilidad de una reducción cromosómica o ni siquiera se comprobó la dotación cromosómica o nuclear de estas células (en Álvarez-Dolado, 2007, para revisión).

Inversamente, la fusión celular también ha sido puesta en entredicho, sobre todo como mecanismo de terapia celular. Sin embargo, tanto la transdiferenciación como la fusión celular han sido demostradas tanto *in vivo* como *in vitro* en numerosas ocasiones y, además, no son excluyentes, pudiendo dos células fusionarse, cambiar su destino y transdiferenciarse (Álvarez-Dolado, 2007). Asimismo, un mismo tipo celular puede experimentar ambos fenómenos, incluso en el mismo animal (Recio, 2008; Recio et al., 2011)

## Las células madre de la médula ósea

La médula ósea puede considerarse como uno de los mayores órganos del cuerpo, suponiendo el 5% del peso corporal en humanos. Se localiza en las cavidades cilíndricas de los huesos largos y en los intersticios de las porciones trabeculares de la mayoría de los huesos (Travlos, 2006). Es el principal órgano hematopoyético y un tejido linfoide primario, siendo su función primaria acoger la hematopoyesis y constituir las células del sistema inmune (Travlos, 2006). Es una región compleja, bien organizada y altamente vascularizada. Está constituida por diversos tipos celulares, entre los que se incluyen los elementos básicos del estroma y del sistema hematopoyético, así como parte de las células del tejido conjuntivo que forman el endostio y que se relacionan con el nicho celular (Fuchs et al., 2004; Li y Xie, 2005; Wilson y Trumpp, 2006).

La médula ósea contiene *células madre hematopoyéticas* y *células estromales* que colaboran mutuamente en los diferentes procesos de formación de todos los linajes celulares de este órgano, tanto sanguíneos como de la propia médula ósea (Travlos, 2006; Wilson y Trumpp, 2006) y que derivan probablemente de un mismo tipo de progenitor primitivo (Poulsom et al., 2002). Las células madre hematopoyéticas (CMH) 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 descubiertas por Friedenstein (1970) y descritas como una población celular altamente heterogénea, compuesta por múltiples tipos celulares con diferentes potenciales de proliferación y diferenciación, capaz de generar osteoblastos, fibroblastos, condrocitos y adipocitos (Friedenstein et al., 1970; Travlos, 2006).

En el presente trabajo no hemos realizado un fraccionamiento ni purificación de los distintos componentes celulares de la médula ósea, por lo que nos referiremos a las células madre procedentes de ella como “células madre de la médula ósea”. Ello no obstante, nos parece conveniente dedicar una parte de esta *Introducción* a describir estos dos tipos de células madre que se encuentran en la médula ósea.

## ***Tipos de células madre de la médula ósea***

### **Células madre hematopoyéticas**

Las CMH fueron uno de los primeros grupos de células madre en ser descubiertos. En 1867, el patólogo alemán Julius Cohnheim describió el proceso mediante el cual la médula ósea originaba células circulantes, entre las que se incluían fibroblastos implicados en procesos inflamatorios y de cicatrización (Tögel y Westenfelder, 2007). El enorme potencial regenerativo de las CMH se pone de manifiesto en la continua renovación de las células sanguíneas (eritrocitos, leucocitos y plaquetas), así como en la capacidad de un organismo para regenera gran parte de su sangre tras pérdidas masivas. Sin embargo, la clonogenicidad (capacidad de una célula de dividirse de forma indefinida y generar copias idénticas a ella misma) y el concepto como tal de célula madre hematopoyética no se aceptó hasta 1963 (Becker et al., 1963).

En la médula ósea adulta, las CMH se localizan cerca de la superficie del endostio y del endotelio sinusoidal, lo que sugiere que estas localizaciones constituyen el nicho de estas células en condiciones fisiológicas (Mimeault y Batra, 2006). Las CMH de ambas localizaciones expresan una amplia variedad de moléculas de adhesión entre las que se incluyen la N-cadherina y diversas integrinas que permiten la formación de uniones adherentes con los osteoblastos del endostio o con las células endoteliales. Se ha demostrado mediante el bloqueo de estas moléculas con anticuerpos que estas moléculas de adhesión intervienen activamente en los procesos de *homing* (Mimeault y Batra, 2006; Wilson y Trumpp, 2006). Asimismo, las CMH pueden desplazarse desde su nicho del endostio al vascular ante determinados estímulos, como daños tisulares o mediante fármacos, facilitando una posible movilización posterior, dirigida al flujo sanguíneo (Burger et al., 2005; Mimeault y Batra, 2006).



Las CMH son células multipotentes capaces de autorrenovarse y de diferenciarse paso a paso a los diferentes tipos celulares que componen la sangre, como eritrocitos, trombocitos o leucocitos. Son las células madre mejor conocidas 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. A pesar de ello, 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 celular (Tögel y Westenfelder, 2007). Ello no obstante, se suelen definir las CMH como positivas a los marcadores c-kit y sca-1, y negativas a la familia SLAM (Tögel y Westenfelder, 2007). 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 con irradiación letal (Smith et al., 1991).

A finales de la década de los 90 varios laboratorios descubrieron nuevas propiedades de las CMH realmente sorprendentes. Estas propiedades ponían en entredicho el dogma aceptado de que una célula madre no puede cambiar de linaje celular o que una vez diferenciada no puede volver atrás (Raff, 2003). Algunos de los primeros trabajos demostraron que las CMH no sólo formaban las diferentes células sanguíneas, sino que también podían dar lugar a hepatocitos o miocitos (Ferrari et al., 1998; Gussoni et al., 1999; Petersen et al., 1999). Sin embargo, en estos experimentos no se realizó un fraccionamiento de las diferentes poblaciones celulares de la médula ósea, por lo que la capacidad de transdiferenciación de las CMH quedó en entredicho, hasta que finalmente se demostró que poblaciones de CMH altamente purificadas (de hecho, una sola célula) podían diferenciarse *in vivo* en células de una gran cantidad de tejidos (Krause et al., 2001).

A pesar de todo, el mecanismo de transdiferenciación no ha sido del todo aceptado y se han planteado otras explicaciones para este fenómeno. La restricción a modelos patológicos podría explicar la aparición de estos procesos de plasticidad celular, caracterizados normalmente por su baja frecuencia (Bae et al., 2005; Tögel y Westenfelder, 2007; Johansson et al., 2008). Otras expli-



caciones alternativas son la fusión celular (Terada et al., 2002; Ying et al., 2002), los problemas metodológicos (Raff, 2003) o la presencia en las células trasplantadas de poblaciones de células madre análogas a las CME (Tögel y Westenfelder, 2007). Independientemente de su mecanismo de plasticidad, las CHM suponen una herramienta terapéutica potencial en modelos patológicos, que además parecen aumentar su plasticidad intrínseca. La escasa y lenta aparición de eventos de plasticidad celular no supone un óbice para dicha aplicación, ya que, además de la diferenciación, hay otros mecanismos potenciales de acción de las CMH en tejidos dañados. Entre estos mecanismos destacan:

1. La secreción de diversas quimiocinas y citocinas, que estimularán la regeneración, protegiendo a las células supervivientes tras un daño o lesión, inhibiendo la apoptosis, suprimiendo reacciones inmunes y aumentando la angiogénesis.
2. El incremento de la proliferación de células madre endógenas del tejido.
3. El rescate celular mediante fusión celular o, incluso, tras transferencia mitocondrial (Tögel y Westenfelder, 2007).

## **Células madre estromales**

Las células madre estromales fueron descritas por primera vez por Friedenstein y su grupo en 1970, al cultivar células derivadas de la médula ósea y, tras cierto tiempo de cultivo, eliminar aquellas que no presentaban adherencia a la placa. Las células remanentes tenían un gran potencial de proliferación y se podían estimular en cultivo o al trasplantarse en animales para diferenciarse en osteoblastos, condrocitos y adipocitos (Friedenstein et al., 1970; Tögel y Westenfelder, 2007).

El estroma de la médula ósea es una estructura compleja altamente vascularizada que contiene diversas poblaciones de células madre y elementos de la matriz extracelular que intervienen en el proceso de hematopoyesis. Entre los diferentes tipos de células estromales, destaca la presencia de las células madre mesenquimales (CMM). Este tipo celular no es exclusivo de la médula ósea, de hecho se encuentra en casi todos los órganos (Tögel y Westenfelder, 2007), pero como las CMM se han obtenido clásicamente del estroma de la médula ósea, se han denominado también células madre estromales (aunque

ambos términos no sean equivalentes) o unidades formadoras de colonias fibroblásticas (Travlos, 2006; Recio, 2008) indistintamente. Debido a su multipotencialidad y a una serie de características que definen a las CMM como una población más homogénea que las células estromales (adhesividad y determinados marcadores de superficie), el término correcto consensuado para denominar a esta población celular es el de “células estromales mesenquimales multipotentes” (Dominici et al., 2006). Además de las CMM, se han purificado otros tipos celulares, como las células progenitoras adultas multipotentes y las células progenitoras de mesodermo primitivo (Mimeault y Batra, 2006). Estas últimas pueden diferenciarse en diferentes tipos celulares mesenquimales que participan activamente en la formación de la matriz extracelular calcificada del hueso, incluyendo osteoblastos y condroblastos, así como otros tipos celulares distintos como los adipocitos. Las células estromales se pueden diferenciar, al menos *in vitro*, en una amplia variedad de tipos celulares de otras estirpes entre los que se incluyen mioblastos, cardiomiocitos, células endoteliales, hepatocitos, células alveolares, neuronas, células gliales y los elementos derivados de líneas hematopoyéticas (Mimeault y Batra, 2006; Tögel y Westenfelder, 2007). De hecho, las células madre estromales favorecen la diferenciación de otros tipos celulares a células hematopoyéticas, al haberse demostrado que CME cultivadas junto con células estromales son inducidas a la diferenciación (se diferencian) en diferentes líneas celulares hematopoyéticas (Mimeault y Batra, 2006).

Las células madre estromales tienen la capacidad de migrar activamente a la circulación sanguínea, de manera que se ha demostrado que intervienen en el continuo proceso de remodelación ósea (formación y resorción) así como en mecanismos de reparación de tejido dañado en huesos, cartílagos, hígado, pulmones, intestino y corazón (Jiang et al., 2002). De hecho, las células madre estromales parecen contribuir a la formación de prácticamente todos los órganos del cuerpo tras su infusión sistémica (Anjos-Afonso et al., 2004; Grove et al., 2004; Tögel y Westenfelder, 2007). Finalmente, las células madre estromales son ideales para el desarrollo de terapias celulares al poder generarse, mantenerse y expandirse fácilmente en cultivo, poder alterarse genéticamente

mediante vectores virales y presentar propiedades inmunológicas que hacen que su tasa de rechazo sea notablemente baja (Tögel y Westenfelder, 2007).

## **Células acompañantes**

Existe un tercer tipo de células madre en la médula ósea: las denominadas células acompañantes o células SP<sup>4</sup>. Estas células constituyen una población minoritaria y pueden encontrarse en otros órganos. Además, presentan una sobreexpresión de transportadores de membrana que las hacen capaces de eliminar rápidamente moléculas extrañas, confiriendo una notable ventaja para su supervivencia (Poulsom et al., 2002; Forbes et al., 2002). Se considera que las células SP pueden ser similares al precursor primitivo común de las CMH y las células madre estromales (Forbes et al., 2002; Poulsom et al., 2002), incluso algunos autores las consideran como parte de una pequeña población de células multipotentes relativamente indiferenciadas que se encuentran dispersas por los diferentes tejidos de los organismos adultos (Poulsom et al., 2002).

## **Plasticidad de las células madre de la médula ósea**

Como se ha detallado anteriormente, las células madre presentan una plasticidad mucho mayor de lo que se pensaba. En el caso de las células madre de la médula ósea, la variedad de tipos celulares en los que se pueden diferenciar *in vitro* es extraordinariamente amplia (Grove et al., 2004; Mimeault y Batra, 2006; Tögel y Westenfelder, 2007). Además, en los apartados anteriores se han recogido numerosos ejemplos de estos fenómenos de plasticidad *in vivo*, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Wilson y Trumpp, 2006). Dichos ejemplos demuestran cómo las células derivadas de la médula ósea pueden dar lugar –ya sea mediante fenómenos de fusión o de transdiferenciación– a células propias de otros órganos.

Puesto que la sangre tiene acceso a todos los tejidos corporales, no es descabellado pensar que las células madre –incluyendo las de la médula ósea– puedan utilizarla como vehículo de transporte y que los fenómenos de plasticidad celular descubiertos a finales de los noventa no sean tan sorprendentes,

---

<sup>4</sup> Del inglés *Side Population*

sino que formen parte de las propiedades características de las células madre (Álvarez-Dolado, 2007).

Los mecanismos de detección de los fenómenos de plasticidad celular empleados en la mayoría de los estudios realizados hasta la fecha presentan numerosas características comunes, y son análogos a los utilizados en esta Tesis Doctoral. En ellos, la identificación de los cambios en el destino celular se consigue mediante el trasplante –intravenoso (Eglitis y Mezey, 1997; Brazelton et al. 2000, Corti et al., 2002; Weimann et al., 2003; Magrassi et al., 2007; Priller et al., 2007; Johansson et al., 2008; Recio et al, 2011), intrahepático (Massengale et al., 2005; Espejel et al., 2009) o intraperitoneal (Mezey et al., 2000; Corti et al., 2002; Álvarez-Dolado et al., 2003; Corti et al., 2004)- de células de la médula ósea de un animal adulto, genéticamente identificables, en hospedadores adultos o neonatos a los que se les ha eliminado previamente la médula ósea. Esta ablación se consigue en la mayoría de los casos mediante radiaciones ionizantes (Eglitis y Mezey, 1997; Brazelton et al. 2000, Corti et al., 2002; Weimann et al., 2003; Massengale et al., 2005; Johansson et al., 2008; Recio et al, 2011), pero también mediante agentes químicos (Magrassi et al., 2007; Espejel et al., 2009;) o en modelos animales con un déficit genético que impide la correcta biogénesis de la médula ósea (Mezey et al., 2000; Nygren et al., 2008). En todos los casos, es necesario un trasplante de médula ósea que permita la reconstrucción de todos los linajes celulares sanguíneos confirmándose el éxito del trasplante por medio de la supervivencia de los animales receptores y la evaluación del grado de quimerismo sanguíneo de las células trasplantadas.

La identificación de las células procedentes de la médula ósea del donante se puede realizar de diversas maneras. En la mayor parte de los experimentos se emplean animales donantes transgénicos que expresan constitutivamente en sus células -o en poblaciones de interés- la proteína fluorescente verde, amarilla o roja (GFP, YFP o RFP<sup>5</sup>), o también la enzima  $\beta$ -galactosidasa (Álvarez-Dolado et al., 2003; Recio et al. 2011). Alternativamente, también se

---

<sup>5</sup> Del inglés *Green Fluorescent Protein*, *Yellow Fluorescent Protein* y *Red Fluorescent Protein*, respectivamente

usan células procedentes de un donante macho que, tras su trasplante en hembras receptoras, pueden ser detectadas mediante un marcaje específico para el cromosoma Y (Eglitis y Mezey, 1997; Mezey et al., 2000). En otros casos, las células que se van a trasplantar se pueden detectar transfectándolas con factores virales que impliquen la expresión de un marcador determinado (Priller et al., 2007). 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.

Finalmente, es importante señalar que en todos los estudios realizados hasta la fecha, las células madre de la médula ósea pueden tener un origen hematopoyético o estromal y además no se ha llegado a determinar con exactitud si las células implicadas en estos procesos son directamente las células madre de la médula ósea o células originadas a partir de éstas. Por todo ello, de aquí en adelante nos referiremos a ellas como células derivadas de la médula ósea (CDMO).

En muchos casos no están claros los detalles subyacentes a la plasticidad celular de las CMA, quedando aún muchos interrogantes. Lo que sí está claro es que el uso terapéutico de las células madre de la médula ósea constituye una estrategia prometedora para múltiples enfermedades degenerativas con dianas muy diversas, como 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, o también enfermedades nerviosas, como es el caso de las enfermedades de Parkinson o de Alzheimer (Mimeault y Batra, 2006; Álvarez-Dolado, 2007).

A continuación, se hará un breve análisis de las características y funcionalidad de las células madre adultas de los órganos y tejidos objeto de esta Tesis Doctoral -sistema nervioso central (SNC) y músculo estriado-, con especial énfasis en la contribución de las células de la médula ósea a los mismos.

## **Plasticidad en el sistema nervioso central**

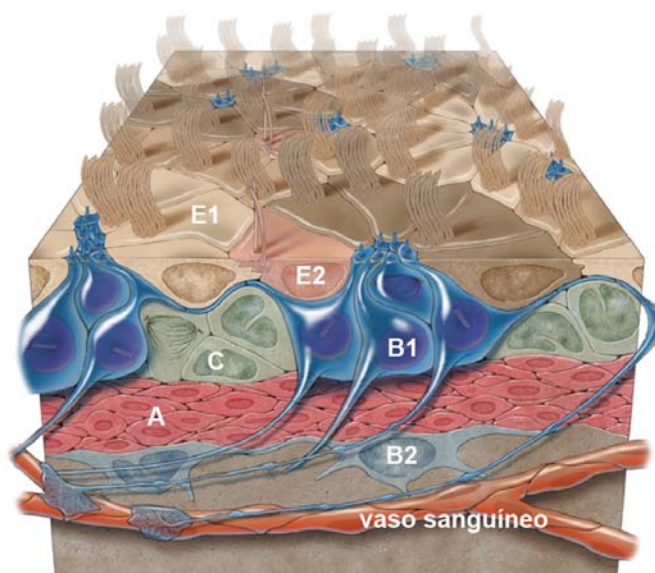
Tradicionalmente se ha considerado al SNC de mamíferos como una estructura sin capacidad de renovación tras el nacimiento. Sin embargo, ya con

los trabajos de Altman (Altman, 1962, 1969), se demostró la existencia de células madre y se pasó de una concepción totalmente estática de este sistema a otra más plástica, en la que se acepta la generación de nuevos elementos, renovación y cambio de ciertos circuitos y estructuras, y la existencia de cierta renovación tisular en el SNC (Altman, 1969; Lledo et al., 2006). Hasta la fecha se ha demostrado la presencia de neurogénesis –formación de nuevos elementos neurales a partir de células progenitoras- en el SNC adulto de todos los grandes grupos de vertebrados: peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos (García-Verdugo et al., 2002; González-Granero et al., 2006). Consecuentemente, este proceso no se trata de un fenómeno aislado, sino de un mecanismo conservado en la evolución. En mamíferos adultos existen dos regiones neurogénicas principales en el SNC: el giro dentado de la formación hipocámpal (Altman y Das, 1965; Gould y Tanapat, 1997; Eriksson et al., 1998; van Praag et al., 2002) y la zona subventricular (ZSV), relacionada con el bulbo olfativo (BO) (Altman, 1969; Lois y Álvarez-Buylla, 1993; Doetsch et al., 1997, 2003; Carleton et al., 2003). Se han propuesto otras regiones del SNC donde puede existir neurogénesis, como la corteza cerebral, la amígdala, el estriado, la sustancia nigra o la médula espinal (Gage, 2000; Gould, 2007), si bien existen discrepancias sobre todo en lo referente a los métodos de detección o los resultados tras el empleo de modelos con lesiones.

El nicho celular concreto del hipocampo, donde se encuentran sus células madre, es la denominada zona subgranular: capa germinal situada entre el giro dentado y el hilus. Las células madre (células tipo B), de naturaleza astrocítica, se encuentran en loci relacionados con vasos sanguíneos. Estas células se dividen lentamente para dar lugar a progenitores inmaduros (células tipo D), que a su vez se dividen y diferencian en los granos (células tipo G) del hipocampo (Doetsch, 2003).

En cuanto a la ZSV, es una lámina de tejido que tapiza los ventrículos laterales, compuesta a su vez por diversos tipos celulares. La capa celular que se encuentra en contacto directo con los ventrículos está formada por ependimocitos ciliados (células tipo E). Al igual que en la zona subgranular, las células madre tienen naturaleza astrocitaria (células tipo B1) y también se dividen lentamente para formar precursores altamente proliferativos (células tipo C), que

darán lugar tras diferenciarse a neuroblastos (células tipo A; Doetsch et al., 1997, 2003; García-Verdugo et al., 1998). Existen otros tipos celulares, como los tanicitos (células tipo D) o astrocitos no proliferativos (células tipo B2; Doetsch, 2003). Recientemente se ha demostrado que todos estos componentes celulares de la ZSV se disponen de una forma muy ordenada incrementando, aun más si cabe, la complejidad de esta región (Mirzadeh et al., 2008). Así, las células B1 emiten una prolongación hacia el ventrículo, de manera que quedan en contacto directo con éste (figura 2; Doetsch et al., 2003; Mirzadeh et al., 2008). Además, las células B1 se disponen formando grupos, de manera que las expansiones de todas ellas quedan, a su vez, también agrupadas (figura 2). Alrededor de las agrupaciones de las expansiones de los astrocitos B1 se disponen las células de tipo E formando una estructura en roseta (figura 2; Mirzadeh et al., 2008). Finalmente, cabe destacar que estos endimocitos, pue-



**Figura 2.** Esquema tridimensional de la ZSV. Los endimocitos (E1 y E2) se disponen formando una estructura en roseta alrededor de las expansiones que los astrocitos proliferativos (B1) emiten hacia el ventrículo. Obsérvense los precursores altamente proliferativos (C), los neuroblastos (A), los astrocitos no proliferativos (B2) y las expansiones que las células B1 emiten hacia los vasos sanguíneos. Modificado de Mirzadeh et al, 2008.

den ser a su vez de dos tipos: E1, multiciliados, o E2, con tan sólo dos cilios y unos cuerpos basales extraordinariamente complejos (figura 2; Mirzadeh et al., 2008).

La ZSV es a su vez una zona de origen de migración celular, de manera que los neuroblastos aquí formados viajan en forma de cadenas migratorias rodeadas por astrocitos no proliferativos a lo largo de la denominada corriente migratoria rostral (CMR) hacia el BO (Lois et al., 1996; Doetsch et al., 1997, 2003). Estos neuroblastos también pueden migrar hacia el bulbo olfativo accesorio (Bonfanti et al., 1997) o hacia a otras regiones cerebrales, como la corteza, en casos de lesión (Goings et al., 2004; Sundholm-Peters et al., 2005). Los



neuroblastos también incorporan marcadores de proliferación celular, luego son células mitóticamente activas (Doetsch et al., 1997; Peretto et al., 1999). Tras la migración tangencial de la CMR y una vez llegados al BO, los neuroblastos migran de nuevo radialmente para diferenciarse en interneuronas (Carleton et al., 2003).

Además de la capacidad de formar células neurales *in vitro* (ver más arriba), las CDMO también se pueden diferenciar en células del SNC *in vivo*, como se demostró a finales de los años 90, encontrándose astrocitos y células microgliales derivadas de aquéllas (Eglitis y Mezey, 1997). En este trabajo se demostró que la llegada de las CDMO al cerebro es muy rápida – encontrándose ya a los 3 días tras el trasplante- y que se incrementa a lo largo del tiempo (Eglitis y Mezey, 1997).

Tres años más tarde, se publicaron en la revista *Science* dos trabajos revolucionarios que demostraban que las células de la médula ósea llegaban al SNC y daban lugar no sólo a células gliales, sino también a neuronas (Brazelton et al., 2000; Mezey et al., 2000). En el trabajo llevado a cabo por el grupo de Brazelton (Brazelton et al., 2000), se trasplantaron por vía intravenosa células de la médula ósea GFP+ a ratones adultos irradiados con dosis letales. Transcurridos varios meses tras el trasplante, se detectaron CDMO en diferentes regiones del cerebro entre las que se incluían el hipocampo, el cerebelo, el BO y algunas áreas corticales. Estas células se encontraban integradas en el tejido nervioso y coexpresaban GFP junto con uno o más marcadores neuronales específicos como NeuN o Tuj1 ( $\beta$ -tubulina III). Además de estas neuronas, un análisis en profundidad realizado en el BO demostró que la mayoría de las CDMO eran células microgliales no encontrándose ningún astrocito con este origen (Brazelton et al., 2000), en contraste con lo descrito anteriormente (Eglitis y Mezey, 1997).

En el otro estudio (Mezey et al., 2000) el trasplante se realizó por vía intraperitoneal en animales neonatos. En este caso, los animales receptores fueron ratones *knock-out* PU.1, que carecen de macrófagos, neutrófilos, mastocitos, osteoclastos y linfocitos B y T al nacer, por lo que requieren un trasplante de médula ósea antes de las 48 horas posteriores a su nacimiento para poder sobrevivir y desarrollarse correctamente. El trasplante de médula ósea de ma-



chos silvestres en neonatos hembras PU.1 permitió la supervivencia de estos animales y la detección de células con cromosoma Y en la mayor parte del encefalo. 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.

Los estudios pioneros de finales de la década de los 90 y principios del s. XXI han puesto de manifiesto el inesperado grado de plasticidad de las CDMO. De igual forma, han suscitado numerosos interrogantes que a su vez han promovido el desarrollo del apasionante y prometedor campo de la terapia celular. Dicho avance es de especial interés en el tratamiento de los trastornos del SNC dada la baja capacidad de regeneración del mismo en los adultos y la creciente incidencia de las enfermedades neurales (Hou y Hong, 2008). Ello queda demostrado con el acervo de artículos científicos relacionados publicados en la última década. En la presente Tesis Doctoral nos centramos en el estudio concreto de dos estructuras encefálicas de gran importancia: el BO y el cerebelo.

## **Plasticidad en el músculo estriado**

Las células madre específicas del tejido muscular y que llevan a cabo los procesos de reparación se denominan células acompañantes (o satélite). Se sitúan entre la lámina basal y las fibras musculares del músculo estriado y, como otros tipos de células madre, se encuentran normalmente en un estado de quiescencia (Campion, 1984).

La primera evidencia de la contribución de las CDMO al músculo estriado se realizó inyectando células de la médula ósea que expresaban el gen de la  $\beta$ -galactosidasa bajo un promotor específico de células musculares en ratones inmunodeficientes. Tras inducir una lesión muscular química, se demostró la presencia en la región lesionada de fibras musculares derivadas de las trasplantadas, ya que expresaban la  $\beta$ -galactosidasa (Ferrari et al., 1998). Además, el trasplante podía realizarse tanto por vía intramuscular como intravenosa.

Esta plasticidad se ha utilizado en experimentos con modelos de ratón de distrofia muscular que carecen de la proteína distrofina. En este caso, los animales se irradiaron para eliminar la médula ósea y se les trasplantaron célu-

las de la médula ósea de animales sanos. El análisis del músculo de los animales trasplantados demostró la presencia de nuevas fibras musculares procedentes de las CDMO que producían niveles normales de distrofina (Gussoni et al., 1999). Aprovechando que la radiación previa al trasplante de médula ósea elimina también las células satélite de los músculos, estudios posteriores han demostrado que las CDMO pueden transdiferenciarse en células satélite musculares que, a su vez, dan lugar a nuevas fibras musculares (LaBarge y Blau, 2002). Aunque en este caso se demostró que estas células satélite eran diploides y por tanto, derivadas de las células trasplantadas mediante un proceso de transdiferenciación, otros estudios proponen la fusión celular como el fenómeno mediante el cual las CDMO se integran en el tejido muscular (Terada et al., 2002; Ying et al., 2002; Raff, 2003).

### ***Integración de las células derivadas de la médula ósea en el cerebelo***

El cerebelo es una de las regiones encefálicas en la que más se ha analizado la incorporación de CDMO, siendo de especial interés su contribución a la formación de células de Purkinje. 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 (Fernández-González et al., 2002). La complejidad morfológica de este tipo celular es enorme, de manera que en los humanos cada célula de Purkinje puede llegar a recibir más de un millón de contactos sinápticos procedentes de otras neuronas (Weimann et al., 2003a) y su importancia funcional radica en el hecho de que sus axones constituyen la única eferencia nerviosa del cerebelo a otras regiones. Por todo ello, y teniendo en cuenta el enorme grado de diferenciación alcanzado por este tipo neuronal y la complejidad de sus conexiones, la plasticidad celular relacionada con estas células resulta sorprendente. Las células de Purkinje son críticas para el control del equilibrio y de los movimientos finos y su pérdida produce déficits en dichas funciones, característicos de ciertas enfermedades como la ataxia espino-cerebelosa de tipo 1 (Zoghbi, 1995), el síndrome de Niemann-Pick C (Vanier, 2010), la ataxia telangiectasia (Lavin et al., 2007), la ataxia de Friedreich (Koeppen, 1998) o las degeneraciones cerebelares alcohólicas como

el síndrome de Wernicke-Korsakoff (Butterworth, 1993). De esta manera, la renovación o el rescate de las células de Purkinje podría tener implicaciones terapéuticas muy significativas para un número muy importante de personas (Weimann et al., 2003a).

Un año más tarde de la publicación de los trabajos de Brazelton y Mezey en los que se ponía de manifiesto la capacidad de las CDMO para dar lugar a neuronas (Brazelton et al., 2000; Mezey et al., 2000), se demostró que un cierto número de células de Purkinje también procedían de dichas CDMO (Priller et al., 2001b). En este primer estudio se emplearon ratones adultos letalmente irradiados y sometidos a un trasplante intravenoso de células procedentes de animales GFP. Doce meses tras el trasplante se encontraron en estos animales células de Purkinje GFP+ completamente desarrolladas y funcionales (Priller et al., 2001b).

Posteriormente se publicaron numerosas evidencias similares empleando diferentes técnicas de trasplante o mecanismos de detección de las células neurales procedentes de la médula ósea (Wagers et al., 2002; Álvarez-Dolado et al., 2003; Weimann et al., 2003b; Corti et al., 2004; Bae et al., 2005, 2007; Magrassi et al., 2007; Johansson et al., 2008; Nygren et al., 2008; Recio et al., 2011), demostrándose también que este fenómeno sucede en humanos (Weimann et al., 2003a). Estos estudios ponen a su vez de manifiesto que las células de Purkinje derivadas de la médula ósea trasplantada pueden encontrarse antes de lo que se pensaba: ya a los tres (Magrassi et al., 2007) o incluso a los dos meses (Álvarez-Dolado et al., 2003; Nygren et al., 2008) después de la realización del trasplante. Por el contrario, estudios realizados en nuestro laboratorio no han encontrado este tipo de células antes de los cinco meses tras el trasplante (Recio et al., 2011), lo que pudiera deberse a diferentes parámetros difíciles de controlar a lo largo del proceso de trasplante y supervivencia de los animales.

## **Mecanismos de plasticidad**

En el primer trabajo que describió la formación de células de Purkinje a partir de CDMO se propuso la formación *de novo* de las mismas mediante un proceso de transdiferenciación, descartándose la fusión celular como meca-

nismo de plasticidad celular (Priller et al., 2001b). Sin embargo, 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, 2003b; Magrassi et al., 2007; Johansson et al., 2008; Recio et al., 2011).

La poliploidía de las células de Purkinje no es un descubrimiento reciente, sino que fue descubierta hace ya 70 años en ratas y en ratones de edad avanzada (Inukai, 1928; Andrew, 1937), con resultados similares a los obtenidos por Magrassi y colaboradores (5% de células binucleadas en ratones de 18 meses; Magrassi et al., 2007). Más adelante, el mismo fenómeno se describiría en humanos (Lapham, 1968). No obstante, el grupo de Álvarez-Dolado fue el primero que demostró definitivamente la existencia de células de Purkinje binucleadas y que el mecanismo de plasticidad celular entre estas grandes neuronas y las CDMO es la fusión celular (Álvarez-Dolado et al., 2003). El análisis de las células de Purkinje binucleadas, efectuado mediante microscopía electrónica en este estudio, 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; 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 CDMO (Álvarez-Dolado et al., 2003). Un trabajo posterior realizado a distintas edades de supervivencia corroboró estos resultados (Weimann et al., 2003b). Además, comprobó que, con el tiempo, los dos núcleos adquirían características similares, típicas de los núcleos de las células de Purkinje. Este hecho puso de manifiesto que el núcleo procedente de las CDMO –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 los genes propios de estas neuronas (Weimann et al., 2003b; Johansson et al., 2008).

## Factores implicados en la integración celular

Se ha demostrado que el número de células de Purkinje derivadas de la médula ósea aumenta linealmente con el tiempo (Weimann et al., 2003a;

Weimann et al., 2003b; Magrassi et al., 2007), y que una vez que una de estas células se forma, se mantiene estable al menos durante 7-9 meses (Magrassi et al., 2007) o más de un año (Johansson et al., 2008). Sin embargo, existen discrepancias en los datos cuantitativos obtenidos. Así, existen diferentes estudios que demuestran que este fenómeno de plasticidad ocurre con una frecuencia bastante baja, al menos en condiciones fisiológicas, encontrándose menos de diez células de Purkinje derivadas de la médula ósea por cerebelo a diferentes edades de estudio (Priller et al., 2001b; Wagers et al., 2002; Álvarez-Dolado et al., 2003; Nygren et al., 2008; Recio et al., 2011). En otros estudios la frecuencia es mayor, llegando a observarse hasta sesenta células de Purkinje (Weimann et al., 2003b) por cerebelo en ratones 16 meses después de un único trasplante o incluso más de cien tras un periodo de entre 7 y 9 meses (Magrassi et al., 2007).

La frecuencia de llegada de CDMO a un tejido u órgano determinado en condiciones fisiológicas se ve incrementada cuando dicha estructura presenta algún tipo de patología o lesión inducida (Gussoni et al., 1999; Lagasse et al., 2000; Jackson et al., 2001), y el SNC no es una excepción. El efecto de un ambiente neurodegenerativo se ha observado tanto en trasplantes directos de las CDMO en el cerebelo (Bae et al., 2005), como en un trasplante sistémico de médula ósea (Magrassi et al., 2007; Johansson et al., 2008; Nygren et al., 2008; Espejel et al., 2009).

En el caso del trasplante directo, se utilizaron como receptores ratones BALB/c de una estirpe modelo para la enfermedad humana Niemann-Pick de tipo C1. En este modelo animal se produce una degeneración progresiva de las células de Purkinje a partir de las 3 semanas de edad con la consiguiente ataxia cerebelosa asociada. El trasplante directo en el cerebelo de CDMO de ratones sanos incrementó significativamente la supervivencia de las neuronas de Purkinje de los ratones enfermos. Además, tanto el número de células de Purkinje con marcadores propios del donante, como el número de células de Purkinje con dos núcleos fue superior en los animales con neurodegeneración que en animales silvestres trasplantados con el mismo protocolo simultáneamente (Bae et al., 2005).

En el caso de los trasplantes sistémicos de médula ósea existen varios trabajos que plantean la importancia del ambiente en la zona en degeneración (Magrassi et al., 2007; Johansson et al., 2008). La lesión selectiva de las células de Purkinje mediante inyección intraventricular de sustancias tóxicas (anticuerpos anti-P75 conjugados con saporina o yoduro de propidio), demostró que el ambiente degenerativo conllevaba tanto una aparición más temprana (1 mes antes) de células de Purkinje derivadas de la médula ósea, como una cantidad de éstas mucho mayor en animales lesionados que en animales control (Magrassi et al., 2007). Por otra parte, se puso de manifiesto que la inflamación causada en el cerebelo tanto por una dermatitis crónica (dermatitis idiopática ulcerativa) como por la encefalitis autoinmune experimental (inducida por la administración inmunogénica de la glicoproteína de la mielina oligodendrocítica) produce un incremento espectacular (más de veinte veces) del número de eventos de fusión celular entre las CDMO y las células de Purkinje (Johansson et al., 2008).

Es importante destacar que el posible efecto de la radiación en todo este proceso, a la que se somete en muchos casos a los animales receptores antes del trasplante, quedó descartado gracias al trabajo de Magrassi y colaboradores (Magrassi et al., 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 a los que se les había eliminado su propia médula ósea bien por radiación letal, bien por quimioterapia. 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 CDMO (Johansson et al., 2008), contribuye a que este proceso se lleve a cabo con una frecuencia mucho mayor (Nygren et al., 2008), debido probablemente a procesos de inflamación. Además, la radiación empleada en neonatos provoca daños graves en las células de Purkinje que, a su vez, favorecen el mecanismo de fusión celular con las CDMO (Espejel et al., 2009).

## ***Integración de las células derivadas de la médula ósea en el bulbo olfativo***

En los primeros trabajos que demostraron la contribución de las CDMO a la formación de neuronas (Brazelton et al., 2000; Mezey et al., 2000) ya se observó la llegada de estas células al BO. Como se ha descrito con anterioridad, el BO es una de las regiones de destino de la neurogénesis adulta en el SNC donde se produce la incorporación de nuevas neuronas durante toda la vida del animal (Altman, 1969; Lois y Álvarez-Buylla, 1993; Carleton et al., 2003; Mouret et al., 2009). Sin embargo, la llegada e incorporación de CDMO a esta región no se ha estudiado en tanta profundidad como para el cerebelo y las células de Purkinje. Por otra parte, hay que tener en cuenta que los resultados obtenidos en esta región son heterogéneos y, en muchos casos, contradictorios (Brazelton et al., 2000; Priller et al., 2001b; Corti et al., 2002; Massengale et al., 2005).

En uno de los primeros trabajos en los que se observaron neuronas derivadas de la médula ósea, se detectaron en el BO (Brazelton et al., 2000). En este caso, el número de CDMO que expresaban marcadores neuronales (como NeuN, Tuj1 o NFH<sup>6</sup>) en el BO a los 2-3 meses después del trasplante fue relativamente elevado (0,2–0,3% del número total de neuronas), en comparación con otras regiones y con los datos publicados en trabajos posteriores. La primera controversia llegó un año más tarde, con el estudio del BO de aquellos animales en los que se había detectado por primera vez la existencia de células de Purkinje relacionadas con CDMO (Priller et al., 2001b). La detección de estas neuronas demostraba la llegada e integración de las CDMO al encéfalo pero, contrariamente a lo esperado, apenas se encontraron CDMO en el BO que coexpresasen GFP y NeuN y, además, ninguna de esas escasas células encontradas mostraron una morfología neuronal característica.

Un año más tarde se publicó un nuevo estudio que reafirmaba los primeros resultados, al detectar células con marcadores neuronales que derivaban de la médula ósea trasplantada tanto en la corteza como en el BO (Corti et al.,

---

<sup>6</sup> Del inglés *NeuroFilament Heavy chain*

2002). Estos resultados fueron de nuevo rebatidos con un trabajo que estudiaba el mantenimiento del fenotipo hematopoyético de las CDMO que llegan al cerebro (Massengale et al., 2005). En él, aunque se encontraron células de Purkinje con marcadores del donante, no se detectaron CDMO con características neuronales, positivas para NeuN o MAP2<sup>7</sup>, ni en el BO ni en otras regiones encefálicas distintas al cerebelo (Massengale et al., 2005). Finalmente, en un trabajo realizado en nuestro laboratorio se demostró definitivamente que las CDMO contribuían simultáneamente a la formación tanto de células de Purkinje, como de interneuronas del BO, mediante procesos de plasticidad celular diferentes (Recio et al., 2011).

## El ratón mutante PCD

Un aspecto clave para el estudio del SNC son los modelos animales, especialmente aquellos que presentan algún tipo de lesión o neurodegeneración. De esta manera, se pueden determinar las funciones de estructuras encefálicas o sistemas neuronales por eliminación de los mismos o reproducir las características de determinadas patologías humanas para desarrollar terapias efectivas.

Los modelos de lesión física o química suponen en muchos casos procedimientos invasivos que pueden presentar efectos secundarios y resultados bastante heterogéneos. Por ello, los modelos genéticos que conllevan degeneraciones selectivas de determinados tipos neuronales constituyen una alternativa más constante, sencilla, precisa y económica que los procedimientos invasivos.

En la presente Tesis Doctoral se estudia el ratón mutante PCD, en el que tienen lugar neurodegeneraciones posnatales y selectivas en varias regiones encefálicas, entre ellas el cerebelo y el bulbo olfativo.

---

<sup>7</sup> Del inglés *Microtubule Associated Protein 2*



## La mutación “Purkinje Cell Degeneration”

Actualmente han identificado ocho alelos diferentes de la mutación *pcd*<sup>8</sup>, denominadas *Agtpbp1<sup>pcd</sup>*, *Agtpbp1<sup>pcd-2J</sup>*, *Agtpbp1<sup>pcd-3J</sup>*, etc., aunque para abreviar se conocen como *pcd*<sup>1J</sup>, *pcd*<sup>2J</sup>, *pcd*<sup>3J</sup>, etc. (Wang y Morgan, 2007). La mutación original, *pcd*<sup>1J</sup>, 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). Los alelos mutantes *pcd*<sup>2J</sup> y *pcd*<sup>3J</sup> aparecieron también espontáneamente en las estirpes SM/J y BALB/cByJ, respectivamente. El alelo *pcd*<sup>2J</sup> se mantiene en la línea congénita C57BL/6J, mientras que el *pcd*<sup>3J</sup> se conserva en la estirpe original de la que se originó, la BALB/cByJ (Fernández-González et al., 2002). Además de estos tres alelos, otros dos, *pcd*<sup>5J</sup> y *pcd*<sup>7J</sup>, se han generado a su vez de forma espontánea, mientras que los alelos *pcd*<sup>4J</sup> y *pcd*<sup>6J</sup> han sido inducidos químicamente y el alelo *pcd*<sup>JWG</sup> es el resultado de la inserción de un transgén (Wang y Morgan, 2007). Los ocho alelos diferentes de la mutación se expresan con características fenotípicas diferentes y de gravedad variable (así, por ejemplo, la mutación *pcd*<sup>2J</sup> presenta una degeneración celular más tardía y con síntomas más atenuados; ver tabla 1; Fernández-González et al., 2002). La mayoría de los estudios publicados emplean la mutación original *pcd*<sup>1J</sup> que es la empleada en la presente Tesis Doctoral.

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, en un segmento genómico de 0,61 ± 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, que presenta 25 exones. El ARNm para el que codifica *nna1* se encuentra reducido o alterado en su estructura (salvo en la mutación *pcd*<sup>5J</sup>), mientras que la expresión de los dos genes que lo flanquean no cambia, al menos en los mutantes *pcd*<sup>1J</sup>, *pcd*<sup>2J</sup> y *pcd*<sup>3J</sup> (Fernández-González et al., 2002). Los niveles de expresión del ARNm de *nna1* varían según el tipo de mutante *pcd*. El mutante *pcd*<sup>1J</sup> no presenta di-

---

<sup>8</sup> del inglés *Purkinje Cell Degeneration*

ferencias 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*<sup>1J</sup> afecta a una secuencia reguladora del gen *nna1* (Fernández-González et al., 2002).

Nombre del alelo	Origen	Cambios fenotípicos y morfológicos	Mutaciones en el gen <i>Nna1</i>
<i>Agtbbp1</i> <sup>pcd</sup>	Espontáneo	Ataxia; degeneración de las células de Purkinje y los granos del cerebelo; degeneración de células mitrales de BO; degeneración de neuronas talámicas; degeneración de fotorreceptores; alteraciones en el esperma; esterilidad en machos; fertilidad parcial en hembras; niveles de ARNm y proteína muy bajos.	Desconocidas (posiblemente en las regiones reguladoras)
<i>Agtbbp1</i> <sup>pcd-2J</sup>	Espontáneo	Posible alelo hipomórfico con desarrollo tardío de ataxia y cierta esterilidad de los machos; niveles bajos de ARNm	Inserción entre los exones 14 y 15
<i>Agtbbp1</i> <sup>pcd-3J</sup>	Espontáneo	Ataxia; degeneración de las células de Purkinje y los granos del cerebelo; degeneración de células mitrales de BO; degeneración de neuronas talámicas; degeneración de fotorreceptores; alteraciones en el esperma; esterilidad en machos; fertilidad parcial en hembras; bajo nivel de ARNm de pequeño tamaño y ausencia de proteína.	Delección de los exones 7, 8 y 9
<i>Agtbbp1</i> <sup>pcd-4J</sup>	Inducción química	Ataxia; degeneración de las células de Purkinje.	Desconocidas
<i>Agtbbp1</i> <sup>pcd-5J</sup>	Espontáneo	Ataxia; degeneración de las células de Purkinje; degeneración de fotorreceptores; esterilidad en machos; niveles normales de ARNm pero ausencia de proteína por inestabilidad.	Inserción de un codón para el ácido aspártico en el exón 18
<i>Agtbbp1</i> <sup>pcd-6J</sup>	Inducción química	Ataxia; degeneración de las células de Purkinje; degeneración de células mitrales de BO; degeneración de raíz ventral de la médula espinal; degeneración retiniana; fibras musculares pequeñas; alteraciones en el esperma; esterilidad en machos; atrofia testicular; bajo nivel de ARNm de pequeño tamaño y ausencia de proteína.	Desconocidas
<i>Agtbbp1</i> <sup>pcd-7J</sup>	Espontáneo	Ataxia; degeneración de las células de Purkinje; hipocampo de gran tamaño; deficiencias auditivas.	Desconocidas
<i>Agtbbp1</i> <sup>pcd-JWG</sup>	Transgénico (disrupción génica aleatoria)	Ataxia; degeneración de las células de Purkinje; degeneración de células mitrales de BO; degeneración de fotorreceptores; alteraciones en el esperma; cierta esterilidad en machos; fertilidad parcial en hembras.	Desconocidas

**Tabla 1.** Resumen de las características de los alelos de la mutación *pcd*. Modificado de Wang et al., 2007

El gen *nna1* codifica para una proteína nuclear llamada Nna1<sup>9</sup> (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 –aunque existen otras dos isoformas de menor tamaño– y, además, se ha detectado una ex-

<sup>9</sup> Del inglés *nervous system nuclear protein induced by axotomy 1*.

presión 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). Por otra parte, la expresión de esta proteína se ha detectado también en otras localizaciones encefálicas como la corteza o el hipocampo (Fernández-González et al., 2002), donde no se han descrito procesos de neurodegeneración, o en otros órganos como en el corazón, los riñones o en el músculo esquelético (Harris et al., 2000), sin que los ratones mutantes *pcd* presenten alteraciones en dichas estructuras.

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. Además, posee una región con actividad carboxipeptidasa cuya falta está implicada en el proceso de neurodegeneración (Wang y Morgan, 2007). Por último, en nuestro laboratorio se han encontrado recientemente evidencias de su participación en la dinámica de los microtúbulos del citoesqueleto (Baltanás et al., enviado). 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***

El efecto de la mutación *pcd* (alelo *pcd<sup>1J</sup>*) es la degeneración posnatal y selectiva de ciertas poblaciones neuronales que presentan expresión del ARNm de Nna1 (Fernández-González et al., 2002). El síntoma más llamativo y que da nombre a esta mutación es la degeneración de las neuronas de Purkinje del cerebelo (hecho que provoca una ataxia cerebelosa muy grave; Mullen et al., 1976). Asimismo, se produce una pérdida de las células mitrales del BO principal (con la consecuente degeneración del tracto olfativo lateral, que contiene los axones de las células mitrales; (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, 1985; O'Gorman y Sidman, 1985).

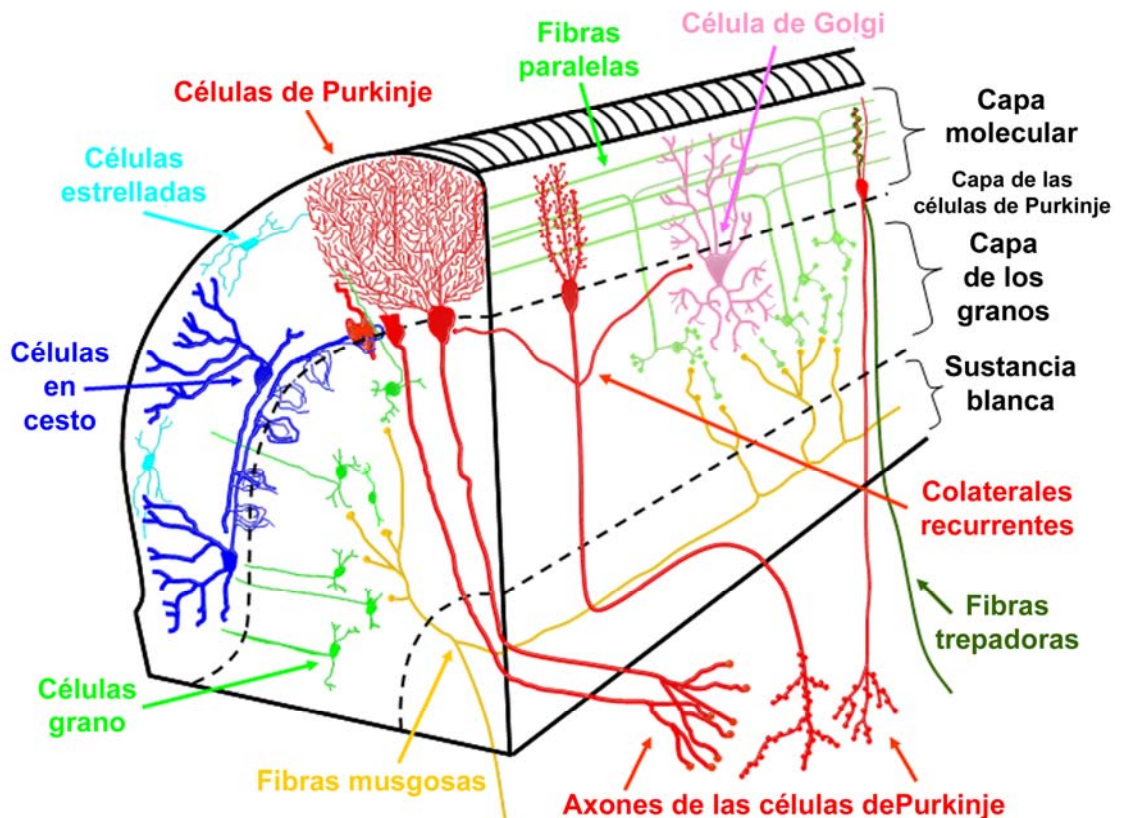
Además, en estos mutantes se produce una degeneración lenta y progresiva de los fotorreceptores de la retina de características similares a una retinosis pigmentaria (Mullen y LaVail, 1975; Blanks et al., 1982). Por otra parte, los ratones PCD machos son estériles, aunque capaces de copular; presentan un espermatozoides escasos, aberrantes y carentes de movilidad. A diferencia, las hembras mutantes son fértiles, aunque presentan serias dificultades en la cría de la escasa descendencia que conciben (Mullen et al., 1976; Handel y Dawson, 1981). Por todo ello, la cría de los animales PCD se vuelve complicada, 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%.

### ***Efectos de la mutación pcd en el cerebelo***

El cerebelo es una región del encéfalo cuya función principal es la integración vías sensitivas y vías motoras. 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 y emocionales (Fine et al., 2002; Schmammann, 2004). 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, ya desde los tiempos de Ramón y Cajal (1911). A lo largo de la historia, el estudio de modelos animales de lesión cerebelosa, de pacientes aquejados de daños en esta región y, más recientemente, el análisis de los diferentes mutantes cerebelosos ha aumentado la comprensión sobre la organización y la fisiología del cerebelo (Fine et al., 2002). Antes de detallar los efectos de la mutación *pcd* en esta región, consideramos necesario introducir una serie de conceptos sobre su estructura y organización.

## Citoarquitectura del cerebelo

Macroscópicamente, el cerebelo se puede dividir en una porción medial, el denominado vermis, y en dos hemisferios laterales. A su vez, el cerebelo de todos los mamíferos consta de diez lóbulos separados por las correspondientes fisuras (Sillitoe y Joyner, 2007). La corteza cerebelosa se encuentra dispuesta en pliegues denominados láminas cerebelosas o *folia cerebelli*. Cada una de ellas está constituida por tres capas que se denominan -desde la parte más superficial a la más interna- capa molecular, capa de las células de Purkinje y capa de los granos (figura 3).



**Figura 3.** Esquema de la corteza cerebelosa con sus capas y sus tipos celulares principales.

La capa molecular presenta una alta densidad de fibras de diferentes tipos neuronales pero pocos somas celulares, de manera que las únicas neuronas propiamente dichas que se encuentran en esta capa son las células estrelladas y las células en cesto (figura 3; Voogd y Glickstein, 1998).

La capa de las células de Purkinje recibe el nombre del tipo celular mayoritario que la constituye, si bien en esta capa también se encuentran las de-

nominadas células en candelabro (figura 3; Laine y Axelrad, 1994) y los somas de la glía de Bergmann (Voogd y Glickstein, 1998). Las células de Purkinje son las únicas neuronas eferentes de la corteza cerebelosa y se disponen formando una monocapa, siendo su forma y tamaño bastante homogéneos a lo largo de todo este estrato. Las células de Purkinje extienden sus grandes árboles dendríticos en dos planos muy próximos en la capa molecular y envían sus axones hacia núcleos profundos del cerebelo. En el ratón, estas células 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). La glía de Bergman desempeña un papel fundamental en esta migración y en la correcta localización de estas neuronas (Voogd y Glickstein, 1998). Hacia los 18 días de vida postnatal (P18), las células de Purkinje reciben sus aferencias sinápticas y desarrollan su morfología madura hacia la mitad de la tercera semana de vida postnatal del ratón (Landis y Mullen, 1978).

La capa más interna de la corteza cerebelosa es la capa de los granos, constituida por una numerosa población de estas pequeñas interneuronas y de otras interneuronas: células de Golgi, células de Lugaro y células unipolares en cepillo (figura 3; Sillitoe y Joyner, 2007). Los granos son el tipo neuronal más abundantes del SNC, presentan cortas dendritas en forma de garra y envían sus axones hacia la capa molecular, donde se bifurcan formando las denominadas fibras paralelas (Voogd y Glickstein, 1998), perpendiculares a su vez a los árboles dendríticos de las células de Purkinje. 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).

## **Sinaptología de los circuitos cerebelosos**

La corteza cerebelosa recibe tres tipos de aferencias externas: las fibras musgosas, las fibras trepadoras (ambas excitatorias) y otras aferencias monoaminérgicas y colinérgicas difusas (Voogd y Glickstein, 1998). Las fibras musgosas, con origen en múltiples regiones del SNC, llegan hasta la capa de los granos y hacen sinapsis sobre algunos de éstos formando estructuras complejas denominadas glómérulos (Voogd y Glickstein, 1998; Sillitoe y Joyner,



2007). Las fibras trepadoras, procedentes del complejo olivar inferior, discurren por las ramas de las dendritas principales de las células de Purkinje y hacen contacto sináptico en sus espinas (Voogd y Glickstein, 1998).

Las células de Purkinje reciben otros contactos sinápticos. En primer lugar, las fibras paralelas realizan sinapsis glutamatérgicas (activadoras) directamente sobre las espinas dendríticas de las células de Purkinje y, además, sobre las células estrelladas, las células en cesto y las células de Golgi (Landis y Mullen, 1978; Voogd y Glickstein, 1998). Por otra parte, las células en cesto sinaptan sobre el soma de la célula de Purkinje mientras que las células estrelladas forman sinapsis en el tronco de sus dendritas principales (Voogd y Glickstein, 1998). Ambas sinapsis son GABAérgicas y constituyen un circuito de “feed-forward” inhibitorio de las células de Purkinje (Voogd y Glickstein, 1998). Las células de Golgi, activadas por las sinapsis de los granos, realizan a su vez contactos sinápticos con los mismos, constituyendo un circuito de retroalimentación inhibitorio. Las células de Golgi co-expresan, además, los neurotransmisores inhibitorios GABA y glicina, a diferencia de las interneuronas mencionadas anteriormente (células estrelladas y células en cesto), que son únicamente GABAérgicas (Voogd y Glickstein, 1998). Finalmente, los axones de las células de Purkinje, únicas eferencias del cerebelo, 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 (Voogd y Glickstein, 1998; Sillitoe y Joyner, 2007).

A modo de resumen y para facilitar su comprensión, podemos dividir los contactos sinápticos del cerebelo en tres circuitos:

1. Las fibras musgosas activan a los granos, cuyas fibras paralelas realizan sinapsis excitatorias sobre las células de Purkinje, las células estrelladas y las células en cesto. Las células estrelladas y en cesto a su vez inhiben a las células de Purkinje. Finalmente, las células de Purkinje envían sinapsis inhibitorias a los núcleos cerebelosos profundos (Fig. 4 a).
2. Las fibras trepadoras excitan a las células de Purkinje, con su consiguiente sinapsis inhibitoria sobre los núcleos cerebelosos profundos (Fig. 4 b).

3. Los granos, activados por las fibras musgosas, excitan mediante las fibras paralelas a las células de Golgi, que a su vez inhiben a los granos (Fig. 4 c).

Por tanto, la actividad de las células de Purkinje es fundamentalmente inhibir los núcleos cerebelosos profundos, lo cual se modula por el equilibrio entre la actividad de las fibras musgosas-granos y de las fibras trepadoras. El resto de interneuronas sirven para modular finalmente y de manera indirecta este equilibrio.

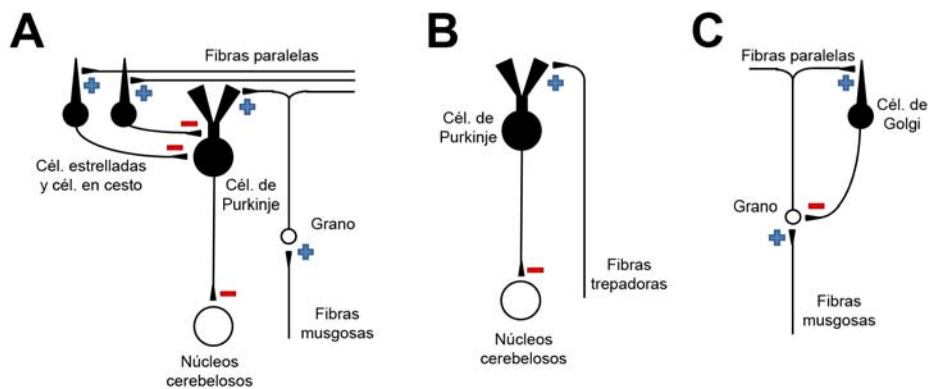


Figura 4. Representación esquemática de los principales circuitos cerebelosos.

## Neurodegeneración *pcd* en el cerebelo

El número de células del organismo es ajustado mediante procesos de apoptosis durante el desarrollo y a lo largo de la vida postnatal, y el SNC no es una excepción. 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 postnatal, tanto en ratones silvestres como en 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. Sin embargo, en los animales PCD la muerte celular todavía continúa a esa edad, hasta que concluye la degeneración casi total de esta población neuronal (Zhang et al., 1997), mostrando sus células de Purkinje formaciones de cromatina condensada, rasgo característico de las células en proceso de apoptosis (Landis y Mullen, 1978). Asimismo, las células de Purkinje de animales PCD presentan la enzima caspasa 3 activada, 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 ya hay importantes evidencias de degeneración en torno a P18: restos de somas de células de Purkinje en la capa correspondiente y procesos dendríticos alterados en la capa molecular (Baltanás et al., 2010). 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 debido a la pérdida de los árboles dendríticos (Mullen, 1976). Sin embargo, esta neurodegeneración no es regular a lo largo de todo el cerebelo. La pérdida de células de Purkinje comienza en el vermis, extendiéndose hacia los hemisferios, y además es menos grave en zonas más ventrales del cerebelo (Landis y Mullen, 1978; Wang y Morgan, 2007). Específicamente, en el lóbulo X del cerebelo de animales mutantes de P24 tan sólo el 20% de las células de Purkinje ha degenerado (Landis y Mullen, 1978) y a P29, numerosas células de Purkinje están todavía presentes en este lóbulo, flóculos, paraflóculos y zona ventral de la *úvula* (lóbulo IX). A pesar de ello, a las 5 semanas de vida sólo unas cuantas células de Purkinje persisten en el lóbulo X, flóculos y paraflóculos. La supervivencia de las células de Purkinje a las 7 semanas es muy escasa, y se encuentran mayoritariamente en el lóbulo X, 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; Kyuhou et al., 2006; Wang y Morgan, 2007). A esta edad, la mayor parte de los restos de esta neurodegeneración ya han sido eliminados por elementos microgliales (Landis y Mullen, 1978). Aunque hay que tener en cuenta que la microglía puede desempeñar un papel notable en el proceso apoptótico al promover, 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; Baltanás et. al. enviado). Finalmente, la capa molecular, donde se localizan las dendritas de las células de Purkinje, 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; Baltanás et. al. enviado).

Como consecuencia de la degeneración primaria de las células de Purkinje, se produce una degeneración secundaria de otros elementos neuronales del cerebelo de los ratones PCD. Por una parte, se origina una degeneración retrógrada que afecta a más del 90% de los granos del cerebelo, al menos hasta los 6 meses de edad (Wang y Morgan, 2007), muriendo principalmente por apoptosis (Zhang et al., 1997). Curiosamente, no se aprecia una reducción llamativa del número de otras interneuronas como las células de Golgi tipo II en la capa de los granos (Mullen et al., 1976). La desaparición de las dianas de las aferencias cerebelosas provoca una muerte neuronal retrógrada de alrededor del 50% de las neuronas del complejo olivar inferior (Ghetti et al., 1987; Triarhou y Ghetti, 1991), origen fundamental de las fibras trepadoras (Voogd y Glickstein, 1998). Por último, se produce una degeneración anterógrada que causa 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% (Triarhou et al., 1987; Baurle et al., 1997).

### **Alteraciones citológicas y sinaptológicas de las células de Purkinje del ratón PCD**

Los ratones mutantes PCD presentan ciertas alteraciones ultraestructurales tanto en el desarrollo de las células de Purkinje como en el estado maduro. Estas alteraciones aparecen antes de que se produzca la pérdida neuronal, aunque están claramente relacionadas con la misma, por lo que se puede hablar de una *pre-neurodegeneración* (Valero et al., 2006; Baltanás et al., 2010).

En condiciones normales, los animales silvestres de entre P10 y P12 presentan una gran acumulación de ribosomas libres en la parte basal de las células 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 orgánu-

los 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). Asimismo, se han observado prolongaciones de retículo endoplasmático rugoso que convergen en una cisterna central dilatada y carente de polisomas (Landis y Mullen, 1978). Al igual que en el ejemplo anterior, esta configuración inusual del retículo endoplásmico rugoso es normal en las células de Purkinje inmaduras pero en las células de Purkinje de los ratones mutantes PCD se mantiene hasta su completa degeneración. Además, las células de Purkinje del mutante PCD presentan cisternas de retículo endoplásmico dilatadas y sin polisomas, que se continúan con retículo endoplásmico rugoso normal (Landis y Mullen, 1978). Estos cambios ultraestructurales observados inicialmente en el sistema de endomembranas han sido corroborados con posterioridad a nivel celular y molecular (Kyuhou et al., 2006; Baltanás et al., 2010). En estos trabajos se ha demostrado, por una parte, la implicación del estrés asociado a las alteraciones del retículo endoplasmático en los procesos neurodegenerativos que tienen lugar en las células de Purkinje de ratones mutantes PCD (Kyuhou et al., 2006). Por otra parte, se ha descrito que las alteraciones ultraestructurales se agravan a medida que la neurodegeneración avanza, de manera que los polirribosomas se acaban disociando en monorribosomas, a su vez englobados en cisternas aisladas de retículo endoplásmico, formando autofagosomas (Baltanás et al., 2010).

El origen de las alteraciones ribosómicas se debe a alteraciones nucleolares. La mutación *pcd* induce daños acumulativos en el ADN de las células de Purkinje que provocan un progresivo silenciamiento génico y heterocromatinización (Baltanás et al., 2010). Los cambios en el núcleo celular son particularmente evidentes en el nucleolo, que presenta una alteración progresiva de los componentes fibrilar y granular (Baltanás et al., 2010). Finalmente, esta desestructuración del nucléolo repercute en la síntesis de ribosomas y en la maquinaria transcripcional de las células de Purkinje.

Otras alteraciones de los somas de las células de Purkinje de animales mutantes PCD son los denominados nematosomas, inclusiones citoplasmáticas

formadas por gruesos filamentos de material fibrilar condensado sobre una matriz menos densa (Grillo, 1970). Los 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). Asimismo, las dendritas de las células de Purkinje de los ratones PCD presentan unos engrosamientos anormales denominados *torpedos*, relacionados con alteraciones en las sinapsis (Baltanás et al., 2010).

Las células de Purkinje de los ratones mutantes PCD a P15 parecen haber completado satisfactoriamente la mayor parte de su programa de desarrollo, presentando colaterales axónicas que forman sinapsis (Landis y Mullen, 1978). Además, la extensión y características de sus procesos dendríticos parecen normales y las fibras aferentes correspondientes (axones de células estrelladas y en cesto, fibras trepadoras y fibras paralelas) forman y mantienen las sinapsis características con estas células (Landis y Mullen, 1978). Sin embargo, a P18 las espinas dendríticas de las células de Purkinje de los ratones PCD carecen de elemento pre-sináptico y están envueltas por procesos gliales. Y sin embargo, muchas de las espinas presentan engrosamientos en la membrana que asemejan elementos postsinápticos (Landis y Mullen, 1978). 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 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 de la muerte neuronal y de la recuperación anatómica y funcional tras dicha lesión. 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). Como veremos más adelante, los estudios relacionados con la recuperación funcional de los ratones mutantes PCD se han centrado casi exclusivamente 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.

### ***Trasplantes celulares***

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 demostrado cómo el trasplante de primordios de cerebelo de ratones silvestres en ratones mutantes PCD, tanto en suspensiones celulares, como en implantes sólidos (Sotelo y Alvarado-Mallart, 1986, 1987; Chang y Ghetti, 1993; Triarhou et al., 1995; Zhang et al., 1996), pueden atenuar los síntomas del fenotipo PCD. Las células trasplantadas migran hacia una posición adecuada, reciben contactos sinápticos desde neuronas adultas del receptor y presentan interacciones y propiedades moleculares similares a las que tienen lugar durante el desarrollo normal (Sotelo y Alvarado-Mallart, 1987; Zhang et al., 1996; Wang y Morgan, 2007). 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 analizada, 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).

También se han realizado trasplantes de células progenitoras de cerebelos de embriones en animales PCD adultos, es decir, una vez finalizada la neurodegeneración (Carletti y Rossi, 2005). En este caso, se ha demostrado que la pérdida selectiva de esa determinada población neuronal favorece la diferen-

ciación de las células trasplantadas a células de Purkinje, en detrimento de otros tipos celulares (Carletti y Rossi, 2005).

### **Prevención de la neurodegeneración**

Los estudios dirigidos a la prevención del proceso degenerativo de las células de Purkinje en ratones PCD se han desarrollado mediante dos estrategias. Por una parte, se han aplicado agentes neuroprotectores tanto *in vivo* como *in vitro*. *In vivo*, los implantes de microsferas de factor de crecimiento insulínico de tipo 1 (IGF-I)<sup>10</sup>, que presenta propiedades neuroprotectoras (Carro et al., 2001), demostraron una mejoría de la coordinación motora durante el tiempo en que se mantuvo la terapia (Carrascosa et al., 2004). *In vitro*, se demostró que la mifepristona (esteroide sintético, también denominado RU486, con propiedades antioxidantes) en cultivos organotípicos de corteza cerebelosa de ratones mutantes PCD de P0 reduce la muerte de las células de Purkinje, al menos durante 4 semanas (Ghoumari et al., 2003).

La otra estrategia preventiva implica la manipulación genética de las vías de muerte celular en un fondo genético *pcd*. En este caso, se han generado diferentes ratones *knock-out* para diferentes moléculas implicadas en la vía apoptótica que implica la activación de la caspasa-3. Mediante esta aproximación, no se ha conseguido disminuir la muerte de las células de Purkinje de los animales PCD, aunque sí la neurodegeneración secundaria de los granos. Aunque estos resultados no han sido del todo satisfactorios, sí han aportado nuevos datos sobre el papel de distintas moléculas implicadas en la ruta de señalización ante el proceso neurodegenerativo del cerebelo de este animal (Wang y Morgan, 2007).

### **Efectos de la mutación *pcd* en el bulbo olfativo**

El bulbo olfativo principal es una estructura laminada que presenta una distribución ordenada de sus tipos neuronales y de sus circuitos sinápticos (Ramón y Cajal, 1911; Greer y Halász, 1987; Crespo et al., 2006). Su estructura básica es común para todos los vertebrados, aunque existen variaciones a lo largo de la escala filogenética (Baltanás et al., 2007). Además, el BO, en rela-

---

<sup>10</sup> Del inglés *Insulin-like Growth Factor-1*

ción con la ZSV, es una de las dos regiones neurogénicas de los vertebrados adultos (Altman, 1969; Lois y Álvarez-Buylla, 1993; Doetsch et al., 1997, 2003; Carleton et al., 2003). Los neuroblastos generados en la ZSV que migran a través de la CMR tienen como destino principal el BO donde se diferenciarán en interneuronas asegurando la correcta reposición de las mismas a lo largo de la vida (Carleton et al., 2003; Mouret et al., 2009). Teniendo en cuenta su organización estructural bien definida y sus características neurogénicas, el BO es una de las estructuras encefálicas más empleadas en estudios de degeneración neuronal, de neurogénesis adulta, de sinaptología o de trazado de vías nerviosas.

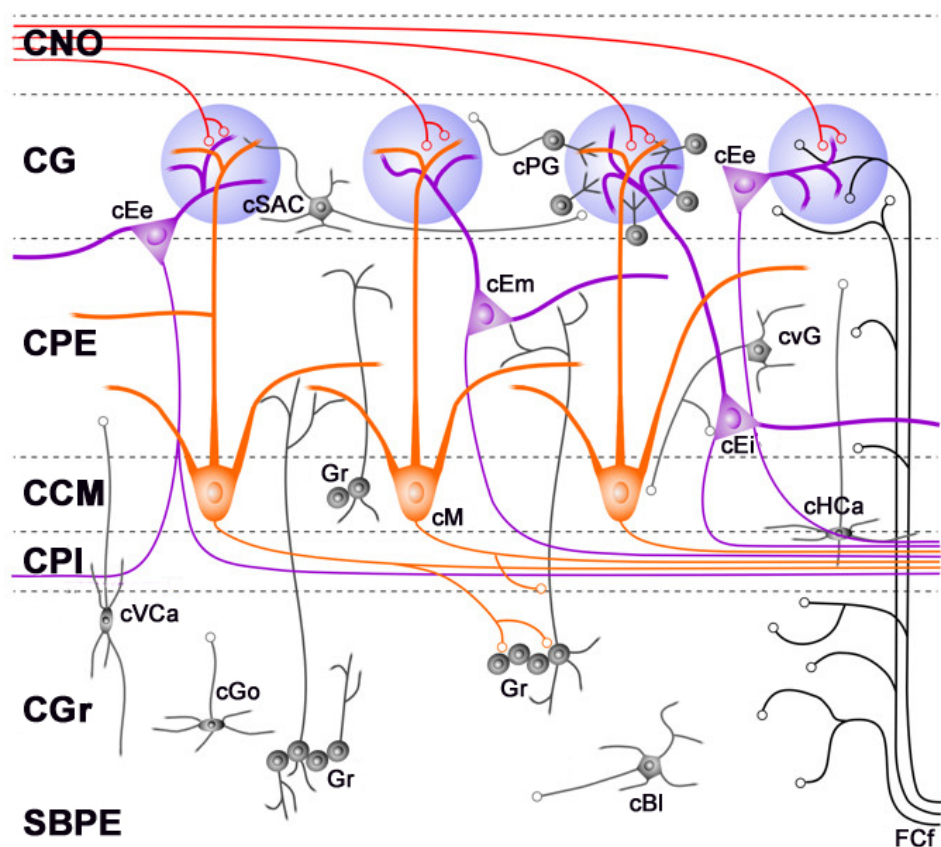
## Organización del bulbo olfativo principal

El BO consta de siete capas concéntricas (figura 5), que de la parte más externa a la más interna se denominan: capa del nervio olfativo (CNO), capa glomerular (CG), capa plexiforme externa (CPE), capa de las células mitrales (CCM), capa plexiforme interna (CPI), capa de los granos (CGr) y sustancia blanca periependimaria (SBPE; Petreanu y Álvarez-Buylla, 2002; Carleton et al., 2003; Baltanás et al., 2007).

La capa más superficial del BO es la CNO, que contiene los axones amielínicos procedentes de las neuronas receptoras del epitelio olfativo rodeados por células gliales y sus prolongaciones (Pinching y Powell, 1971).

Por debajo de la CNO se extiende la CG, formada por unidades funcionales independientes denominadas glomérulos (figura 5). Los glomérulos son estructuras esferoidales ricas en neuropilo rodeadas por una cápsula de pequeñas neuronas (células periglomerulares) y células gliales. Estas células periglomerulares, junto con las células superficiales de axón corto (ambas interneuronas) y las células empenachadas externas (neuronas de proyección) se denominan en conjunto neuronas yuxtglomerulares, por su proximidad a los glomérulos. En estas estructuras, los axones procedentes de las neuronas receptoras olfatorias hacen sinapsis sobre las dendritas apicales de las neuronas yuxtglomerulares, así como sobre las dendritas de las células mitrales y otras células empenachadas, ambas neuronas de proyección primaria (Pinching y Powell, 1971).





**Figura 5.** Organización laminar del bulbo olfativo. 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 olfativo. 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 perependimaria. Esquema modificado de Puche, 2003 (<http://www.apuche.org/OIA/>).

Inmediatamente por debajo de la CG está la 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 medias e internas y de granos (Orona et al., 1984; Crespo et al., 2006). Los principales tipos neuronales en este estrato son las células de Van Gehuchten y las células empenachadas medias e internas (Kosaka et al., 1994; Crespo et al., 2006). Las células empenachadas junto con las células mitrales son, como neuronas de proyección, las encargadas de transmitir la información olfativa a otras regiones cerebrales fuera del BO (Crespo et al., 2006; Recio et al., 2007).

Las células mitrales son las principales neuronas de proyección del BO y sus somas se encuentran formando una monocapa, la CCM, situada a mayor



profundidad que la CPE (Shepherd, 1972). Junto a las células mitrales pueden disponerse algunas células empenachadas internas de la parte más interna de la CPE, llegando en ocasiones a confundirse ambos tipos celulares. Por este motivo, en algunos casos, las dos clases de neuronas de proyección se denominan conjuntamente células principales.

Justo por debajo de la CCM se sitúa la 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 o fibras centrífugas (McLean y Shipley, 1987a, b; Crespo et al., 2006).

A continuación se localiza la CGr, que es la capa más extensa del BO. Como su propio nombre indica, el tipo celular mayoritario de esta capa son los granos, pequeñas neuronas sin axón (Ramón y Cajal, 1911), entre las que discurren axones miélnicos de otros tipos celulares del BO. 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 (Pinching y Powell, 1971; Schneider y Macrides, 1978; Kosaka et al., 1994; Crespo et al., 2006).

La capa más profunda del bulbo olfativo se denomina de diversas maneras en función de la finalidad del estudio realizado: sustancia blanca periependimaria (SBPE), zona subependimal del bulbo olfativo o la extensión de la corriente migratoria rostral en el bulbo olfativo (CMR-BO). Por ella transcurren gran parte de las fibras aferentes y eferentes del bulbo olfativo que, junto con la sustancia blanca dispersa en la capa de los granos, convergen para formar el tracto olfativo lateral en la zona caudal de este órgano (Price y Sprich, 1975; Recio et al., 2007). Asimismo, los neuroblastos migratorios de la CMR - originados en la ZSV- llegan a esta capa del BO (Lois et al., 1996; Doetsch et al., 1997; Doetsch, 2003), a partir de donde comenzarán una nueva migración radial para finalmente diferenciarse en interneuronas de las CGr, CPE y CG, principalmente (Carleton et al., 2003).

El desarrollo embrionario del BO del ratón comienza alrededor de E12, cuando los axones de las neuronas receptoras olfatorias llegan a las vesículas telencefálicas en desarrollo (López-Mascaraque y De Castro, 2002; García-Marqués et al., 2006). El contacto estimula un pequeño crecimiento desde el telencéfalo rostral que originará el primordio del bulbo olfativo, y parece inducir el inicio de la neurogénesis en la zona ventricular (Farbman, 1992; García-Marqués et al., 2006). 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; García-Marqués et al., 2006) 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 tres primeras semanas de vida tras el nacimiento (Farbman, 1992).

### **Neurodegeneración en el bulbo olfativo**

Hasta aproximadamente los dos meses de edad, los ratones mutantes PCD presentan una organización histológica y sináptica normal del BO (Greer y Shepherd, 1982). Sin embargo, hacia los 50 días postnatales comienzan a observarse cambios estructurales en las células mitrales. A los 70 días es posible detectar una reducción moderada de su densidad y a los 90 días postnatales tan sólo quedan unas cuantas células mitrales, muchas de las cuales se encuentran en proceso de degeneración (Valero et al., 2006). Así pues, durante este periodo (P50-P90) degeneran entre un 70 y un 75% de las células mitrales, quedando las células supervivientes dispuestas en pequeños grupos (Greer y Shepherd, 1982; Valero et al., 2007). A partir de P90, la degeneración continúa, pero más lentamente, quedando un 20% de células mitrales a los 4 meses de edad y un 4% a los 8 meses (Greer y Shepherd, 1982). No se han observado efectos directos sobre otras poblaciones neuronales del BO (Greer y Shepherd, 1982).

A pesar de la pérdida de las células mitrales, la actividad de los glomérulos del BO de los ratones PCD parece ser normal. Tampoco se han observado alteraciones en los axones del nervio olfativo, de manera que las neuronas re-

ceptoras olfatorias podrían responder a olores de forma similar a los controles (Greer y Shepherd, 1982). Con el método de la 2-desoxiglucosa 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 olfativo en los ratones PCD hace posible la interacción sináptica funcional entre las neuronas receptoras olfatorias y las células de proyección supervivientes entre las que se encuentran todas las células empenachadas (Greer y Shepherd, 1982).

La pérdida de las células mitrales de los ratones PCD es selectiva, de manera que no existe una degeneración aparente de las poblaciones de células empenachadas, lo que sugiere diferencias genéticas entre los dos tipos de neuronas de proyección (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 olfativo 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 olfativa a nivel glomerular como a las capas inframitrales. Al mismo tiempo, se produce un proceso plástico de reorganización sináptica durante el cual las células denervadas establecen nuevos circuitos sinápticos heterólogos con las neuronas de proyección persistentes (Greer y Halász, 1987; Baker y Greer, 1990).

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 es menor en comparación con el de los animales silvestres. Esta reducción se debe a la pérdida de los penachos de las dendritas apicales de células mitrales, que se extienden originalmente en el interior glomerular (Greer y Shepherd, 1982). Por el contrario, las poblaciones de células periglomerulares o la supervivencia de los precursores neuronales que llegan a esta capa no se ven afectadas muy dramáticamente (Baker y Greer, 1990; Valero et al., 2007). El cambio más llamativo se produce en la CPE, ya que su grosor disminuye considerablemente en los ratones 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, siendo la parte más afectada de la capa (Halász et al., 1981). Por otra parte, al disminuir el grosor total de esta capa, la densidad celular aumenta (Greer y Shepherd, 1982). En cuanto a la CPI de los animales mutantes, parece aumentar su grosor, probablemente debido a la desaparición de la capa de las células mitrales (Greer y Shepherd, 1982). Asimismo, en esta capa existen algunos granos desplazados que parecen ocupar el espacio dejado por las células mitrales, aunque su número no difiere del de los ratones silvestres (Greer y Shepherd, 1982). Finalmente, 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 (Valero et al., 2007). La mutación *pcd* no afecta a la migración tangencial de los neuroblastos de la CMR, pero sí a su migración radial en el BO. Este cambio provoca una disminución del número de células de nueva generación que se incorporan a la CGr (Valero et al., 2007). Dicha alteración, sumada a un aumento de la apoptosis en esta capa, explican la disminución del número de sus células (Valero et al., 2007).

Por último, la desaparición de los axones de las células mitrales conlleva también una degeneración extensa del tracto olfativo lateral, que 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). Asimismo, se produce una reorganización de las proyecciones aferentes al BO (centrífugas), con un aumento de las proyecciones ipsilaterales en detrimento de las contralaterales, especialmente en lo que respecta a los terminales zincérgicos (Recio et al., 2007; Airado et al., 2008). En los centros de integración de la información olfativa de los ratones PCD también se producen cambios, al denervarse a causa de la degeneración. Así, por ejemplo, la capa I de la corteza piriforme experimenta una reducción de un 20 a un 25% de su grosor (Bartolomei y Greer, 1998).

## Alteraciones citológicas de las células mitrales del bulbo olfativo principal

La mutación *pcd*<sup>1J</sup> provoca en las células mitrales del BO la activación de una serie de mecanismos apoptóticos similares a los producidos en las células de Purkinje afectadas por dicha mutación (Kyuhou et al., 2006). Al igual que en las células de Purkinje (Baltanás et al., 2010), en las células mitrales de los ratones PCD se produce una serie de eventos que refleja un estado pre-degenerativo previo a los signos citológicos clásicos de muerte celular (Valero et al., 2006, 2007). Así pues, se ha detectado la formación de focos de daño y reparación del ADN en relación con la inhibición de la transcripción, la progresiva heterocromatinización y la reorganización de los compartimentos nucleolares. Estas alteraciones nucleares revierten en la desorganización de las cisternas del retículo endoplásmico rugoso y de los ribosomas (Valero et al., 2006).

La mutación *pcd*<sup>1J</sup> induce –o al menos no previene– la acumulación de focos de daño en el ADN de las células mitrales. Esto parece ser debido a la pérdida de expresión del gen *wna1*. 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; Djuriscic 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 (Valero et al., 2006). La formación de focos de daño y reparación del ADN en las células mitrales de los mutantes PCD demuestra una respuesta inicial para la reparación del material genético. Sin embargo, la acumulación gradual de estos focos acompañada de la pérdida progresiva de las células mitrales, demuestra la incapacidad de estas neuronas para desarrollar una respuesta de reparación genética eficaz (Valero et al., 2006). La acumulación de focos de daño en el ADN en las células mitrales de los ratones mutantes PCD se asocia a una formación creciente de masas de heterocromatina, en relación con una represión transcripcional progresiva (Valero et al., 2006). Esta represión transcripcional se considera como uno de los mecanismos celulares de protección frente al estrés (Valero et al., 2006).

Paralelamente a estas modificaciones de la cromatina, la mutación *pcd*<sup>1J</sup> causa alteraciones en la estructura del nucleolo de las células mitrales (segregación de los componentes nucleolares, desorganización de los centros fibrilares o reorganización de los cuerpos de Cajal (Valero et al., 2006). Estas modificaciones estructurales se asocian con una disfunción grave de la transcripción nucleolar que terminará con la alteración en la biogénesis de los ribosomas. En consecuencia, se produce la desorganización del retículo endoplasmático rugoso, previamente descrita en las células de Purkinje de los mutantes PCD (Landis y Mullen, 1978), que refleja la existencia de una maquinaria transcripcional deficiente.

La muerte de las células mitrales en los ratones PCD tiene lugar mediante mecanismos apoptóticos (Greer y Shepherd, 1982; Valero et al., 2006). Esta muerte “controlada” contribuye, en cierto modo, a que no se induzca directamente la muerte de otras células adyacentes. Además, la degeneración de las células mitrales de los ratones PCD es más lenta y está retardada en comparación con la muerte de las células de Purkinje. Este hecho está relacionado con una menor reacción glial que la que se produce en el cerebelo (Zhang et al., 1997; Baltanás et al., enviado). La relativa lentitud del proceso degenerativo permite al BO mantener una organización citoarquitectónica relativamente normal conservando todas sus capas aunque afectadas en mayor o menor medida (Valero et al., 2007).

## **Ensayos para subsanar la pérdida de las células mitrales del bulbo olfativo 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, apenas 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 (Wang y Morgan, 2007), a excepción de un estudio pionero realizado en nuestro laboratorio (Recio, 2008; Recio et al., 2011), en el que se analizó la llegada de las CDMO tanto al BO como al cerebelo de los ratones PCD, como dos regiones con diferentes estados de

degeneración, y se realizó una primera aproximación a la terapia celular. Basándonos en estos resultados previos, esta Tesis Doctoral está dirigida a estudiar el intento de recuperar los daños tanto funcionales como histológicos relacionados no sólo con el cerebelo, sino también con el BO y avanzar en el empleo de las CDMO como herramienta terapéutica.





# Justificación y objetivos

*"Sólo comprendemos aquellas preguntas que podemos responder."*

*Nietzsche*



La sorprendente plasticidad de las células madre, en concreto de las células madre de la médula ósea, ha quedado notablemente demostrada. La llegada e integración de las CDMO al encéfalo también ha sido probada empleando diferentes aproximaciones. Asimismo, en un trabajo previo de nuestro laboratorio (Recio, 2008) se utilizó al ratón mutante PCD para estudiar la llegada de estas CDMO a un encéfalo en proceso de neurodegeneración. En dicho trabajo, se puso a punto la metodología necesaria para realizar el trasplante de médula ósea de la forma más eficaz, desde el establecimiento de las colonias de ratones necesarias, hasta la optimización de los métodos de detección de las CDMO en el encéfalo de los ratones receptores. Se demostró la presencia de tipos neurales derivados de la médula ósea y se hizo una aproximación hacia la aplicación de este tipo de trasplante para el desarrollo de una posible terapia celular.

La presente Tesis Doctoral supone un paso más en esta línea de investigación dedicada a la búsqueda de una terapia celular efectiva para la paliación de procesos neurodegenerativos. Como objetivos concretos se proponen:

- I. Realizar trasplantes de médula ósea sana en ratones mutantes y silvestres utilizando medios de ablación de la médula de los animales receptores tanto físicos como químicos. Comparar ambos métodos de ablación.
- II. Realizar un seguimiento de la incorporación progresiva de las células trasplantadas en los animales receptores para determinar el éxito del trasplante.
- III. Analizar los mecanismos de plasticidad responsables de la integración de las células derivadas de la médula ósea en el encéfalo.
- IV. Estudiar la influencia de la mutación PCD (*Purkinje Cell Degeneration*) en la incorporación de elementos de la médula ósea. Realizar un estudio cuantitativo de esta integración en el cerebelo y en el bulbo olfativo.
- V. Estudiar el comportamiento y la fisiología de los animales trasplantados, con especial hincapié en ciertas funciones motoras y olfativas.

- VI. Estudiar posibles efectos secundarios de la metodología del trasplante de médula ósea en las regiones neurogénicas rostrales del encéfalo del ratón.
- VII. Realizar un estudio aproximativo de los niveles de estrés oxidativo y de neuroprotección en la sangre, por medio del análisis de los valores de glutatión e IGF-I en los grupos experimentales estudiados.

Como resultado de todos estos objetivos parciales, y como objetivo general de esta Tesis Doctoral, se propone conseguir una recuperación estructural y funcional en dos regiones encefálicas afectadas de neurodegeneración: el bulbo olfativo y el cerebelo.

La consecución de estos objetivos supondrá un mayor conocimiento de la aplicación de las células madre de la médula ósea como herramienta para la paliación de enfermedades neurodegenerativas y el desarrollo de futuras terapias regenerativas.

# Material y métodos

*"Si tu intención es describir la verdad, hazlo con sencillez y la elegancia déjasela al sastre."*

*Albert Einstein*



## Animales de experimentación

La especie utilizada para la realización de la presente Tesis Doctoral es 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, EEUU. Se utilizaron animales provenientes del cruce de algunas de estas estirpes entre sí: C57BL/6J X DBA/2J y C57BL/6J X BALB/c-Tg(CMV-cre)1Cgn/J, así como animales descendientes de esos dos cruces entre sí: (C57BL/6J X DBA/2J) X (C57BL/6J X BALB/c-Tg(CMV-cre)1Cgn/J).

Las distintas colonias establecidas para la realización de esta Tesis Doctoral se generaron y mantuvieron en el Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Salamanca y en el animalario del Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia. Los animales se mantuvieron a temperatura y humedad relativa constantes, con un fotoperiodo artificial de 12/12 horas, y se alimentaron *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 mantuvieron, manipularon y sacrificaron según las líneas establecidas en la legislación europea (86/609/ECC, directiva 2003/65/CE) y española (RD 1201/2005, ley 32/2007) vigentes para el uso y cuidado de animales de laboratorio. Todos los procedimientos fueron aprobados por el comité de Bioética de la Universidad de Salamanca.

### **Animales receptores: la colonia PCD-R26R**

La mutación *pcd* empleada en este trabajo es la mutación original, denominada *pcd*<sup>1J</sup> 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 relacionadas con la fertilidad 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 +/*pcd*, fenotípicamente indistinguibles de los sil-

vestres (+/+). Para solventar el problema con la identificación de los animales +/pcd se contó con la colaboración del Dr. Jean-Louis Guénet (Laboratorio de Genética de Mamíferos, Instituto Pasteur de París). De esta manera, la tipificación genética se llevó a cabo usando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar marcadores moleculares adecuados, basados en polimorfismos diferenciales de ciertas secuencias microsatélites (ver más adelante). Para poder llevar a cabo esta identificación del genotipo, se cruzaron ratones macho de la estirpe C57BL/6J heterocigotos para la mutación *pcd*<sup>1J</sup> con hembras silvestres de la estirpe DBA/2J. De esta manera, se consiguió asociar el alelo *pcd*<sup>1J</sup> al fondo genético del cromosoma 13 de la estirpe C57BL/6J, mientras que el alelo silvestre quedó asociado 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 originalmente portadora de la mutación (C57BL/6J).

El gen reportero procarriota *lacZ* se introdujo en la colonia PCD para poder llevar a cabo la detección de posibles eventos de fusión entre las CDMO trasplantadas y las células de los animales receptores. Para ello se cruzaron ratones (+/*pcd*) de la colonia PCD, con animales homocigotos (*lac/lac*) para el gen *lacZ* de

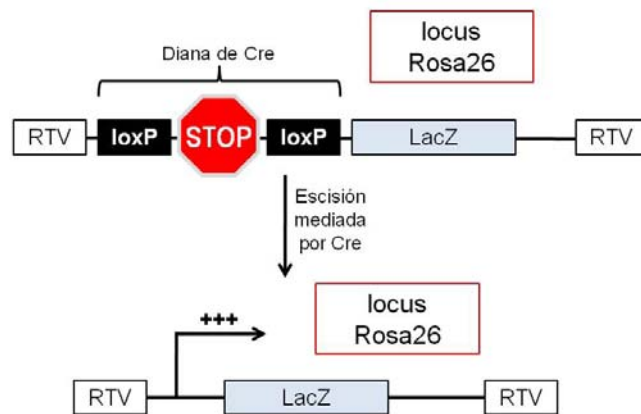


Figura 6. Esquema del sistema Cre-loxP asociado al gen *lacZ*.

la línea R26R (Mao et al., 1999; Recio, 2008). Los animales R26R contienen 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 6). Se dice que una secuencia genética está “floxeada” cuando se encuentra flanqueada por otras dos secuencias llamadas *Lox-P*, y que son reconocidas



por la recombinasa CRE. Así, solamente 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 ratones, y especialmente 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 expresión 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. Los ratones originales R26R procedieron del laboratorio del Dr. Álvarez Dolado (Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia). Son de la estirpe C57BL/6J por lo que, para poder mantener el sistema de detección de la mutación *pcd<sup>1J</sup>* basado en su asociación al fondo genético C57BL/6J, se realizó un paso intermedio previo al establecimiento de la colonia PCD-R26R. El desarrollo de esta colonia constituyó uno de los resultados de la Tesis Doctoral del Dr. Javier Sánchez Recio (Recio, 2008). Tras un programa específico de cruzamientos, se obtuvieron animales *+/*pcd-lac*/*lac**, que son los parentales idóneos para poder mantener la colonia y para poder obtener animales receptores *+/+*-lac*/*lac**, *+/*pcd-lac*/*lac** y *pcd/*pcd-lac*/*lac**, idóneos para el análisis de los eventos de fusión en animales mutantes PCD, heterocigotos y silvestres.

## Identificación de los animales

La mutación *pcd<sup>1J</sup>* se encuentra en una región reguladora que hasta ahora no ha podido ser identificada, por lo que se recurrió al uso de “microsatélites” para la identificación genotípica de los animales. Los microsatélites consisten en mono-, di-, tri- y tetranucleótidos repetidos en tándem, abundantes por todo el genoma eucariota; también son conocidos como SSR<sup>11</sup>. Los microsatélites son 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

<sup>11</sup> Del inglés *Short Sequence Repeat* o repetición de secuencias discretas.

mutación, como en la estirpe DBA/2J. Los microsatélites debían ser distintos 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<sup>1J</sup>* 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 en la estirpe DBA/2J por 116 pb. 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. Aquellos animales en los que no coincidió el genotipo determinado por ambos microsatélites no se tuvieron en cuenta para la cría o la realización de experimentos.

La línea de ratones R26R se caracteriza por presentar el gen reportero *lacZ* en una región del cromosoma 6 conocida como locus ROSA26 o Gt(ROSA)26Sor (Friedrich y Soriano, 1991; Zambrowicz et al., 1997). 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) utilizándose 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 (dentro 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 sin ningún inserto. Los primeros permiten la amplificación de un fragmento de 280 pb, mientras que los segundos la de otro de 600 pb, fácilmente distinguibles por electroforesis.

### **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 (6 U/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU) diluida en un tampón de lisis que contiene 0,2% (p/v) de dodecil sulfato sódico (SDS<sup>12</sup>), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA<sup>13</sup>) 5 mM a pH 8,0, NaCl 0,2 M y tampón Tris 0,1 M a pH 8,0 en agua ELIX. A la mañana siguiente, tras resuspender el homogeneizado, se centrifuga durante 2 min a 13.200 rpm, y se separa el sobrenadante, al que se añade un volumen equivalente de isopropanol (Prolabo, Fontenay-sous-Bois, Francia), y se agita suavemente. La mezcla se centrifuga de nuevo durante 10 min a 13.200 rpm y se elimina 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 H<sub>2</sub>O ELIX. Todos los pasos se realizan a temperatura ambiente.

### ***Amplificación del ADN***

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa, o PCR<sup>14</sup>, 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>  
<http://www.informatics.jax.org/searches/probe.cgi?41581>

En la tabla 2 se recogen las secuencias de los dos cebadores correspondientes a cada uno de los dos marcadores:

---

<sup>12</sup> Del inglés *Sodium Dodecyl Sulphate*

<sup>13</sup> Del inglés *Ethylene Diamine Tetracetic Acid*

<sup>14</sup> Del inglés *Polymerase chain reaction*

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 2.** Secuencias de los cebadores empleados para genotipar la mutación *pcd<sup>1J</sup>*

El medio para la realización de esta PCR contiene: tampón comercial de la Taq polimerasa (1x, Promega, Madison, Wisconsin, EEUU), desoxinucleótidos (0,2 mM, Promega), Taq polimerasa (0,125 U/μl Promega), dimetilsulfóxido (DMSO; 5%), Cl<sub>2</sub>Mg (1,5 mM), cebadores (2,5 μM cada uno), ADN (entre 100 y 500 ng de muestra) y H<sub>2</sub>O. 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 la suspensión ADN por H<sub>2</sub>O. La PCR de ambos marcadores se lleva a cabo en una termocicladora (Primus, MWG- Biotech, Vernon Hills, Illinois, EEUU) con los ciclos de temperatura que se detallan en la tabla 3:

Paso	Tiempo	Temperatura D13Mit250	Temperatura D13Mit283
1	5 min	94 °C	94 °C
2	1 min	94 °C	94 °C
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 3.** Temperaturas y tiempos de la PCR para el genotipado de la mutación *pcd<sup>1J</sup>*

Para el desarrollo de las dos PCR que permiten reconocer el gen reportero *lacZ* se utilizaron 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/pubcgi/protocols/protocols.sh?objtype=protocol&protocol\\_id=433](http://jaxmice.jax.org/pubcgi/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 4 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
Cebador R26F2	5'-AAAGTCGCTCTG AGTTGTTAT-3'	Cebador LacB1	5'-GCTGGGATCCGC CATTGTCAGACATG-3'
Cebador R523	5'-GGAGCGGGAGAA ATGGATATG-3'	Cebador LacF1	5'-GCTGGAATTCCG CCGATACTGAC-3'

**Tabla 4.** Secuencias de los cebadores empleados para genotipar el gen *lacZ*

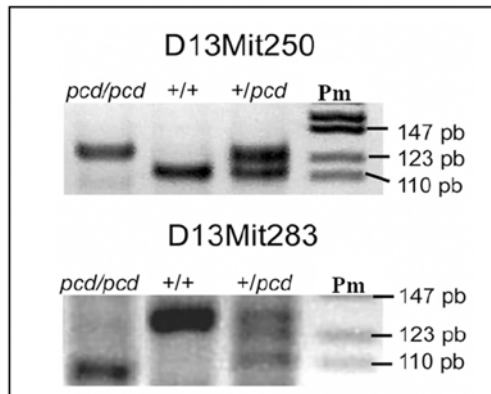
El medio para la realización de esta PCR contiene: tampón comercial de la Taq polimerasa (1x, Promega) desoxinucleótidos (0,2 mM, Promega), Taq polimerasa (0,1 U/μl, Promega), Cl<sub>2</sub>Mg (1,5 mM), cebadores (0,5 μM cada uno), ADN (entre 100 y 500 ng de muestra) en H<sub>2</sub>O. Como control positivo 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 H<sub>2</sub>O. La PCR se lleva a cabo con el mismo programa de ciclos de temperatura para ambos genotipos, recogido en la tabla 5:

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 5.** Temperaturas y tiempos de la PCR para el genotipado del gen *lacZ*.

### Identificación de los productos de la PCR

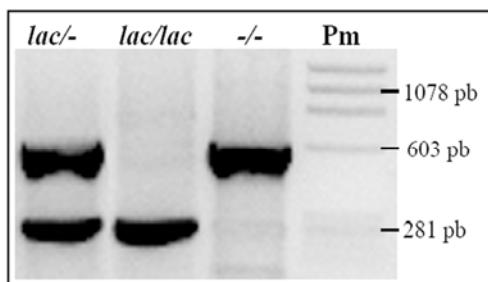
Los productos de la PCR de las regiones microsatélites D13Mit250 y D13Mit283, que tienen distintos tamaños en las estirpes C57BL/6J y DBA/2J, se separan mediante electroforesis en un gel de agarosa para fragmentos de ADN de pequeño tamaño (MS-8, Pronadisa, Madrid, España) al 3% en tampón Tris-borato-EDTA (TBE) 0,5 X (ver Apéndice), al que se añaden 0,4 µg/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, EEUU). Aquellos carriles en los que aparece una sola



**Figura 7.** Genotipado de la mutación *pcd<sup>fJ</sup>*. Las bandas simples corresponden a animales (*pcd/pcd*) y (*+/+*); las bandas dobles corresponden a animales (*+/pcd*). Pm: marcador de peso molecular en pb.

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 7).

En cuanto al producto de la PCR para el genotipado del gen *lacZ* o su alelo silvestre, el procedimiento es similar al anterior, pero utilizando agarosa normal (Pronadisa) al 1,5% y un marcador de Pm PhiX 174 DNA /Hae III (Promega).

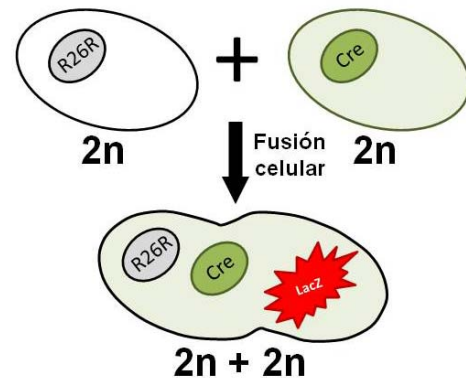


**Figura 8.** Genotipado del gen *lacZ* y de su alelo silvestre. El primer carril corresponde a un animal (*lac/-*); el segundo a uno (*lac/lac*); y el tercero a uno (*-/-*) Pm: marcador de peso molecular en pb.

Los animales homocigotos presentaron una única banda, de 600 pb en el caso de los silvestres (*-/-*), y de 280 pb en el caso de los animales *lacZ* (*lac/lac*). Los animales heterocigotos (*lac/-*) presentaron ambas bandas (figura 8).

## Animales donantes: la colonia PCD-(CRE-GFP)

Para identificar los elementos neurales originados a partir de las CDMO y discernir si dichos elementos se formaron mediante procesos de fusión, se empleó la colonia PCD-(CRE-GFP). Estos animales fueron seleccionados como donantes, ya que expresan de forma constitutiva la GFP –lo que permite una visualización directa de todas las CDMO en el receptor– y también expresan constitutivamente la recombinasa CRE. Como se explicó anteriormente, sólo en el caso de los eventos de fusión, se produce la expresión del gen reportero *lacZ* (figura 9). Por el contrario, en el caso de producirse procesos de transdiferenciación, y no de fusión celular, observaríamos las células GFP sin expresión del gen reportero *lacZ*.



**Figura 9.** Esquema de un proceso de fusión celular entre una célula R26R y una célula CRE.

Como ya se ha explicado previamente, el gen *lacZ* codifica para la enzima  $\beta$ -galactosidasa que degrada  $\beta$ -galactósidos, como la lactosa o el 5-bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -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  $\beta$ -galactosidasa. Ambos sistemas de visualización de la expresión del gen *lacZ* ya se han empleado con anterioridad para demostrar los procesos de fusión celular (Sekerkova et al., 1997; Álvarez-Dolado et al., 2003; Oh et al., 2003; Naik et al., 2006). Asimismo, esta colonia PCD-(CRE-GFP) contiene la mutación *pcd*<sup>1J</sup>, pudiendo obtener animales donantes silvestres o PCD, que expresasen tanto la GFP como la recombinasa CRE, o lo que es lo mismo, animales *+/+ - cre/cre - gfp/+* y animales *pcd/pcd - cre/cre - gfp/+*. Los dos tipos de donantes sirvieron para realizar tanto experimentos de trasplante de médula ósea “sana”, como células de la médula ósea con la mutación *pcd*<sup>1J</sup>. Este último grupo de donantes permitió, por una parte, trasplantar animales PCD con médula de otro PCD estableciendo un grupo experimental “sham” o “control”, que permitiese analizar los efec-



tos de la radiación y el trasplante independientemente de los efectos de la médula ósea “sana”. Por otra parte, estos donantes con genotipo *pcd/pcd*, *cre/cre* y *gfp/+* también permitieron estudiar la incorporación y destino de las células de una médula ósea mutante en un animal silvestre, sin neurodegeneración.

La colonia PCD-(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 y fueron cruzados con los animales que sintetizan la GFP, de la estirpe C57BL/6J. Los animales resultantes de estos cruzamientos se cruzaron a su vez con animales de la colonia PCD original. El programa adecuado de cruzamientos para establecer esta colonia PCD-(CRE-GFP) también forma parte de los resultados de la Tesis Doctoral del Dr. Javier Sánchez Recio (Recio, 2008).

## Identificación de los animales

La identificación de los animales GFP se realizó bajo el microscopio de fluorescencia a partir de una muestra de tejido de la cola, que posteriormente se aprovechó también para el genotipado de la mutación *pcd<sup>1J</sup>* y 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 (Hydrozoa, Cnidaria), emite bioluminiscencia fluorescente en la zona verde del espectro visible (Shimomura, 2005). Es por ello 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. El genotipado de la mutación *pcd<sup>1J</sup>* se realizó como se ha detallado anteriormente.

## Amplificación del ADN

Para el desarrollo de la PCR para el gen de la recombinasa CRE se utilizan las secuencias de cebadores recogidos en la tabla 6:



Cebador	Secuencia	Cebador	Cebador
CreB1	5'-GAAAATGCTTCT GTCCGTTTGC-3'	CreF1	5'-ATTGCTGTCACT TGGTCGTGGC-3'

**Tabla 6.** Secuencias de los cebadores empleados para genotipar el gen de la recombinasa CRE.

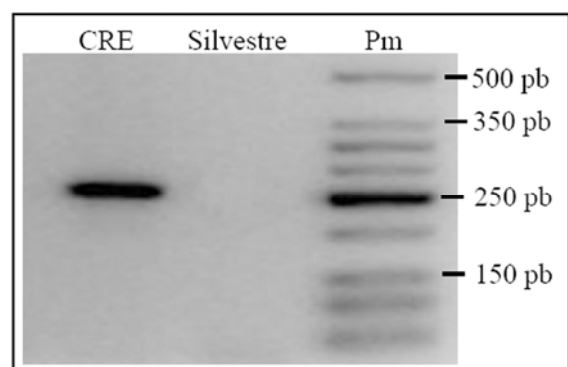
El medio para la realización de esta PCR contiene los mismos componentes que en el caso del genotipado del gen reportero *lacZ*, con los cebadores correspondientes. El ADN utilizado en este caso se extrae siguiendo el mismo procedimiento que hemos descrito en apartados anteriores. El programa de ciclos de temperatura para la termocicladora está recogido en la tabla 7:

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 7.** Temperaturas y tiempos de la PCR para el genotipado del gen de la recombinasa CRE.

### Identificación de los productos de la PCR

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 Bio-Rad (170-8202, Barcelona, España). Los animales que poseen el gen de la recombinasa CRE presentan la amplificación de un fragmento de 251 pb (figura 10).



**Figura 10.** Genotipado del gen de la recombinasa CRE.

En la colonia PCD-(CRE-GFP) la mutación *pcd*<sup>1J</sup> está asociada al trasfondo genético de la estirpe C57BL/6J, al igual que en la colonia de animales receptores PCD-R26R. De esta manera, en ambos casos el microsatélite asociado tiene un tamaño de 130 pb. Sin embargo, en la colonia PCD-(CRE-GFP) el alelo silvestre está asociado al trasfondo de la estirpe BALB/c (y no a la DBA/2J). En esta estirpe el microsatélite D13Mit250 es un fragmento de 120 pb, algo mayor que en la DBA/2J (de 116 pb), pero suficientemente distinto del fragmento de la estirpe C57BL/6J (130 pb), por lo que pueden ser separados en un gel de agarosa mediante electroforesis. Lo mismo sucede en el caso del microsatélite (D13Mit283), que es un fragmento de 126 pb en la estirpe BALB/c y de 114 pb en la estirpe C57BL/6J.

## Trasplante de médula ósea

El trasplante de médula ósea como potencial herramienta terapéutica para un proceso neurodegenerativo constituye la base experimental de la presente Tesis Doctoral. En este apartado se recoge todo el proceso experimental comprendido desde la ablación de la médula ósea de los animales receptores, hasta el seguimiento y viabilidad del trasplante.

### ***Ablación de la médula ósea de los animales receptores***

Para realizar un trasplante de médula ósea de forma efectiva es necesario eliminar previamente la médula ósea propia de los animales receptores, de manera que el nicho ocupado por ésta quede libre para permitir el asentamiento de las nuevas células trasplantadas en un proceso de “*homing*” (Whetton y Graham, 1999; Fuchs et al., 2004). La ablación de la médula ósea puede llevarse a cabo mediante irradiación o mediante tratamiento con sustancias químicas. En el presente trabajo se han utilizado, por separado, ambos métodos, realizando el trasplante a dos edades diferentes. En una serie de experimentos se empleó la irradiación para eliminar la médula ósea a los 19 días de vida posnatal (P19). En este caso, se irradió todo el cuerpo del animal con una fuente de <sup>137</sup>Cs, realizándose el trasplante en las 24 horas posteriores (P20). En otro conjunto de experimentos, los animales se trasplantaron en etapas perinatales (a P0). En este caso fue necesario realizar la ablación de su médula ósea

antes del nacimiento utilizando el agente químico busulfán en las madres gestantes.

## Ablación física por irradiación

El  $^{137}\text{Cs}$  es uno de los principales isótopos radiactivos del cesio, se crea sintéticamente al no encontrarse en la naturaleza y es relativamente estable. En los últimos años se emplea habitualmente en procesos de braquiterapia<sup>15</sup> para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer. La fuente de  $^{137}\text{Cs}$  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 proporciona una tasa de radiación de 243 cGy/min, con una energía de emisión de 0,662 MeV. El equipo dispone de un contenedor cilíndrico específico para los animales que gira durante la exposición a la fuente de  $^{137}\text{Cs}$ , de manera que todos los ratones reciben una radiación homogénea. La dosis letal mínima, es decir, la dosis más baja que permite la eliminación de la médula ósea en ratones de P19, es de 7,5 Gy (Recio, 2008; Díaz et al., 2011).

Tras realizarse el proceso de irradiación, 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 “suscias”, y sin trasplante; el denominado “control de radiación” de cada experimento.

## Ablación química con busulfán

El busulfán es un fármaco quimioterapéutico empleado para determinados tipos de leucemias y otras patologías sanguíneas, así como para algunos

---

<sup>15</sup> Tratamiento radioterapéutico en el que, a diferencia de la radioterapia externa, la fuente de radiación se coloca directamente en el lugar del tumor. De esta manera, la radiación afecta a una zona muy localizada, reduciendo la exposición de los tejidos sanos. Al restringirse el área de efecto a las zonas del tumor, pueden emplearse radiaciones mucho más altas que con la radioterapia convencional.

procesos de acondicionamiento antes de trasplantes de médula ósea. Asimismo, es empleado en investigación como agente químico en experimentos con trasplantes de médula ósea para eliminar la propia médula ósea de los animales receptores de dicho trasplante (Yoder et al., 1996; Espejel et al., 2009). Su mecanismo de actuación se basa en la desestabilización de la doble hélice de ADN interfiriendo en la replicación y en la transcripción, provocando la muerte celular.

El busulfán debe ser inyectado a cada hembra gestante para producir la ablación de la médula ósea de su descendencia. La hembra debe recibir dos inyecciones: una el día 17 de gestación y otra el día 18, es decir, dos y un día antes del nacimiento de las crías. Para preparar el agente inyectable, se disolvieron 25 mg de busulfán (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) en 500  $\mu$ l de dimetilsulfóxido (DMSO). Se introdujo un tubo Falcon® de 50 ml con 24,5 ml de tampón fosfato salino (PBS<sup>16</sup>) estéril en un vaso de precipitados con agua calentada previamente a 60 °C. El vaso con agua que contiene el tubo sirvió para calentar el PBS y mantener su temperatura relativamente constante durante el transporte del mismo al animalario. Posteriormente, se mezcló el busulfán (en DMSO) con el PBS caliente y se inyectó intraperitonealmente a la hembra, previamente pesada, un volumen de la mezcla a razón de 0,0155  $\mu$ l / g de peso de la hembra.

La inyección se realizó entre el par de mamas más caudal del animal. Es importante que no se enfríe la solución de busulfán, rondando la temperatura óptima de inyección los 50 °C. De ahí la importancia de utilizar el vaso de precipitados con agua caliente para el transporte del PBS.

### ***Extracción de la médula ósea del donante***

La médula ósea para el trasplante se obtuvo a partir de los fémures y de las tibias de animales donantes de más de 4 semanas de edad. Los animales donantes se seleccionaron para cada experimento en función del tipo de receptor. Para la extracción de la médula ósea, los donantes se sacrificaron por dislocación cervical. A continuación, se limpió la zona lumbar del animal con eta-

---

<sup>16</sup> Del inglés *Phosphate Buffered Saline*

nol al 70% (v/v), y se procedió al corte de la piel de esta región, lo que permitió acceder a las patas traseras. Las patas se seccionaron a la altura de la cadera y del tobillo, y se separaron los fémures y las tibias del resto de los tejidos. Los huesos íntegros, sin fisuras ni fracciones, se llevaron al interior de una campana de flujo laminar para proceder al lavado de la médula ósea en condiciones estériles. Hasta el momento de la extracción los huesos se mantuvieron en una placa de cultivos con PBS 0,1 M, pH 7,4. La extracción de la médula ósea se realizó mediante la inyección de medio IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium; Invitrogen; Carlsbad, EEUU) con una jeringuilla de insulina en ambas epífisis. El lavado óseo se recogió sobre un tubo Falcon® de 50 ml con un filtro de 70 µm de diámetro de poro (BD Falcon; Bedford, Massachusetts, EEUU). Una vez extraída la médula ósea de los 4 huesos de un mismo animal, se centrifugó a 1.500 rpm durante 5 minutos y a 4 °C. Se retiró el sobrenadante conservando el "pellet" de color rojo debido a los eritrocitos. A continuación, se añadieron 5 ml de solución de lisis de eritrocitos para médula ósea (ver Apéndice), en los que se resuspendieron las células dejándolo actuar durante 5 minutos. Al cabo de este tiempo se añadió PBS hasta 50 ml para finalizar la reacción de lisis. En ese momento se tomó una alícuota de 100 µl para estimar el número total de células extraídas mediante recuento con una cámara Thoma. Mientras tanto, la suspensión se centrifugó de nuevo en las condiciones anteriores. Finalmente, tras retirar el sobrenadante se resuspendió el "pellet" (ya blanco, tras la lisis de los eritrocitos) en un volumen de PBS, en función del número de células estimadas en el recuento, y teniendo en cuenta que se trasplantaron  $7,5 \times 10^6$  células por animal en un volumen máximo de 150 µl. Debido al pequeño tamaño de los animales trasplantados a P0, la suspensión celular se concentró más, de manera que el volumen inyectado no superase los 50 µl, pero siempre añadiendo el mismo número absoluto de células.

## **Trasplante**

Una vez realizada la extracción de la médula ósea de los animales donantes se procede a su trasplante en los animales receptores. Este trasplante puede llevarse a cabo mediante dos técnicas diferentes: inyección intravenosa, en el caso de los animales trasplantados a P20, o inyección intrahepática, en el

caso de los neonatos. 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. En cualquier caso, 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 más adelante).

## Vía intravenosa

El trasplante de médula ósea mediante inyección intravenosa fue elegido por presentar una serie de ventajas en comparación con el intraperitoneal (Recio, 2008). 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 de inmovilización (LE5016, PanLab; Barcelona, España) que dispone de un orificio para inmovilizar la cola, de manera que quede accesible. Antes de realizar el trasplante, la cola del animal se expone a una fuente de calor (InfraCare HP3621, Philips Ibérica; Madrid, España) para producir una vasodilatación periférica, favoreciendo así la visualización de los vasos de la cola y la inyección de las células. Una vez identificadas las venas, el trasplante se realiza introduciendo muy superficialmente la aguja de una jeringuilla de insulina de calibre 0,3 mm (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.

## Vía intrahepática

El trasplante de médula ósea mediante inyección intrahepática se ha empleado con éxito en algunos trabajos previos (Espejel et al., 2009). En nuestro caso, dado el pequeño tamaño de los animales receptores (P0) se optó por este tipo de trasplante. Consiste en la inyección en el hígado (fácilmente visible en animales recién nacidos) de las células del donante con una jeringuilla de insulina de calibre 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.

## Viabilidad de las células trasplantadas

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, lo que hace necesario un control de viabilidad de las células inyectadas. Para ello, una vez finalizado el trasplante se cultivan las células restantes que son, por tanto, sometidas hasta el momento a los mismos tratamientos que las células inyectadas a los animales receptores. 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, suero fetal bovino al 5% (10106-151, Invitrogen) y penistrepto 100 µg/ml (mezcla comercial de antibióticos Penicilina y Estreptomina; 15140-148, Invitrogen) en IMDM. Se añaden 3 ml de este medio por pocillo y se siembran las células a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml. Las células se mantienen en un incubador (Nuair US AUTOFLOW; Plymouth, EEUU) a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> 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); 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. Asimismo, la tinción con Azul Tripán se realizó también directamente en las células sobrantes extraídas del donante, sin ser cultivadas. La proporción entre células teñidas y células sin teñir nos da una estimación de la viabilidad celular.

## Seguimiento del trasplante

La complejidad y delicadeza de los procedimientos realizados –tanto la ablación de la médula ósea como el trasplante celular- hacen necesarios una serie de cuidados especiales y comprobaciones de la viabilidad de dichos procedimientos. Solamente cuando se ha comprobado la eficacia del trasplante y, por tanto, la posibilidad de desarrollar una terapia celular efectiva, se puede comenzar con el estudio de los efectos del mismo.

### ***Cuidado de los animales trasplantados***

Una vez realizado el trasplante de médula ósea, tanto el intravenoso como el intrahepático, los animales receptores se mantienen en el mismo aislador especial de animales inmunodeprimidos en el que se habían mantenido tras la irradiación, durante un tiempo mínimo de dos semanas. Transcurrido ese tiempo, los ratones trasplantados pueden ser de nuevo estabulados en condiciones estándar sin presentar problemas de supervivencia.

### ***Evolución temporal del trasplante***

El análisis de la incorporación de las células trasplantadas en los animales receptores constituye una aproximación importante al grado de quimerismo conseguido tras el trasplante de médula ósea. Además, puesto que uno de los objetivos de nuestro estudio es analizar el 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. El análisis de la incorporación de las células trasplantadas en los animales receptores se lleva a cabo mediante citometría de flujo de su sangre periférica, tanto a lo largo del periodo de supervivencia, como previo a su sacrificio.

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular que permite determinar las características de dispersión de luz y de fluorescencia que poseen las células, conforme atraviesan 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 deben ser disociadas, las células sanguíneas pueden analizarse prácticamente de manera directa. El efecto producido por las células al interponerse en el rayo de luz permite determinar su tamaño y su complejidad estructural y, por tanto, identificar el tipo celular. Además, si las células se encuentran marcadas con alguna molécula fluorescente, se puede conocer el porcentaje de células que presentan dicho marcador.

En nuestro caso, se tomaron muestras de sangre de todos los ratones trasplantados a las 2, 4 y 6 semanas después del trasplante (es decir, a las edades de P35, P50 y P65, respectivamente) como seguimiento de su efectivi-



dad. Asimismo, se tomó otra muestra en el momento previo a su sacrificio. En todos estos análisis se incluyó 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 con una lanceta o una aguja de insulina en el plexo submandibular 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. La sangre heparinizada se trasvasa a tubos Falcon de 15 ml y se rompen los eritrocitos con 7 ml de una solución de lisis específica para sangre periférica (diferente a la utilizada durante el proceso de extracción de la médula ósea; ver Apéndice) durante 20 minutos. Posteriormente, las muestras se centrifugan a 1200 rpm a 4 °C, se retira el sobrenadante con una pipeta Pasteur y se resuspenden de nuevo en un volumen de 5 ml de PBS para lavar la muestra. Se vuelve a centrifugar y se retira el sobrenadante, tras lo que se resuspenden las células en 1 ml de PBS. La suspensión celular se pasa a tubos especiales para el citómetro de flujo. Es importante realizar todos los pasos de este proceso en hielo para evitar la lisis del resto de las células sanguíneas. La muestra con los componentes nucleados de la sangre se lleva a analizar al citómetro de flujo (FACSCalibur, BD; Nueva Jersey, EEUU) del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca.

## Pruebas de comportamiento motor

Uno de los objetivos principales de la presente Tesis Doctoral es determinar el efecto funcional del trasplante de una médula ósea “sana” en los ratones mutantes PCD. Teniendo en cuenta la ataxia que les caracteriza, estos animales se sometieron a una serie de pruebas de comportamiento motor para analizar posibles cambios en su capacidad de movimiento. Dependiendo del tipo de ablación de la médula, los animales fueron trasplantados a edades diferentes. Por este motivo, y teniendo en cuenta la degeneración cerebelosa progresiva acompañada de ataxia, las pruebas de comportamiento realizadas fueron diferentes.

### **Ratones sometidos a radiación y trasplantados por vía intravenosa a P20**

A las dos semanas de haberse realizado dicho trasplante (P35) coincidiendo con su salida del aislador para inmunodeprimidos, los animales se sometieron a dos pruebas diferentes de comportamiento motor: campo abierto y velocidad media de desplazamiento. Se formaron 5 grupos experimentales con 5 animales cada uno. Los 5 grupos fueron:

- Animales silvestres sin tratamiento.
- Animales silvestres trasplantados con médula ósea silvestre.
- Animales PCD sin tratamiento.
- Animales PCD trasplantados con médula ósea silvestre.
- Animales PCD trasplantados con médula ósea de PCD.

No se hizo distinción entre machos y hembras (Takahashi et al., 2006). Los animales se sometieron a estas pruebas cada 7 días, que se repitieron un total de 7 veces, es decir, hasta P77 (a P35, al salir del irradiador, se hizo la primera prueba, y las otras seis cada semana, sumando 42 días más).

### **Ratones sometidos a ablación química y trasplantados por vía intrahepática a P0**

La prueba de comportamiento realizada fue el test de la varilla giratoria o *rota-rod*. Teniendo en cuenta el efecto nulo del trasplante de médula ósea de PCD en ratones PCD (PCD trasp-WT; ver Resultados), no se empleó este grupo de animales mutantes en la presente prueba de comportamiento.

### ***Campo abierto***



**Figura 11.** Imagen de un ratón silvestre en la prueba de 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 (Takahashi et al., 2006). 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 la superficie inferior dividida en 15 cuadros de 9 x 9 cm. Las líneas de separación tienen 1 cm de grosor (figura 11).

Inicialmente el animal se situó en el centro del rectángulo y se observó durante 5 minutos, tiempo durante el que 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**”). Los dos primeros valores dan una estimación de la habilidad motora del animal, su capacidad para establecer y mantener una ruta determinada. Los valores de “alzadas” y “limpiezas” reflejan la capacidad exploratoria y anímica del animal. Finalmente, las “defecaciones” de cada animal son una estimación del nivel de estrés del mismo.

Transcurridos los 5 minutos de observación, el animal se devolvió a su jaula, y la caja se limpió con alcohol de 50% (v/v) para evitar que el siguiente animal estudiado se encontrase bajo la influencia de los olores desprendidos por el animal anterior. Todas las pruebas se grabaron con una cámara de vídeo. El número de cruces completos y cruces medios aporta, principalmente, información sobre la capacidad motora y también del carácter exploratorio del animal. 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 (figura 12). Al ser

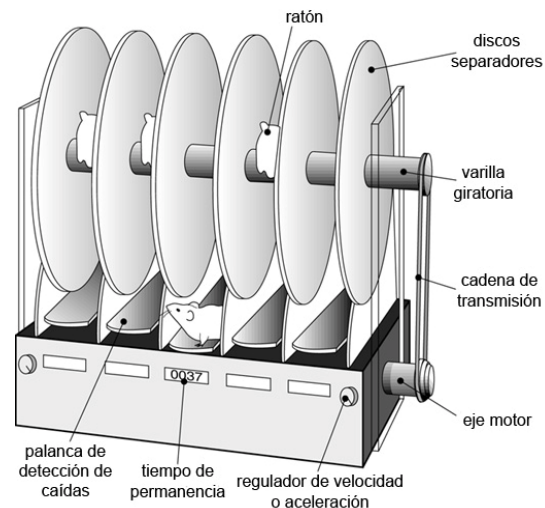


**Figura 12.** Imagen de un ratón PCD en la prueba de la velocidad de desplazamiento.

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 presentaba una pared de 20 cm de altura y en el otro había una caída, que, además de impedir su huida, permitía su grabación en vídeo y la observación de las características de la marcha.

## Rota-rod

El test de la varilla giratoria o rota-rod es un método estandarizado que permite medir la habilidad motora de los ratones (Carter et al., 2001). Consiste en una varilla dispuesta horizontalmente que puede girar con una aceleración constante, con discos separadores para colocar sobre ella a varios ratones a la vez sin que puedan interactuar (figura 13). La aceleración utilizada es de 3,6 revoluciones/min<sup>2</sup> pasando de 4 a 40 rpm en 10 minutos. Los animales situados en esta varilla deben desplazarse en el sentido opuesto al giro de la varilla para evitar caerse. Cuando un ratón se cae, lo hace sobre una plataforma basculante desplazándola, deteniendo un cronómetro, detectando así la caída y permitiendo determinar el tiempo exacto que el animal ha permanecido sobre la varilla y la velocidad máxima a la que ha conseguido mantenerse. Cada animal realizó esta prueba 7 veces separadas por intervalos de 20 minutos. El tiempo de resistencia de cada animal y la velocidad máxima a la que llegó se obtuvo haciendo la media de estos siete valores.



**Figura 13.** Esquema de un rota-rod. Modificado de Carter et al., 2001.

## Pruebas de comportamiento olfativo y electrofisiológicas

El análisis histológico de los BO de los ratones PCD sin trasplantar y trasplantados, tanto con médula ósea sana como de PCD (a P20) demostró

que el trasplante de médula ósea “sana” podía tener como efecto un retraso en la degeneración de las células mitrales (ver Resultados). Por esta razón, un nuevo grupo de animales PCD y silvestres fueron irradiados a P19 y trasplantados a P20 para comprobar el efecto del trasplante en el olfato mediante registros electrofisiológicos y pruebas de comportamiento olfativo. En este caso, se emplearon 4 grupos experimentales de 8-10 animales cada uno (debido a la variabilidad inherente a estas pruebas):

- Animales silvestres sin tratamiento.
- Animales silvestres trasplantados con médula ósea silvestre.
- Animales PCD sin tratamiento.
- Animales PCD trasplantados con médula ósea silvestre.

Dichas pruebas se realizaron en la Unidad de Percepción y Memoria del Instituto Pasteur de París, bajo la dirección del Dr. Pierre-Marie Lledo y con la ayuda y supervisión del Dr. Gilles Gheusi y del Dr. Gabriel Lepousez.

### ***Pruebas de comportamiento olfativo***

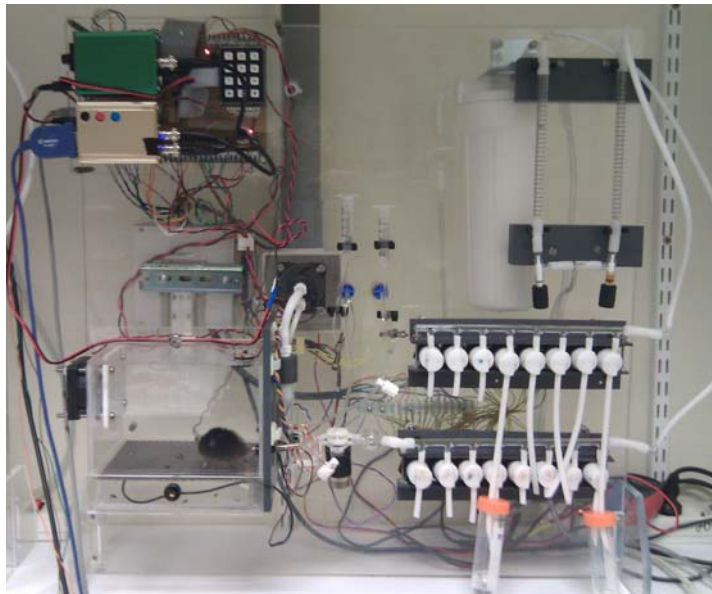
Los animales destinados a estas pruebas de comportamiento se mantuvieron a temperatura y humedad relativa constantes, con un fotoperiodo artificial de 12/12 horas y alimentación *ad libitum*. Sin embargo, sólo se les administró una cantidad diaria de 1 ml de agua, hasta disminuir el peso del animal a un 85% del original. Con esta deprivación hídrica parcial, se aseguró una correcta motivación a la hora de realizar estos experimentos, ya que la recompensa utilizada en los mismos fue agua.

### **Características de los olfatómetros**

Las pruebas de comportamiento se realizaron en olfatómetros de ocho canales controlados por ordenador, funcionalmente similares a los descritos por Bisulco y Slotnick (figuras 14 y 15; Bisulco y Slotnick, 2003; Mouret et al., 2008). Cada olfatómetro consta de una pequeña jaula de metacrilato con el suelo metálico donde se coloca al animal. En una de sus paredes se abre una ventana que permite al animal introducir la cabeza en una cámara de presentación del olor. A través de esta cámara y en sentido ascendente, se hace pasar un flujo continuo de aire (con o sin odorantes). Además, la cámara presenta

una boquilla por la que se suministra agua al animal como recompensa. Una célula fotoeléctrica detecta las entradas del animal en la cámara.

Cada uno de los ocho canales consta de un recipiente o tubo de saturación de 50 ml en el que se deposita una cantidad de 10 ml de aceite mineral (en principio, inodoro) que puede llevar disuelto o no un odorante determinado (según el estímulo que se desee). Cada recipiente está conectado a dos tubos para la entrada y la salida del aire que arrastra los odorantes desde aquí hasta la cámara de presentación

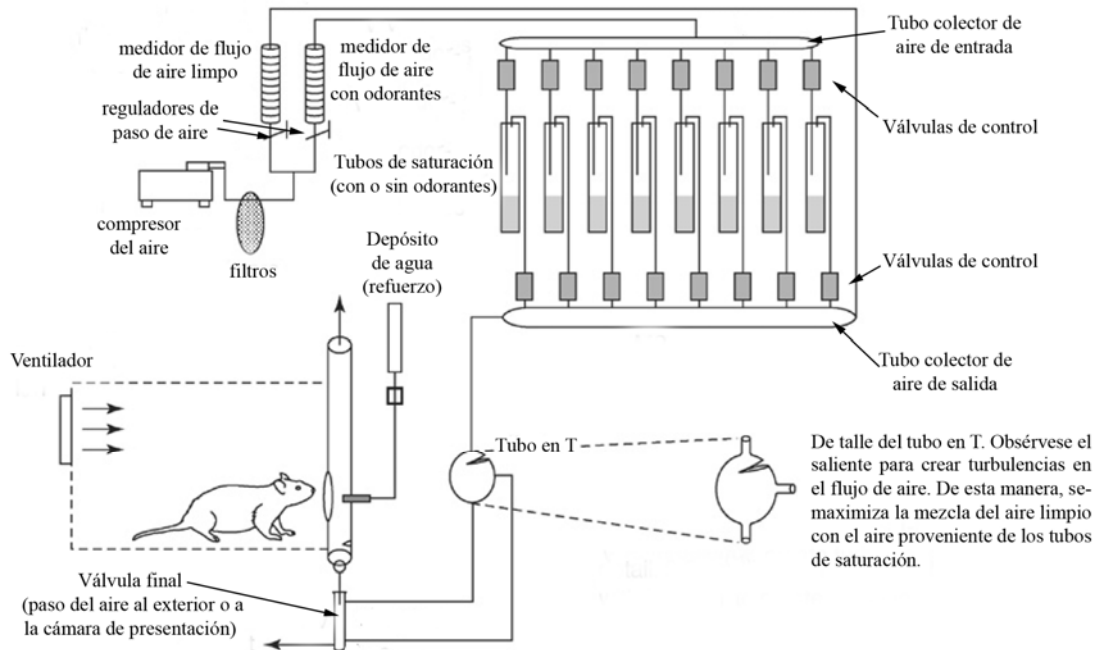


**Figura 14.** Imagen de uno de los olfatómetros utilizados. Se pueden apreciar el habitáculo donde se aloja al animal, las válvulas de los 8 canales, los recipientes con las sustancias odorantes y el sistema de tubos para la conducción de dichos odorantes. Cortesía de Sebastian Wagner, Instituto Pasteur, París.

del olor. Este flujo se genera haciendo pasar una corriente de aire sobre la superficie del aceite mineral (con o sin odorante) de cada tubo de 50 ml, gracias a una serie de válvulas que permiten un flujo de 50 ml/min. Además, este aire odorizado se diluye 40 veces en aire fresco (un flujo de 1950 ml/min) antes de su introducción en la cámara de presentación. Por tanto, la concentración de odorante de dicha cámara de presentación es un 2,5% de la que presenta el aire del interior de los tubos de 50 ml. Aunque la concentración exacta de los odorantes en el aire de los tubos de 50 ml no es conocida, se sabe que la concentración de las moléculas del odorante en el espacio de aire sobre el líquido en el que está disuelto es proporcional a dicha dilución (Cometto-Muniz et al., 2003).

Antes del uso de cada olor, el olfatómetro se limpió con etanol al 95% (v/v). Cada recipiente con aceite mineral con o sin odorante, así como los tubos que lo conectan al aparato se cambiaron diariamente antes de cada uso.





**Figura 15.** Esquema de los olfatómetros utilizados (modificado de Slotnick y Restrepo, 2005)

## Sesiones de entrenamiento

En primer lugar fue necesario enseñar a los ratones a acceder a la cámara de presentación del olor y recibir el agua allí suministrada (figura 16). Para ello, se seleccionó un programa en el olfatómetro que liberase inmediatamente entre 2 y 4  $\mu\text{l}$  de agua cada vez que el ratón introducía la cabeza en la cámara de presentación y lamía la boquilla. Cuando el animal lamía el agua suministrada, cerraba un circuito eléctrico entre la boquilla del agua y la superficie metálica de la jaula del olfatómetro, pudiendo detectarse cada uno de estos “aciertos”.



**Figura 16.** Ratón durante el proceso de aprendizaje. Nótese cómo introduce la cabeza a través de la apertura de la cámara de presentación del olor.

Si introducía la cabeza pero no lamía el agua, se consideraba como “fallo”. Cada 20 aciertos, el tiempo de espera transcurrido entre que el animal metía la cabeza para lamer la boquilla y la liberación del agua se fue incrementando. De esta manera, cada ratón tuvo que aprender a esperar 300 ms, luego 600, 900, 1.000 y 1.200 ms. Una vez que el animal hubo aprendido a esperar 1.200 ms para recibir su recompensa, realizando 40 aciertos y menos de 8 fracasos en un tiempo relativamente corto, se lo consideró apto para realizar las pruebas de comportamiento olfativo. Tras cada sesión se completó la cantidad de agua administrada a cada animal hasta un total de 1 ml diario. Esta primera fase de entrenamiento duró 4 días.

### Prueba de sensibilidad olfativa

Este ensayo se basó en un condicionamiento operante del tipo “go/no-go” descrito por Bodyak y Slotnick (Bodyak y Slotnick, 1999; Mouret et al., 2008). El ratón tuvo que aprender que tan sólo se le suministraría agua en presencia de un odorante, pero no en su ausencia. En este procedimiento, cada vez que el ratón introduce la cabeza en la cámara se dirige hacia ésta un flujo de aire procedente de forma aleatoria bien de un tubo con odorante, bien de un tubo con sólo aceite mineral. El flujo de aire con o sin odorante tarda 1 s en llegar a la cámara y es presentado durante 2 s. De ahí que los animales tuvieran que aprender a mantener la cabeza durante algo más de un segundo en la misma para recibir la recompensa durante la fase de entrenamiento. Sólo si el estímulo es positivo (aire con odorante), se administra agua al animal. Cada evento de presentación de estímulo está separado por 5s.

Para considerar un “**acierto**”, cada animal tuvo que lamer al menos 7 veces la boquilla dispensadora de agua durante el periodo de presentación del odorante. En caso contrario, se consideró “**fallo**”. Cuando se lamía la boquilla 7 veces en la presentación de un estímulo negativo (sin odorante), se consideró “**falsa alarma**”. Si en este caso el animal retiraba la cabeza, se consideró “**rechazo correcto**”. Aquellos casos en los que el animal no mantuvo su cabeza durante al menos 0.1 s tras la liberación del olor, se consideraron “**respuestas cortas**” y no se utilizaron para el cálculo del porcentaje de aciertos. Cada ronda de discriminación olfativa estaba compuesta por 20 eventos de presentación de estímulo (10 positivos y 10 negativos mezclados de forma aleatoria, sin



presentarse nunca más de tres similares de forma consecutiva). Para calcular el porcentaje de aciertos de discriminación olfativa de cada ronda se consideró el número de “aciertos” y de “rechazos correctos” con respecto al total de presentaciones [(“aciertos” + “rechazos correctos”)/20 x 100]. Un porcentaje del 85% o superior se consideró como aprendizaje correcto de la tarea a realizar, discriminando, obviamente, el estímulo positivo del negativo y de la asociación del primero con el suministro de agua.

En la primera fase de esta prueba de comportamiento se eligió como odorante la (+)-carvona (98,5%; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) a una dilución de  $10^{-2}$  en aceite mineral. Se realizaron 30 rondas de discriminación para cada animal, con un máximo de 10 rondas por día (200 presentaciones) durante 3-4 días.

La siguiente fase de la prueba consistió en reducir la concentración del odorante progresivamente, para así determinar el umbral de discriminación olfativa de los ratones. Las concentraciones utilizadas fueron  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ , realizándose 10 rondas para cada una de ellas por cada animal. Finalmente, se realizó otra prueba con una concentración de  $10^{-1}$  para comprobar que todos los ratones podían detectar esta concentración y para que sirviese de recordatorio para el siguiente experimento.

En estos experimentos se recogieron y analizaron los resultados referentes tanto al porcentaje de acierto de los animales (ver más arriba) como al tiempo de reacción de los mismos cuando se les presentó un estímulo negativo. Es decir, el tiempo que tardaron en retirar la cabeza de la cámara de presentación de olor en los eventos de “rechazo correcto”. Este tiempo de reacción es un indicador tanto de la detección del odorante como de la capacidad motora de los animales.

## **Prueba de discriminación olfativa**

Esta prueba es similar a la anterior, con la salvedad de que el estímulo negativo es un segundo odorante la (-)-carvona (98%; Sigma-Aldrich). De esta manera, los ratones tuvieron que aprender a asociar la recompensa con un odorante y la falta de la misma con otro odorante distinto.

El siguiente paso consistió en mezclar progresivamente los dos odorantes, tanto como estímulo positivo, como negativo, a la razón de 80%-20%, 68%-32% y 56%-44%. De esta manera, se pudo determinar si los animales podían distinguir un olor predominante dentro de una mezcla. Las diluciones de los odorantes utilizadas fueron de  $10^{-1}$ , ya que el rango de detección de los mismos en los animales mutantes osciló entre  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$  (ver *Resultados*).

En las pruebas de discriminación olfativa también se analizaron tanto los porcentajes de acierto, como los tiempos de reacción.

### **Análisis electrofisiológico**

Tras realizar las pruebas de comportamiento, se estudió el funcionamiento del BO de los animales utilizados para dichas pruebas mediante un análisis electrofisiológico de potenciales de campo local. El objetivo principal de este análisis fue el registro las oscilaciones gamma ( $\gamma$ ; 40-100 Hz) de los potenciales de campo local; es decir, los correspondientes a la descarga sincrónica de células mitrales y empenachadas del BO (Egger y Urban, 2006; Lagier et al., 2007). Estas oscilaciones pueden formar parte de la codificación sensorial y, por tanto, están relacionadas con tareas de discriminación y aprendizaje en roedores. Asimismo, se analizaron también las oscilaciones theta ( $\theta$ ; 1-12 Hz) y beta ( $\beta$ ; 20-40 Hz), relacionadas con la respiración y el olfateo, y con los impulsos que llegan al BO procedentes de centros superiores, respectivamente (Laurent et al., 2001).

Los animales fueron anestesiados con una mezcla de clorhidrato de ketamina (50  $\mu\text{g/g}$  peso animal; Ketalar, Pfizer, Nueva York, EEUU) y xilacina (50  $\mu\text{g/g}$  p.a.; Rompun, Bayer, Lerverkusen, Alemania). Tras comprobar la ausencia de reflejos, se colocaron en un aparato de estereotaxia y se expuso la superficie del cráneo mediante una incisión en la piel de la cabeza. El cráneo se limpió adecuadamente con etanol al 70% (v/v) para eliminar la presencia de restos de tejido conjuntivo adheridos que pudiesen dificultar la operación. Una vez limpio, se perforó la pieza de hueso que cubre los BO, de manera que estos quedasen accesibles. A continuación, se introdujo un soporte con dos electrodos de registro en cada BO, de tal forma que las puntas quedasen situadas en la CPE. El mismo soporte tenía acoplado un pequeño capilar para la infu-

sión en la superficie del BO de picrotoxina (PTX), antagonista de los receptores GABA<sub>A</sub> (presentes en las células mitrales). El empleo de esta sustancia nos permitió analizar la superactivación de las células mitrales en los distintos grupos experimentales. Las coordenadas estereotáxicas utilizadas en los animales control fueron: 5,1 mm rostral, 1,45 mm lateral desde bregma; y 1,4 mm de profundidad desde la duramadre. Debido a la pérdida de las células mitrales, los ratones PCD experimentan una reducción del volumen del BO (Greer y Shepherd, 1982; Valero et al., 2007), por lo que fue necesario aplicar un factor de corrección para situar el electrodo correctamente (Valero et al., 2007). En este caso, las coordenadas utilizadas fueron: 4,5 mm rostral, 1,1 mm lateral desde bregma; y 1,2 mm de profundidad desde la duramadre. En cualquiera de los casos y tras el sacrificio de los animales se realizó una tinción básica de diferentes secciones del BO para comprobar si el electrodo de registro se situó correctamente. Adicionalmente, se colocó otro electrodo de referencia bajo el hueso occipital en contacto con el cerebelo, para disminuir el ruido y obtener una señal más nítida. Una vez colocados los electrodos, se aseguraron al cráneo del animal con cemento dental.

Cuarenta y ocho horas después de la operación, se procedió al registro electrofisiológico. Los electrodos de cada animal se conectaron al aparato de registro dotado de un sistema de amplificación de la señal. En primer lugar, se registró la actividad del BO colocando al animal en su propia jaula, para tener una referencia inicial de dicha actividad. Durante unos 10 min se registró la actividad del BO anotándose en cada momento si el animal estaba en reposo, explorando, limpiándose, escarbando o moviéndose. Posteriormente, el animal fue colocado en una cámara análoga a la de los olfatómetros, pero de menor tamaño, donde se le presentaron cada cierto tiempo un estímulo conocido y otro desconocido. El estímulo conocido fue la (+)-carvona y el desconocido el benzaldehído (99,5%; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU), ambos a una concentración de  $10^{-1}$ . De esta manera, se pudo registrar la actividad eléctrica basal del BO así como aquella producida por la detección de un odorante conocido o desconocido, en tres situaciones comportamentales distintas: reposo, exploración o exposición a un nuevo odorante.

## Obtención y preparación del tejido

### *Sacrificio y disección*

Los tiempos de supervivencia y edades de sacrificio de los animales de la presente Tesis Doctoral dependieron del experimento realizado.

Así, los animales irradiados y trasplantados a P20 se sacrificaron a cuatro edades distintas: P60, P110, P150 y P300. A P60 (40 días después del trasplante), la degeneración en el cerebelo de los animales PCD está virtualmente concluida, siendo el inicio de la degeneración de las células mitrales del BO. A P110 (90 días después del trasplante) y a P150 (130 días después del trasplante), se considera concluido el proceso degenerativo del BO, siendo esta última edad el punto final de análisis de los animales mutantes. No se dejó sobrevivir ningún PCD hasta la edad de P300, empleándose únicamente animales silvestres (+/+) y heterocigotos (+/*pcd*) de esta edad para comparar la incorporación de células de Purkinje al cerebelo en ambos grupos y para ver los estudios de efectos de la radiación en el eje ZSV-CMR-BO (ver Resultados). Dentro de este último estudio, también se incluyeron animales de P20 (irradiados y sin trasplante) y los respectivos grupos control, sin haber recibido radiación.

Los animales utilizados para los estudios de comportamiento olfativo y registro electrofisiológico se sacrificaron al término de estos experimentos, es decir, a una edad aproximada de 165 días.

En cuanto a los animales sometidos a ablación química de la médula ósea y trasplantados a P0, se sacrificaron a las edades de P20 y P30, para tener una estimación de los efectos de la terapia celular de manera preventiva, antes del inicio de la neurodegeneración en ninguna zona encefálica, y a corto plazo.

A excepción de los ratones donantes (sacrificados por dislocación cervical), los animales se sacrificaron por exanguinación tras anestesia intraperitoneal con una solución al 5% (p/v) de hidrato de cloral (10 µl/g p.a.; Prolabo, Fontenay-St.-Bois, Francia). 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  $12 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Inicialmente, se lavó el árbol vascular con solución salina isotónica 0,9% (p/v) durante 1 minuto, previa inyección intracardiaca de 50  $\mu\text{l}$  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 utilizó una solución de paraformaldehído al 2% (p/v) y de glutaraldehído 0,25% (v/v) en PBS durante 15 minutos. En el caso de los animales destinados para inmunofluorescencia, se utilizó como fijador el de Zamboni (ver Apéndice) durante 15 minutos.

Tras la perfusión, se extrajeron 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, EEUU). 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 temperatura ambiente y en agitación durante 20 min y, posteriormente, se lavaron 3 veces en tampón fosfato 0,1 M pH 7,4 (PB<sup>17</sup>) para eliminar el exceso de fijador. Los encéfalos destinados al resto de técnicas no se postfijaron, 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, 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 extraerse los encéfalos, también se recogieron la médula espinal, el hígado y una muestra de músculo esquelético (gastrocnemio). 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. Las excep-

---

<sup>17</sup> Del inglés *Phosphate Buffer*

ciones de este proceso fueron las muestras de músculo y médula espinal, que se incluyeron en parafina tras la postfijación (ver apartado más adelante).

### ***Corte en microtomo de deslizamiento***

Los encéfalos de los animales y sus correspondientes hígados (controles positivos de eventos de fusión), se seccionaron en un microtomo de deslizamiento acoplado a una unidad de congelación ("Frigomobil"; Leica, Nussloch, Alemania) a 40  $\mu\text{m}$  de grosor, y a una temperatura que oscilaba entre  $-23^{\circ}$  y  $-15^{\circ}\text{C}$ . Todas las secciones se recogieron en flotación en PBS y se distribuyeron en series consecutivas. A continuación, se lavaron tres veces durante 10 minutos cada lavado (3 x 10 min) en PBS, para eliminar los restos de fijador y sacarosa. Finalmente, las series que no se utilizaron inmediatamente se conservaron a  $4^{\circ}\text{C}$  en azida sódica al 0,05% en PBS, si iban a utilizarse en un breve periodo de tiempo o en mezcla congeladora (ver apéndice) si su almacenamiento iba a ser más prolongado.

### ***Corte en criostato***

Los músculos procesados para el análisis de incorporación de CDMO y del posible daño estructural en los animales mutantes se seccionaron a 14  $\mu\text{m}$  de grosor, a una temperatura de  $-25^{\circ}\text{C}$ . 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-Gläser; 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 la pieza, constituyendo una muestra representativa de cortes con una separación de 240  $\mu\text{m}$  entre sí, de cada bloque de tejido. Los portaobjetos con las secciones se dejaron secar a temperatura ambiente durante dos horas y a continuación se almacenaron congeladas a  $-30^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización.

## ***Corte en microtomo de rotación***

Las muestras de músculo y médula espinal destinadas al análisis histológico se deshidrataron en una batería de alcoholes a concentración creciente, tras lo cual se introdujeron en xileno y en parafina (Paraplast®; ver tabla 8). Por último, cada bloque se colocó en un molde de inclusión con parafina y se dejó enfriar a temperatura ambiente para que solidificase.

<b>Solución</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Temperatura</b>
Etanol 70°	2 h	Ambiente
Etanol 70°	1 h	Ambiente
Etanol 70°	una noche	4 °C
Etanol 70°	2 x 1 h	Ambiente
Etanol 70°	3 x 1 h	Ambiente
Xileno	2 x 1 h	Ambiente
Parafina	1 h	60 °C
Parafina	3 h	60 °C

**Tabla 8.** Protocolo de deshidratación de tejido para la inclusión en parafina.

Las muestras de tejido se seccionaron a 14 µm con un microtomo de rotación (Leica 2065, Nussloch, Alemania), se recogieron en un baño de agua a 40 °C y se colocaron en portaobjetos recubiertos de poli-L-lisina (Menzel-Gläser), en este caso sin seriar. Para un correcto estiramiento del tejido y adhesión de las secciones a los portaobjetos, éstos se colocaron unos minutos sobre una placa calefactora tras el seccionamiento y la recogida del tejido.

## ***Inmunofluorescencia indirecta***

Para la detección mediante inmunofluorescencia de antígenos, ya fuese 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) se utilizaron secciones de tejido obtenidas con cualquiera de los dos métodos descritos anteriormente. Inicialmente, se

lavaron las secciones con PBS a temperatura ambiente (3 x 10 min) y, a continuación, se pre-incubaron durante una hora con un medio compuesto por 0,2% (p/v) Triton X-100, 5% (v/v) de suero, en función del animal en el que estuviesen hechos los anticuerpos secundarios que se fueran a utilizar (cabra o burro), y PBS. Al cabo de ese tiempo se incubaron en el medio anterior junto con los anticuerpos primarios seleccionados, durante toda la noche a temperatura ambiente. Como norma general, la inmunofluorescencia indirecta se realizó para identificar dos antígenos (doble inmunofluorescencia indirecta), aunque en ocasiones también se desarrolló para identificar tres (triple inmunofluorescencia indirecta). En la mayoría de los casos, uno de los antígenos que se buscaba 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 9 se especifican los distintos anticuerpos primarios empleados, con sus respectivas diluciones, y se detalla la especie en la que han sido obtenidos, que coincide con la especie del suero utilizado para la incubación. 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 temperatura ambiente y en oscuridad, con los anticuerpos secundarios fluorescentes correspondientes diluidos 1:400 en PBS. En la tabla 9 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, EEUU) a concentración 1:10.000 en PBS, durante 20 min, o con yoduro de propidio (IP; Sigma-Aldrich) a concentración 1:2.000 en PBS durante 30 min. Tras 3 nuevos lavados con PBS, se montaron con medio antidesvanecimiento (ver Apéndice).



Anticuerpo primario	Dilución	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-GFAP (hecho en conejo)	1: 1.000	Cy3, Cy2 o Biotinado anti-IgG de conejo
Anti-GFAP (hecho en ratón)	1: 2.000	Cy3, Cy2 o Biotinado anti-IgG de ratón
Anti-GFP (hecho en cabra)	1: 2.000	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	Cy3, Cy2 o Biotinado anti-IgG de cabra
Anti-Iba1 (hecho en conejo)	1: 1.000	Cy5, Cy3, Cy2 o Biotinado anti-IgG de conejo
Anti-PCNA (hecho en ratón)	1: 3.000	Cy2 anti-IgG de ratón
Anti-reelina (hecho en conejo)	1: 1.000	Cy3, Cy2 o Biotinado anti-IgG de conejo

**Tabla 9.** Anticuerpos primarios y secundarios empleados. CB, calbindina D-28 K; GFAP, proteína ácida fibrilar glial; GFP, proteína fluorescente verde; PCNA, antígeno nuclear de células proliferativas.

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, o bien con un microscopio de barrido confocal láser (Leica TCS SP2, Leica Instruments, Mannheim, Alemania). Posteriormente, las imágenes se procesaron digitalmente con Adobe Photoshop 7.0 para igualar el brillo, el contraste y el balance de color.

### ***Inmunofluorescencia para PCNA***

El marcaje óptimo de PCNA requiere una fijación prolongada con el fijador Bouin 4% (ver Apéndice; Valero et al., 2005). Como el tejido procesado no reunía estas características, fue necesario realizar un tratamiento previo antes de la técnica inmunofluorescente para conseguir un marcaje adecuado (Valero

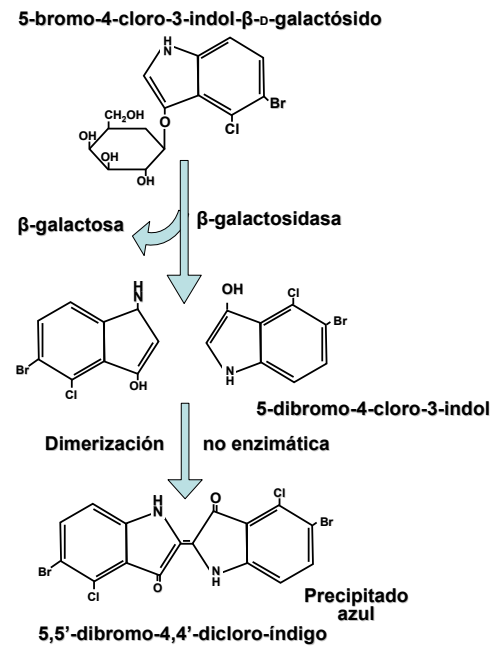
et al., 2005). Las secciones se lavaron en PBS (3 x 10 min) tras lo que se sometieron a una postfijación durante 1 hora con Bouin 4%. Posteriormente, las secciones se lavaron en PBS hasta que perdieron el color amarillo característico del fijador (8 x 10 min). Seguidamente se sometieron a un proceso de recuperación antigénica, sumergiéndolas en tampón citrato (ver apéndice) y calentándolas durante 4 minutos en el microondas (MIG 2125, Sonifer, Murcia) a una potencia de 500 w. Entre el primer y el segundo calentamiento, el tampón se renueva para que las secciones reciban dos choques térmicos. Las secciones se lavaron de nuevo en PBS (1 x 5 min) y se incubaron 20 minutos en una solución de borohidruro sódico al 0,5% en PBS, para reducir el marcaje de fondo debido a los aldehídos. Finalmente, se lavaron en PBS (3 x 10 min) y se realizó la técnica inmunofluorescente correspondiente.

### ***Histoquímica del X-Gal***

La técnica histoquímica del X-Gal permite visualizar la actividad enzimática de la  $\beta$ -galactosidasa en aquellas células derivadas de un proceso de fusión. Una vez obtenidas las secciones (ver "Sacrificio y disección") 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  $\beta$ -galactosidasa hidroliza el enlace O-glucosídico de la lactosa, entre la  $\beta$ -galactosa y la glucosa. En esta técnica se utiliza el X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -D-galactósido) como sustrato de la reacción, que también contiene un enlace O-glucosídico, con la  $\beta$ -galactosa en este caso. Al separarse de la  $\beta$ -galactosa, el 5-bromo-4-cloro-3-indol dimeriza de forma espontánea y se genera un compuesto (5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo) de color azul que precipita en el punto de la reacción (figura 17).

A la mañana siguiente se paró la reacción realizando lavados con PB a temperatura ambiente (3 x 10 min). Las secciones se montaron en portaobjetos gelatinizados y se dejaron a temperatura ambiente. Una vez secas, se cubrieron con medio de montaje acuoso Gel Mount (Sigma-Aldrich) y cubreobjetos. 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 temperatura ambiente (3 x 10 min) y se incubaron con un medio compuesto por 0,2% (p/v) de Triton X-100, 5% (v/v) de suero de cabra o burro (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 temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron con PB (3 x 10 min) y se incubaron durante 90 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad, con el anticuerpo secundario correspondiente marcado con biotina, (1:200) en PB. Tras nuevos lavados con PB (3 x 10 min), se incubaron con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC; Vector, California, EEUU) diluido 1:200, durante 90 min a temperatura ambiente. 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,003% (v/v; sustrato) y 3,3'-diaminobencidina 0,02% (p/v; DAB, cromógeno, Sigma-Aldrich) en tampón Tris-HCl 0,2 M, pH 7,6 a temperatura ambiente. 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.



**Figura 17.** Esquema de las reacciones producidas en la técnica histoquímica del X-Gal.

Se evitó la utilización de material metálico durante la manipulación de las secciones en el tiempo que duraba la reacción, ya que tanto el ferrocianuro como el ferricianuro (del tampón X-Gal) pueden formar precipitados de color azul como consecuencia de su reacción con iones de hierro libres.

## **Técnica TUNEL**

Para la detección de células apoptóticas se utilizó la técnica TUNEL<sup>18</sup>. Esta técnica permite el marcaje de extremos OH-3' libres de ADN formados por endonucleasas durante el proceso de muerte celular programada (Gavrieli et al., 1992). Se basa en la actividad de la enzima transferasa terminal, que añade nucleótidos al azar a los extremos OH-3' libres. Los nucleótidos utilizados para la técnica son dUTP unidos a una molécula de biotina. La biotina permitirá el marcaje mediante técnicas histoenzimáticas o, como en este caso, mediante la gran afinidad que presentan por ella las moléculas de estreptavidina que, a su vez, se encuentran asociadas a una molécula fluorescente.

Las secciones se lavaron con PBS (3 x 10 min). A continuación se incubaron 20 min en una solución de borohidruro sódico al 0.5% en PBS, para reducir el marcaje de fondo (Weruaga-Prieto et al., 1996). Seguidamente, las secciones se lavaron con PBS (3 x 10 min) y se permeabilizaron durante 15 minutos en una solución compuesta por Triton X-100 0,2% (v/v) y citrato sódico 0,1% (p/v) en agua destilada, preparada en el momento de su uso. Las secciones se lavaron de nuevo con PBS (2 x 10 min), tras lo que se sometieron a una incubación con tampón TUNEL durante 30 minutos. Seguidamente, el tejido se incubó en un medio con transferasa terminal y dUTP biotinada en tampón TUNEL durante 2 horas y la reacción se finalizó con tampón SSC<sup>19</sup> (2 x 10 min). De nuevo se realizó un lavado de las secciones en PBS (3 x 10 min) y se procedió al revelado del marcaje específico. Para ello, se añadió estreptavidina unida a una sonda fluorescente diluida en PBS, que permitía su unión al dUTP biotinado. La contratinción con IP y el montaje en portaobjetos se realizó de manera similar que para la técnica de inmunofluorescencia.

---

<sup>18</sup> Del inglés *Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin Nick End-Labeling*

<sup>19</sup> Del inglés *Saline Sodium Citrate*

## ***Controles de especificidad***

Se han utilizado los siguientes controles para comprobar la especificidad de la técnica inmunofluorescente, de la histoquímica y de la técnica TUNEL:

- Omisión de los anticuerpos primarios para detectar uniones inespecíficas de los secundarios.
- Omisión de la enzima transferasa terminal o de los nucleótidos biotinados.
- Omisión de los anticuerpos secundarios fluorescentes y de la estreptavidina Cy2 para detectar emisión de fluorescencia inespecífica o reacciones cruzadas.
- Como control negativo de los anticuerpos para la proteína GFP, se emplearon secciones de animales silvestres sin ningún tipo de tratamiento.
- Para la histoquímica del X-Gal, se revelaron secciones de tejido de animales R26R en los que no se había realizado ningún tipo de trasplante. Como control positivo se emplearon secciones de hígado de los animales trasplantados, dada la abundancia de eventos de fusión en el hígado.

En ninguno de los casos detectamos falsos positivos por uniones inespecíficas.

## ***Tinciones básicas***

En algunos casos se utilizaron las tinciones de Nissl o hematoxilina-eosina para realizar estudios de la morfología general del tejido, como fue en el caso del músculo, la médula espinal o en el análisis del volumen del BO.

### **Nissl**

Los bloques de tejido destinados para esta tinción, en este caso la médula espinal, se postfijaron en formalina (ver Apéndice) durante 4 días. Posteriormente se incluyeron en parafina y se seccionaron como se ha explicado previamente.

En el caso del análisis del BO, se utilizaron secciones de 40  $\mu\text{m}$  previamente obtenidas mediante corte por congelación (ver más atrás). Por ello fue necesario someterlas a un pretratamiento para conseguir resultados óptimos.

En primer lugar, las secciones se postfijaron en formalina tamponada a temperatura ambiente y en agitación durante 10 días. A lo largo de este periodo, la formalina se cambió dos veces. Posteriormente, las secciones se lavaron con PB 0,1 M (3 x 10 min), se montaron en portaobjetos gelatinizados y se dejaron secar en una estufa a 37 °C durante una noche. Transcurrido este tiempo, los portaobjetos con las secciones se introdujeron en una mezcla de etanol absoluto y cloroformo 1:1 (v/v) durante 2 horas para eliminar los lípidos del tejido. Finalmente las secciones se hidrataron en una batería de soluciones de etanol de concentración decreciente hasta mantenerlos en H<sub>2</sub>O destilada. Este proceso de hidratación fue similar para las secciones obtenidas de los bloques de tejido incluidos en parafina.

Para la tinción se calentaron 200 ml de una solución de Tionina (ver Apéndice) en el microondas sin dejarla entrar en ebullición (hasta unos 90 °C). La solución se filtró y se dejó enfriar hasta los 50 °C, tras lo que se introdujeron las secciones en la Tionina durante 1,5 min. Posteriormente, las secciones se pasaron rápidamente por una batería creciente de soluciones de etanol, se deshidrataron en etanol absoluto (2 x 5 min) y xileno (2 x 5 min) y se montaron con Entellan y cubreobjetos.

### **Hematoxilina-eosina**

Las secciones de músculo y de médula espinal destinadas a esta tinción se hidrataron en una batería de soluciones de etanol de concentración decreciente. Posteriormente, se tiñeron con una solución de uso de hematoxilina (ver Apéndice) durante 90 s, se pasaron por H<sub>2</sub>O destilada (30 s) y alcohol ácido (30 s), y se dejaron en agua corriente durante 30 min. Transcurrido este tiempo, las secciones se introdujeron en H<sub>2</sub>O destilada 1 min y se tiñeron con la solución de eosina (ver Apéndice) durante 1 min. Seguidamente, se deshidrataron rápidamente pasándolas por soluciones de etanol a concentración creciente (hasta etanol absoluto), se introdujeron en xileno (2 x 5 min) y se montaron con Entellan y cubreobjetos.

## Análisis de muestras de sangre periférica

En el momento del sacrificio de los ratones a la edad de supervivencia de P150 se extrajo una muestra de su sangre periférica para ser analizada. El objetivo de este análisis fue realizar una aproximación bioquímica que revelase los posibles cambios que el trasplante de médula ósea pudiese producir en los niveles de oxido-reducción o de moléculas neuroprotectoras. Dichas muestras de sangre se recogieron en viales con 10 µl de una solución de EDTA 20 mg/ml (p/v) como anticoagulante. La sangre se centrifugó a 5.000 rpm para conseguir el precipitado de la fracción celular y obtener el plasma (sobrenadante), que se congeló a -20° C hasta su utilización.

### *Determinación de los niveles de glutatión*

Para la determinación de los niveles de glutatión total (GSx) y de glutatión oxidado (GSSG), se utilizó un procedimiento de colorimetría. La reacción se basa en que dos moles de glutatión reducido (GSH) reaccionan con un mol de 5-5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico; DTNB<sup>20</sup>), para formar 1 mol de GSSG más 2 moles de 5-tio (ácido 2-nitrobenzoico; TNB). El GSSG recién formado regenera GSH a expensas de NADPH y la enzima glutatión reductasa (figura 18). Este ciclo presenta una velocidad directamente proporcional a la cantidad de GSH y por tanto, a la cantidad de GSx si tenemos en cuenta la relación siguiente:

$$\text{GSx} = \text{GSH} + 2 \times \text{GSSG}.$$

En el caso de querer determinar el glutatión oxidado, es necesario añadir a la reacción 2-vinilpiridina. Esta sustancia se une al GSH impidiendo su reacción, de manera que la actividad detectable se debe tan sólo al GSSG.

---

<sup>20</sup> Del inglés 5-5'-Dithiobis (2-Nitrobenzoic Acid)

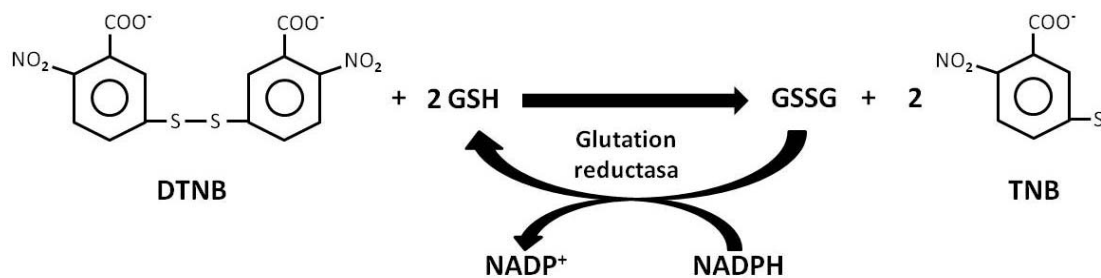


Figura 18. Esquema del ciclo del GSH y GSSG.

Para la detección de ambos parámetros fue necesario elaborar una recta patrón. Para ello se preparó una solución estándar de GSSG 50  $\mu\text{M}$  (Sigma-Aldrich) en ácido sulfosalicílico (Sigma-Aldrich). Posteriormente, se realizaron diluciones sucesivas de dicha solución en ácido salicílico, obteniendo concentraciones de 40, 30, 20, 10 y 0  $\mu\text{M}$ .

Para determinar los valores de GSx, se preparó en primer lugar un medio de reacción con 9,8 ml de tampón fosfato sódico 0,1 M pH 7,5; 50  $\mu\text{l}$  de EDTA 0,2 M pH 8; 2,4 mg de DTNB (Sigma-Aldrich; para una concentración final de 0,3 mM), 3,6 mg de NADPH (Sigma-Aldrich) y 10  $\mu\text{l}$  de glutathione reductasa (Sigma-Aldrich). La reacción se llevó a cabo en placas de ELISA de 96 pocillos. En cada uno se añadieron 10  $\mu\text{l}$  de las soluciones estándar de la recta patrón o de las muestras de plasma, 90  $\mu\text{l}$  de agua y 100  $\mu\text{l}$  del medio de reacción. Cada muestra o estándar se preparó por triplicado. Se midió la absorbancia a 405 nm durante 2,5 min (10 valoraciones cada 15 s) y se extrapolaron los resultados a los obtenidos de la recta patrón de las soluciones estándar.

Para determinar los niveles de GSSG, se mezclaron 130  $\mu\text{l}$  de la muestra de sangre con 5  $\mu\text{l}$  de 2-vinilpiridina (Sigma-Aldrich) y 40  $\mu\text{l}$  de tampón Tris 0,2 M para obtener un pH final entre 5,0 y 7,0. Se dejó incubar la muestra a 4° C durante 1 h. Asimismo, se diluyeron los estándares de la valoración anterior en una proporción de 1/10, de manera que las concentraciones de la nueva recta patrón oscilasen entre 0 y 5  $\mu\text{M}$

La reacción se llevó a cabo con el mismo medio de incubación anterior, añadiendo los mismos componentes a los pocillos de la placa de ELISA (10  $\mu\text{l}$  de los estándares o de las muestras, 90  $\mu\text{l}$  de agua y 100  $\mu\text{l}$  del medio de reacción). Se midió la absorbancia a 405 nm durante 5 min en intervalos de 30 s.



Estos experimentos se realizaron en el laboratorio del Dr. Juan Pedro Bolaños Hernández, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca, con la ayuda y supervisión de la Dra. María Delgado Esteban.

### ***Determinación de los niveles de IGF-I***

Los niveles de IGF-I de la sangre periférica se determinaron mediante la técnica ELISA de tipo sándwich. Más concretamente, se utilizó el kit comercial “*Quantikine Mouse/Rat IGF-I MG100*” (R&D Systems Europe, Abingdon, RU). Brevemente, la técnica ELISA empleada consiste en añadir las muestras que queremos analizar a una placa multipocillo. En el fondo de los pocillos de la placa, se encuentran unidos anticuerpos monoclonales contra la sustancia a analizar, en este caso, IGF-I. De esta manera, las moléculas de IGF-I quedarán ancladas a la placa. Posteriormente se añadirán anticuerpos policlonales también contra el IGF-I, los cuales llevan unidos la enzima peroxidasa de rábano. Dicha enzima metaboliza un sustrato (añadido posteriormente) formando una sustancia coloreada. Mediante un análisis colorimétrico de esta sustancia se puede calcular su concentración.

Al igual que para la determinación de glutation, fue necesario elaborar una recta patrón mediante diluciones seriadas del estándar de IGF-I de concentración de 2.000 pg/ml (p/v), incluido en el kit. El diluyente empleado fue el RD5-38, también incluido en el kit. De esta manera, se obtuvieron soluciones de 2.000, 1.000, 500, 250, 125, 62,5 y 31,25 pg/ml (p/v). Asimismo, se empleó como blanco el diluyente RD5-38, para obtener el último punto de la recta.

Hay que tener en cuenta que para que las absorbancias producidas por la reacción colorimétrica (en función de las concentraciones de IGF-I del plasma) se encontrasen dentro de la recta patrón, fue necesario diluir las muestras de plasma 50 veces.

Se añadieron 50 µl de RD5-38 a cada pocillo de la placa de ELISA. A continuación, se agregaron otros 50 µl de las diluciones de concentración conocida de la recta patrón (por duplicado) y de las diluciones de plasma (por triplicado). La placa mantuvo en agitación constante durante 2 horas a temperatura ambiente, permitiendo la unión de las moléculas de IGF-I a los anticuerpos

de dicha placa. Posteriormente se aspiró y lavó 5 veces cada pocillo con una solución especial de lavado (incluida en el kit) y se añadieron 100  $\mu$ l por pocillo de la solución que contenía el segundo anticuerpo unido a la peroxidasa de rábano. De nuevo se mantuvo la placa en agitación durante otras 2 horas a temperatura ambiente. Se aspiró y lavó 5 veces cada pocillo de nuevo con la misma solución de lavado empleada anteriormente, tras lo que se añadieron 100  $\mu$ l por pocillo de la solución sustrato. La reacción catalizada por la peroxidasa se incubó durante 30 min en oscuridad. Finalmente, se paró la reacción con una solución ácida especial (incluida en el kit) y se leyó la densidad óptica de cada pocillo a una longitud de onda de 450 nm.

Estos experimentos se realizaron en el laboratorio de la Dra. Alicia Rodríguez, del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca, con la ayuda de Mónica del Rey.

## Análisis estadísticos

Los recuentos de las diferentes células marcadas en los diferentes tejidos (positivas para GPF, para PCNA o TUNEL) se realizaron en fotografías tomadas en microscopio de epifluorescencia o confocal, como se ha detallado con anterioridad. En el caso de las células de microglía derivadas de la médula ósea (positivas para GFP) o de las células de Purkinje totales (en la comparación entre animales silvestres y heterocigotos), el recuento se realizó con los programas Neurolucida y Neuroexplorer (MicroBrightField, Magdeburg, Alemania). Dependiendo del estudio realizado, los recuentos se expresaron en forma de número absoluto de células, de porcentaje (con respecto a la totalidad de las células de una región) o de densidad celular (con respecto al área de un campo microscópico elegido al azar, o a la de una región determinada).

Las diferencias cuantitativas se analizaron utilizando diferentes *tests* estadísticos, en función de los grupos que se estuviesen comparando. En el caso de estudiar dos grupos experimentales, se utilizó el test de la t de Student, o de la U de Mann-Whitney en función del grado de cumplimiento de los supuestos de normalidad y homoscedasticidad (cualidad de las muestras con una distribución normal y varianzas similares). En los casos en los que se compararon tres grupos experimentales, se utilizó el test de ANOVA o el de Kruskal-Wallis,

según el grado de cumplimiento de los supuestos anteriores. En el caso de que existiesen diferencias significativas, se llevó a cabo la comparación entre pares de grupos con el análisis *post hoc* de Bonferroni, si los datos eran normales, o con la U de Mann-Whitney, si no lo eran. En cualquier caso, en el apartado “Resultados” se detalla específicamente el test utilizado en cada caso. Para todo ello se utilizó el programa estadístico SPSS en su versión 17.0 para Windows (SPSS, Chicago, EEUU).



# Resultados

*"Si he llegado a ver más lejos que otros, es porque me subí a hombros de gigantes."*

*Isaac Newton*



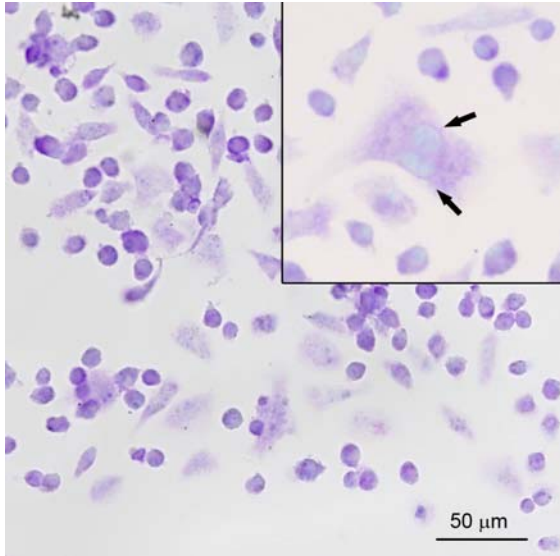
## **Ablación y trasplante de médula ósea**

El empleo de células de la médula ósea como terapia celular es un proceso delicado. En primer lugar, es necesario eliminar la médula ósea de los ratones receptores para sustituirla por una nueva. Este procedimiento letal implica este trasplante para evitar la muerte de los animales. Además, el proceso de extracción de las células de la médula ósea ha de realizarse con sumo cuidado para evitar su lisis, y de esta manera conseguir un trasplante eficaz que asegure la supervivencia de los animales. Por todo ello, fue necesario comprobar en cada uno de los trasplantes la efectividad de cada paso antes de realizar el siguiente para evitar resultados erróneos.

### ***Viabilidad de las células trasplantadas. Supervivencia de los animales receptores***

La primera prueba necesaria a la hora de realizar un trasplante celular es comprobar la viabilidad de las células trasplantadas. De esta manera, después de cada trasplante se llevó a cabo una tinción con Azul Tripán de una pequeña proporción de las células extraídas de los animales donantes, así como el cultivo de otra muestra de las mismas (ver Material y Métodos).

Tan sólo una pequeña proporción de las células captaron el Azul Tripán (menos del 5%), lo que corrobora la integridad estructural de la práctica totalidad de las células trasplantadas (más del 95%) y la viabilidad de las mismas. Las células que se cultivaron se adhirieron al cubreobjetos del fondo del pocillo de cultivo, poniendo de manifiesto también su adecuada viabilidad. Más aún, se pudieron apreciar figuras mitóticas, así como muy distintas morfologías celulares (figura 19). Las células cultivadas no incorporaron el colorante Azul Tripán, corroborando, una vez más, su viabilidad.



**Figura 19.** Tinción con azul de toluidina del cultivo de las células trasplantadas. En la magnificación se puede ver una célula en mitosis con los dos nuevos pronúcleos (flechas).

Tanto en los experimentos en los que se realizó la ablación de la médula ósea con radiación como en los que se eliminó mediante inyecciones de busulfán, se dejaron algunos ratones sin trasplantar. En ambos tipos de experimento, todos los animales que no recibieron trasplante murieron, comprobándose así la eficacia de los mecanismos de ablación empleados. En el caso de los animales irradiados a P19, la muerte de los mismos se produjo entre los 7 y los 10 días posteriores a la radiación. En

el caso de los animales a los que recibieron ablación química (inyecciones de busulfán a la hembra gestante a E17 y E18), la muerte se produjo en torno a los 6 días postnatales. Por el contrario, la práctica totalidad de los ratones trasplantados, salvo excepciones puntuales, sobrevivieron a estos periodos de tiempo, considerándose que el trasplante había tenido éxito en lo referente a asegurar la supervivencia de los animales.

## ***Reconstitución de la hematopoyesis de los animales receptores***

Mediante citometría de flujo de sangre periférica se comprobó el porcentaje de células sanguíneas GFP positivas para determinar la incorporación de las células derivadas de la médula ósea al torrente sanguíneo. En el caso de los ratones irradiados a P19 y trasplantados por vía intravenosa a P20, fue posible hacer un seguimiento continuo de esta incorporación, ya que se realizaron estudios de supervivencia a largo plazo. Se analizó la sangre de estos animales a las 2, 4 y 6 semanas posteriores al trasplante (P34, P48 y P62, respectivamente), así como a la edad de sacrificio de P150 (figura 20 a). El porcentaje de las células GFP positivas se incrementó a lo largo del tiempo, hasta estabilizarse en torno al 75%, tanto en los animales silvestres como en los PCD tras-

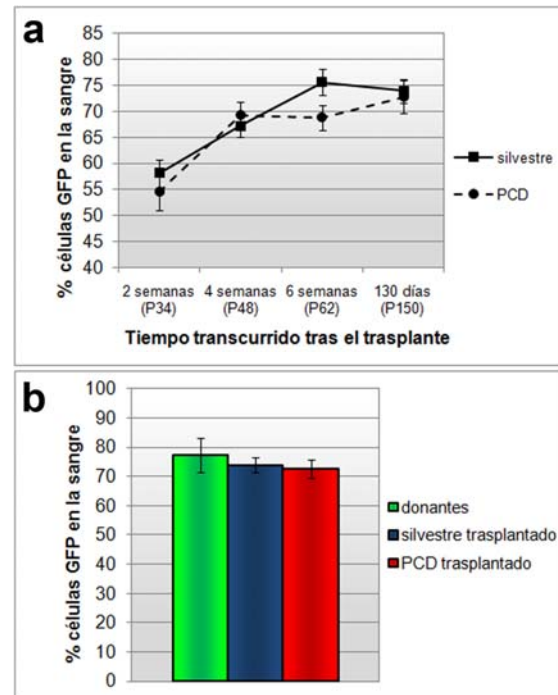


plantados (figura 20). La comparación de este porcentaje con el resultante del análisis de las células sanguíneas de los ratones donantes no reveló diferencias significativas (figura 20 b; receptores silvestres:  $74,51 \pm 1,69$  error estándar de la media (ESM); receptores PCD:  $72,77 \pm 3,13$  ESM; donantes:  $77,25 \pm 5,78$  ESM;  $p > 0,05$ ). Este resultado demuestra la sustitución completa de la médula ósea de los animales receptores, tanto en individuos silvestres como en los mutantes, por la procedente de los donantes, al alcanzarse niveles similares de células GFP positivas en la sangre.

Los ratones sometidos a ablación química de la médula ósea fueron trasplantados de forma intrahepática, debido a su pequeño tamaño (P0). En este caso, el periodo de supervivencia no fue tan largo como en los animales irradiados, de manera que sólo se realizó un análisis de su sangre periférica en el momento del sacrificio, a P20 ó a P30. En este caso, varios ratones presentaron porcentajes de incorporación muy bajos (entre el 0 y el 1%), por lo que se eliminaron del estudio al considerarse que el trasplante no había tenido la eficacia deseada. El análisis de la sangre periférica del resto de animales demostró también un incremento progresivo en el porcentaje de células GFP positivas, aunque con valores más reducidos que los animales trasplantados a P19 por vía intravenosa: supervivencia a P20,  $25,21 \pm 6,82$  ESM; supervivencia a P30,  $34,45 \pm 2,80$  ESM.

## Efectos funcionales del trasplante

Tras la primera serie de trasplantes y una vez comprobada la aceptación de los mismos por parte de los animales receptores, se realizaron una serie de



**Figura 20.** Análisis del porcentaje de células positivas para la GFP de la sangre periférica. **a**, seguimiento del trasplante de animales silvestres y mutantes. **b**, comparación de los porcentajes de células derivadas del trasplante en sangre entre animales donantes y receptores a P150.

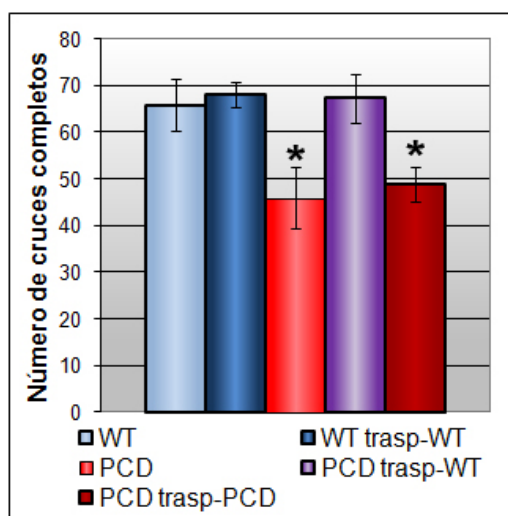
pruebas de comportamiento motor. Posteriormente, estos animales fueron sacrificados para proceder a su análisis histológico. Los resultados de dicho análisis plantearon la realización de una nueva serie de trasplantes para comprobar la capacidad olfativa de los animales. Para facilitar la lectura y comprensión de este capítulo, hemos decidido agrupar en un primer lugar los resultados correspondientes a las pruebas de comportamiento y electrofisiológicas, y posteriormente, los resultados obtenidos tras el análisis histológico de los animales de experimentación.

### Mejoras de la función motora

Se realizaron tres pruebas de comportamiento motor, dependiendo del tipo del trasplante. Como ya se ha detallado en el apartado Material y Métodos, las pruebas de campo abierto y velocidad de desplazamiento se aplicaron a los ratones irradiados y trasplantados a P20, mientras que la prueba del rota-rod se aplicó a los ratones sometidos a ablación química de la médula ósea y trasplantados a P0.

### Resultados en la prueba de campo abierto

Los resultados obtenidos por cada grupo de estudio para cada uno de los parámetros estimados en la prueba de campo abierto se recogen en las gráficas siguientes.

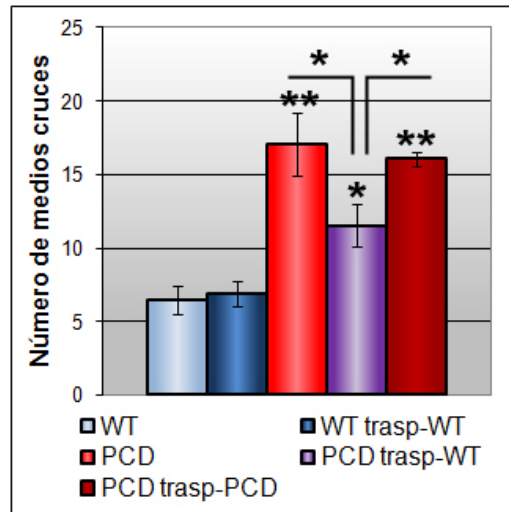


**Figura 21** Número de cruces completos. Cada barra representa la media ± ESM. \*  $p < 0,05$ . WT, tipo silvestre (*wild-type*).

En el caso de los **cruces completos** (figura 21), los análisis estadísticos (ANOVA y *post hoc*) revelaron diferencias significativas entre los grupos de estudio, con un mayor número de cruces completos realizados por los grupos silvestre (WT), silvestre trasplantado (WT trasp-WT) y PCD trasplantado con médula ósea de tipo silvestre (heterotrasplantado; PCD trasp-WT), en comparación con los grupos PCD sin trasplante y PCD trasplantado con médula ósea de PCD (homotras-

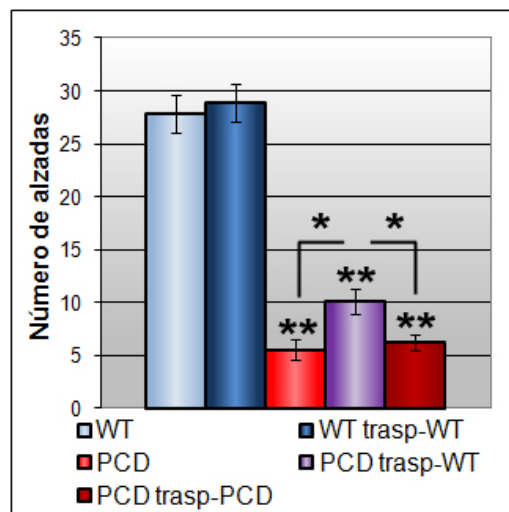
plantado; PCD trasp-PCD;  $p < 0,05$ ). Entre estos dos últimos grupos no se detectaron diferencias significativas.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos para el parámetro **medios cruces** demostró un número mayor en todos los grupos de ratones PCD en comparación con los animales silvestres (figura 22). Estas diferencias fueron significativas en el caso de los PCD trasplantados con médula ósea silvestre ( $p < 0,05$ ) y altamente significativas en el caso de los PCD sin trasplante y PCD trasplantados con médula ósea mutante ( $p < 0,01$ ). A su vez, los ratones PCD heterotrasplantados realizaron un menor número de estos medios cruces que los animales mutantes homotrasplantados y sin trasplante ( $p < 0,05$ ). De esta manera, el grupo de los PCD trasplantados con médula ósea sana realizó un número de medios cruces a medio camino entre los otros dos grupos de ratones mutantes y los grupos silvestres.



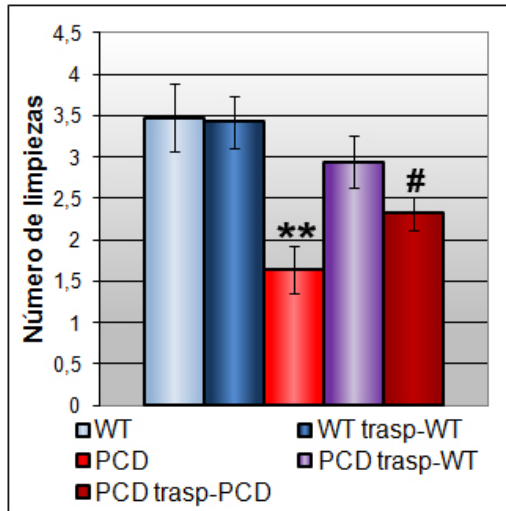
**Figura 22** Número de medios cruces. Cada barra representa la media  $\pm$  ESM. Un asterisco indica  $p < 0,05$ ; dos,  $p < 0,01$ . WT, tipo silvestre (*wild-type*).

El número de **alzadas** de todos los grupos de animales mutantes fue menor que el de los grupos silvestres, presentando diferencias altamente significativas (figura 23;  $p < 0,01$ ). Al igual que en el caso anterior, se detectaron diferencias significativas entre los grupos de ratones mutantes: el número de alzadas de los ratones PCD sin trasplante y trasplantados con médula de PCD fue estadísticamente inferior al observado en los PCD trasplantados con médula ósea de tipo silvestre ( $p < 0,05$ ). De nuevo, el grupo de PCD



**Figura 23.** Número de alzadas. Cada barra representa la media  $\pm$  ESM. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ . WT, tipo silvestre (*wild-type*).

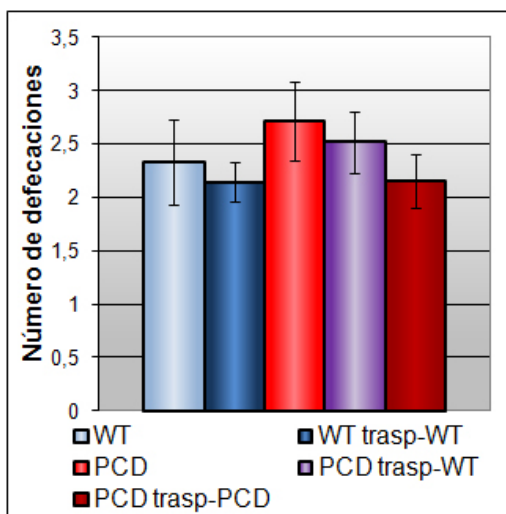
heterotrasplantados presentó un resultado intermedio entre los animales silvestres y los otros grupos de animales mutantes.



**Figura 24.** Número de limpiezas. Cada barra representa la media  $\pm$  ESM. \*\*  $p < 0,01$ ; #  $p < 0,05$  tan sólo entre el grupo de ratones PCD trasplantados con médula de PCD y los dos grupos silvestres. WT, tipo silvestre (*wild-type*).

En el caso de los **eventos de limpieza** (figura 24) no se detectaron diferencias significativas entre los dos grupos de animales silvestres y el grupo de PCD trasplantados con médula silvestre, con valores superiores a los otros dos grupos experimentales. Los ratones PCD sin trasplante presentaron diferencias altamente significativas ( $p < 0,01$ ) con los tres grupos anteriores, y los ratones PCD trasplantados con médula de PCD tan sólo diferencias significativas con los dos grupos de animales silvestres ( $p < 0,05$ ).

Finalmente, no se detectaron diferencias significativas en el número de **defecaciones** de los diferentes grupos de estudio (figura 25;  $p > 0,05$ ), indicando la ausencia de diferencias en los niveles de estrés de los diferentes grupos experimentales.



**Figura 25.** Defecaciones, como indicador de estrés. Cada barra representa la media  $\pm$  ESM. WT, tipo silvestre (*wild-type*).

A modo de resumen, los resultados obtenidos de esta prueba de comportamiento demostraron la ausencia de diferencias comportamentales entre los dos grupos de ratones silvestres, con o sin trasplante, y entre los PCD sin trasplante y homotrasplantados, siendo los resultados de ambas parejas notablemente diferentes. Por el contrario, los resultados obtenidos por los PCD heterotrasplantados fueron, de manera general, intermedios entre los animales silvestres y los

otros dos grupos de PCD.

## Resultados en la prueba de velocidad de desplazamiento

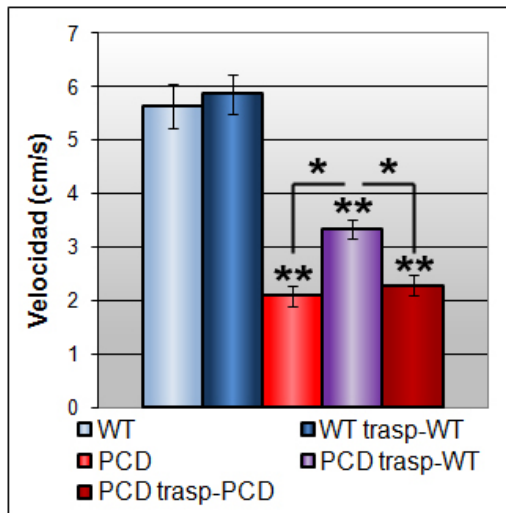
Esta prueba motora nos permitió además de medir la velocidad de los animales, observar ciertas peculiaridades de su patrón de movimiento. A primera vista, el resultado más llamativo fue la diferencia entre los distintos grupos experimentales en la forma de apoyar las patas traseras. Así, los ratones silvestres con y sin trasplante de médula ósea se desplazaron de manera normal, apoyándose sobre los dedos y la planta de sus patas traseras. Por el contrario, la marcha de los ratones PCD y PCD homotrasplantados fue completamente anómala, al desplazarse apoyándose además sobre sus talones. Los ratones PCD heterotrasplantados, aunque presentaron una marcha más irregular que los animales silvestres y, en cierta medida, atáxica, consiguieron desplazarse sobre sus dedos y plantas de las patas, aproximándose a un desplazamiento normal (figura 26).



**Figura 26.** Fotogramas de grabaciones de las pruebas de velocidad de desplazamiento. Ejemplos de animal silvestre, PCD sin trasplantar y PCD trasplantado con médula ósea “sana”. Nótese la forma de apoyar las patas traseras (flechas).

Los datos obtenidos para la prueba de velocidad de desplazamiento se recogen en la figura 27. Podemos observar cómo el patrón de estos resultados es similar a algunos obtenidos en la prueba de comportamiento motor anterior. El tiempo que tardaron en recorrer una distancia de 1 m los ratones silvestres fue menor en comparación con el empleado por los animales mutantes, presen-

tando diferencias altamente significativas ( $p < 0,01$ ). A su vez, los ratones PCD trasplantados con médula ósea de tipo silvestre emplearon menos tiempo que los ratones PCD sin trasplante y trasplantados con médula ósea mutante, diferencias que fueron significativas tras el análisis estadístico ( $p < 0,05$ ).



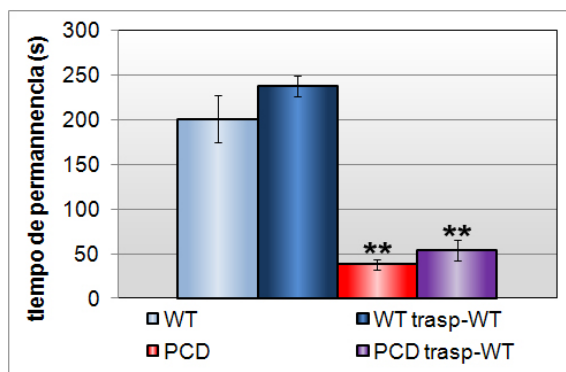
**Figura 27.** Velocidad media de desplazamiento, calculada según el tiempo empleado en recorrer una distancia de 1 m. Cada barra representa la media  $\pm$  ESM. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ . WT, tipo silvestre (*wild-type*).

De nuevo, los ratones PCD heterotrasplantados presentaron valores intermedios entre los animales silvestres y los otros dos grupos de animales PCD, cuyos resultados quedaron claramente diferenciados. Tanto en esta prueba de comportamiento motor como en la anterior, en ningún caso se detectaron diferencias significativas entre los dos grupos de animales silvestres, demostrándose así la ausencia aparente de efectos secundarios del trasplante en la capacidad motora de los animales. Por el contrario, las diferencias detectadas entre los ratones PCD

trasplantados con médula ósea silvestre y los ratones PCD sin trasplantar o trasplantados con médula de PCD, sugieren un efecto beneficioso del trasplante de médula ósea sana en la motricidad de los animales mutantes PCD.

## Resultados en la prueba de rota-rod

La prueba de la varilla giratoria (rota-rod) se realizó tan sólo en los animales trasplantados a P0, cuya médula ósea se había eliminado previamente mediante el empleo de busulfán. En las anteriores pruebas de comportamiento se demostró que tan sólo el trasplante de médula ósea “sana” tenía efectos beneficiosos en la movilidad de los ratones mutantes, a diferencia de la médula ósea procedente de ratones PCD. Por eso, en los



**Figura 28.** Tiempo medio de permanencia en la varilla giratoria. Cada barra representa la media  $\pm$  ESM. \*  $p < 0,01$ . WT, tipo silvestre (*wild-type*).



trasplantes realizados a P0 tan sólo se utilizaron ratones silvestres como donantes. La prueba de comportamiento se realizó a P30, edad suficiente para que los ratones sean capaces de permanecer un tiempo suficiente en la varilla como para obtener resultados fiables. Los resultados de estas pruebas demostraron un tiempo de permanencia mucho mayor en los animales silvestres con y sin trasplante, en comparación con los grupos de animales mutantes (Figura 28;  $p < 0,01$ ). A diferencia de las pruebas de comportamiento anteriores, no se detectaron diferencias significativas entre los ratones PCD trasplantados y sin trasplantar.

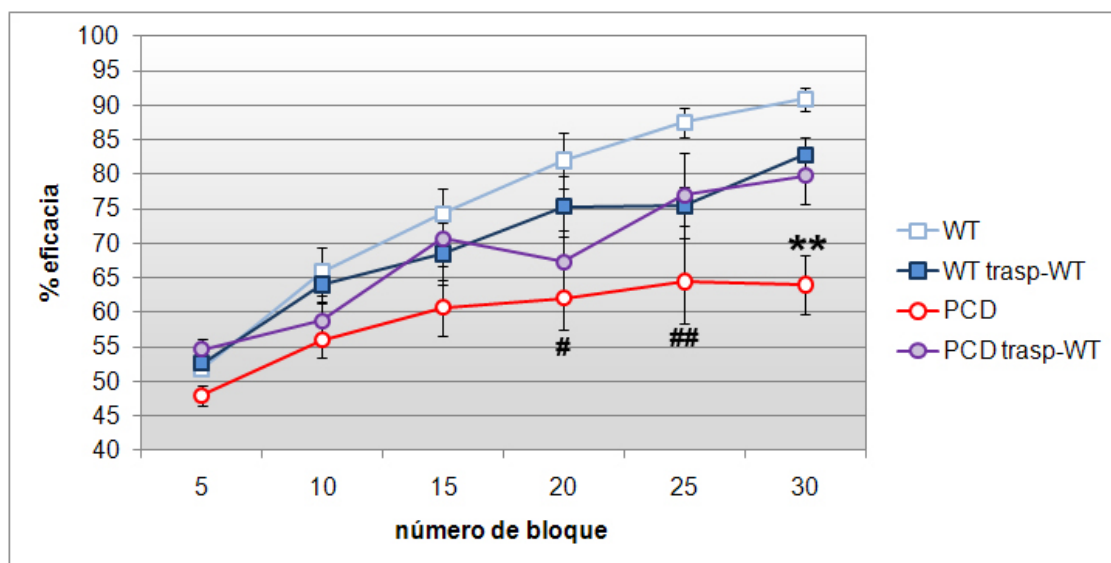
### ***Mejoras de la función olfativa***

Las pruebas de comportamiento olfativo sólo se realizaron con animales irradiados y trasplantados a P20. Como hemos visto en el apartado anterior, las pruebas de comportamiento motor demostraron que los PCD trasplantados con médula ósea mutante no experimentaron ninguna mejoría en su movilidad. Además, el análisis histológico de estos animales reveló que el trasplante de médula ósea de PCD no incrementaba la supervivencia de las células mitrales del BO, a diferencia del trasplante de médula ósea de tipo silvestre (ver más adelante). Por eso, en la segunda serie de trasplantes destinados a la evaluación de la capacidad olfativa se excluyó al grupo de ratones PCD trasplantados con médula ósea de PCD, siendo los grupos experimentales: ratones silvestres sin trasplante, silvestres trasplantados con médula ósea silvestre, PCD sin trasplante y PCD trasplantados con médula ósea silvestre. Estos análisis se realizaron a la edad de P150, a la que se detectaron diferencias en la supervivencia de las células mitrales entre los animales PCD trasplantados con médula ósea sana y los animales PCD sin trasplante. Además, las pruebas de comportamiento realizadas en olfatómetros se complementaron con un análisis electrofisiológico del BO.

### **Análisis comportamental de la capacidad olfativa**

Durante las sesiones de entrenamiento se utilizó la (+)-carvona a una dilución de  $10^{-2}$  como estímulo positivo y la ausencia de odorante (tan sólo el solvente, aceite mineral) como estímulo negativo. A lo largo de estas sesiones, los cuatro grupos experimentales aumentaron progresivamente su porcentaje de

aciertos (figura 29). En el caso de los ratones PCD sin trasplante, este porcentaje máximo de aciertos fue inferior al de los otros tres grupos experimentales. Así, los animales mutantes presentaron diferencias significativas con el grupo silvestre sin trasplante a los 20 y 25 bloques de las sesiones de entrenamiento, y diferencias con los otros tres grupos de estudio a los 30 bloques. Una vez concluidas las sesiones de aprendizaje, se iniciaron las pruebas de detección y discriminación olfativa.



**Figura 29.** Curvas de aprendizaje durante las sesiones de entrenamiento. Obsérvese el incremento y progresiva estabilización de la eficacia en la detección de la (+)-carvona a una concentración de  $10^{-2}$ , para los cuatro grupos experimentales. \*\*  $p < 0,01$ ; #  $p < 0,05$  sólo entre los grupos silvestre y PCD; ##  $p < 0,01$  sólo entre los grupos silvestre y PCD. WT, tipo silvestre (*wild-type*).

### Resultados de las pruebas de detección olfativa

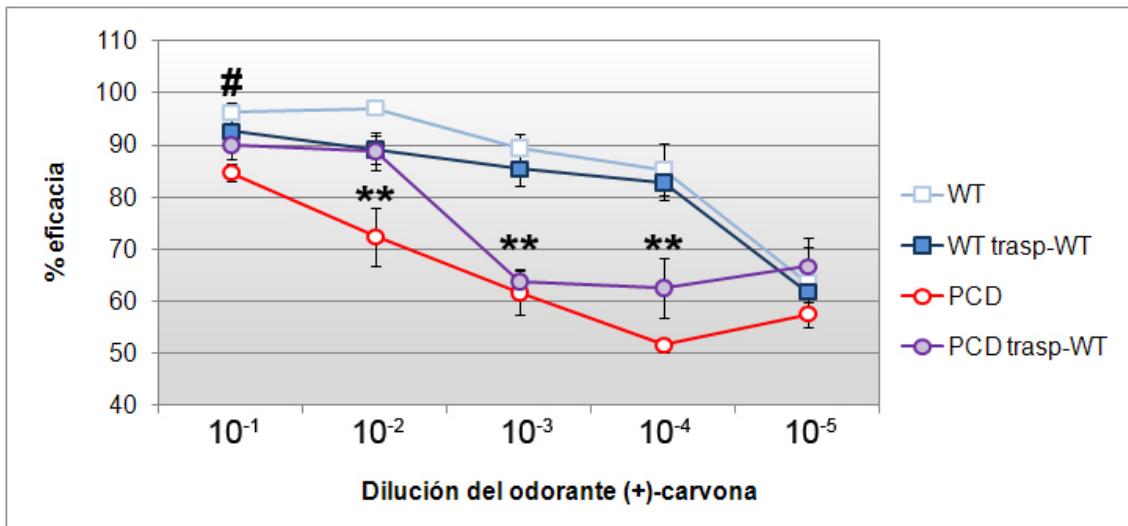
El análisis estadístico de los resultados obtenidos en las pruebas de detección olfativa demostró una mayor sensibilidad de los dos grupos silvestres con respecto a los PCD para la detección de las diferentes concentraciones del odorante. Sin embargo, los ratones PCD trasplantados con médula ósea sana presentaron una capacidad de detección superior a la de los animales mutantes sin trasplante (figura 30).

A una concentración de  $10^{-1}$  del odorante (+)-carvona como estímulo positivo todos los grupos alcanzaron porcentajes de acierto de más del 85%, demostrando la detección del odorante a esta concentración (figura 30). A esta concentración, tan sólo se detectaron diferencias significativas entre los ratones silvestres sin trasplante y los ratones PCD sin trasplante ( $p < 0,05$ ).



A la concentración del odorante de  $10^{-2}$  el grupo de ratones PCD sin trasplante no alcanzó el porcentaje del 85% (figura 30). Además, el análisis estadístico demostró diferencias altamente significativas entre estos ratones y el resto de grupos experimentales ( $p < 0,01$ ). Estos resultados sugieren una deficiencia en los ratones PCD sin trasplantar a la hora de detectar el odorante empleado a esta concentración.

A la concentración del odorante de  $10^{-3}$  los dos grupos de ratones PCD presentaron un nivel de detección significativamente inferior que los dos grupos de animales silvestres ( $p < 0,01$ ) que, aunque presentaron porcentajes de detección algo inferiores que a mayores concentraciones, todavía se mantuvieron por encima del 85% (figura 30). Este resultado se repitió a la concentración de  $10^{-4}$  (figura 30).

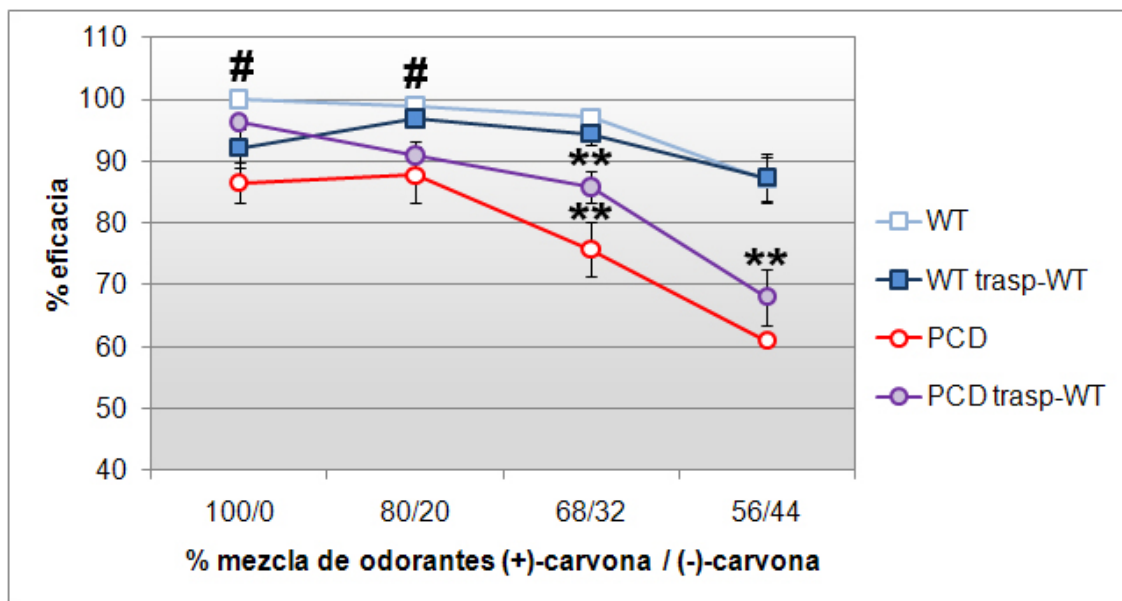


**Figura 30.** Detección olfativa. Eficacia de los ratones en la detección de diferentes diluciones del odorante. Cada punto representa la media  $\pm$  ESM. \*\*  $p < 0,01$ ; #  $p < 0,05$  tan sólo entre los grupos silvestre y PCD. WT, tipo silvestre (*wild-type*)

Finalmente, a la concentración de  $10^{-5}$  no se detectaron diferencias significativas entre los grupos experimentales ( $p > 0,05$ ) y los porcentajes de acierto conseguidos se mantuvieron en torno al 60%, lo que demuestra una incapacidad de todos los animales para detectar el odorante de forma satisfactoria a esa concentración (figura 30).

### Resultados de las pruebas de discriminación olfativa

Los resultados obtenidos en las pruebas de discriminación olfativa son análogos a los de la detección, con una mayor eficacia de los animales silvestres con respecto a los mutantes, pero con una recuperación estadísticamente significativa en los ratones PCD trasplantados. Teniendo en cuenta el umbral de detección del odorante empleado durante las pruebas de detección olfativa, la concentración empleada para las pruebas de discriminación, tanto para la (+)-carvona como para la (-)-carvona, fue de  $10^{-1}$ . De esta manera, nos aseguramos de que todos los animales, sin excepción, pudiesen detectar los odorantes. A medida que estas sustancias se fueron mezclando progresivamente, se puede distinguir un descenso en la eficacia de la discriminación, debido al aumento de dificultad de la tarea (figura 31), si bien con diferencias entre los grupos experimentales.



**Figura 31.** Discriminación olfativa. Eficacia de los ratones en la discriminación de los odorantes a diferentes mezclas. Cada punto representa la media  $\pm$  ESM. \*\*  $p < 0,01$ ; #  $p < 0,05$ , tan sólo entre los grupos silvestre y PCD. En el nivel de mezcla de odorantes 68/32% el grupo PCD presentó diferencias con los dos grupos silvestres y también con el grupo PCD traspl-WT, siendo este último a su vez distinto de los dos grupos silvestres. Al nivel de mezcla 56/44%, los dos grupos silvestres presentaron diferencias con los dos grupos PCD. WT, tipo silvestre (*wild-type*).

Tanto el uso de los dos odorantes sin mezcla (100% de cada uno como estímulo positivo o negativo, respectivamente) como a una proporción del 80/20% y 20/80% (estímulo positivo y negativo, respectivamente), los resultados fueron similares (figura 31). El análisis estadístico empleado reveló diferen-

cias significativas tan sólo entre el grupo de animales silvestres sin trasplante y el grupo de ratones PCD sin trasplante ( $p < 0,05$ ). De todas formas, los cuatro grupos experimentales alcanzaron porcentajes de acierto superiores al 85%, de lo que se puede concluir una buena discriminación de los dos odorantes por parte de todos los animales del estudio, llegando los dos grupos de animales silvestres a niveles de acierto próximos al 100%.

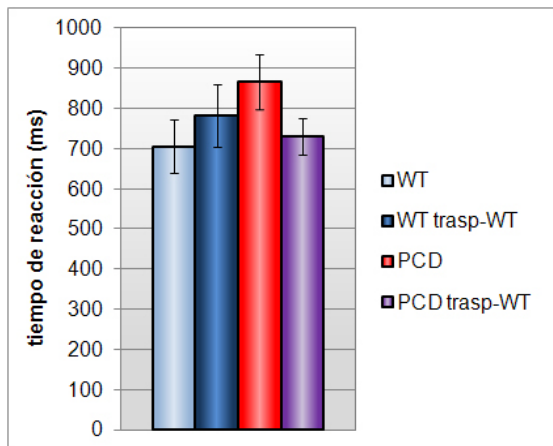
A una proporción de mezcla de los odorantes del 68/32%, el análisis estadístico reveló diferencias altamente significativas entre los distintos grupos experimentales ( $p < 0,01$ ). En este caso, los dos grupos de animales silvestres llegaron a porcentajes de acierto próximos al 95%, mientras que los ratones PCD trasplantados alcanzaron porcentajes alrededor del 85%. Aunque estos tres grupos alcanzaron un buen nivel de discriminación, la eficacia del grupo de PCD trasplantados resultó ser estadísticamente inferior a la de los grupos silvestres ( $p < 0,01$ ). Los ratones PCD sin trasplante obtuvieron valores en torno al 75%, estadísticamente inferiores a los otros tres grupos ( $p < 0,01$ ).

Finalmente, a una proporción de mezcla de los odorantes de 56/44%, el análisis estadístico reveló diferencias altamente significativas entre los dos grupos de animales silvestres y los dos grupos de animales mutantes ( $p < 0,01$ ).

Resumiendo: los resultados derivados de las pruebas de comportamiento olfativo demostraron que la capacidad de detección y discriminación para los odorantes (+)-carvona y (-)-carvona está notablemente disminuida en los ratones PCD. Sin embargo, el trasplante de médula ósea sana recupera parcialmente esta capacidad, aproximándola a los valores de los animales silvestres.

### ***Evaluación del tiempo de reacción***

El análisis de la capacidad olfativa realizado mediante las pruebas de comportamiento anteriores puede estar sesgado por la capacidad de ejecución de la tarea debido a las dificultades en el movimiento de los animales mutantes. Para ello comparamos los tiempos de ejecución del parámetro “retiradas correctas” de las pruebas de comportamiento olfativo (ver sección Material y Métodos). Si los animales detectan el estímulo negativo, retirarán la cabeza del tubo de presentación de la muestra de los olfatómetros lo antes posible, para intentar detectar un nuevo estímulo, tal vez positivo, que les suministre la

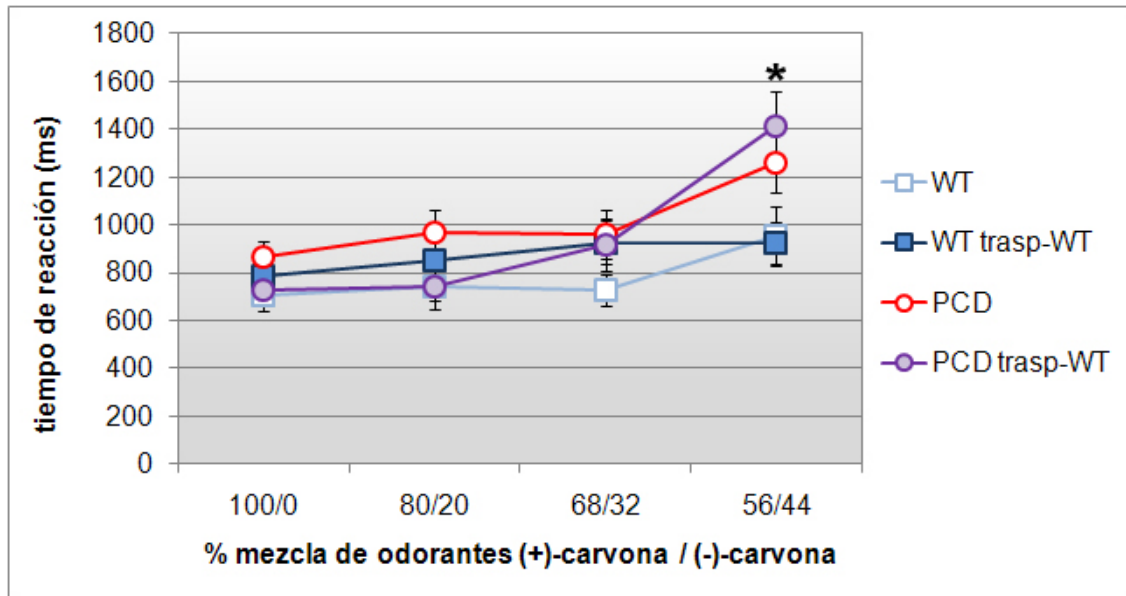


**Figura 32.** Análisis del tiempo de reacción de los grupos de estudio a la concentración del odorante (+)-carvona de  $10^{-1}$ . Cada barra representa la media  $\pm$  ESM. WT, tipo silvestre (*wild-type*)

recompensa de agua. Para tener datos fiables de este parámetro, es necesario que los animales supieran perfectamente cuándo deben retirar la cabeza, por lo que la comparación del tiempo de reacción entre los diferentes grupos se realizó a concentraciones del odorante de  $10^{-1}$ . El análisis estadístico de los valores de tiempo de reacción a esta concentración del odorante no reveló diferencias significativas entre los grupos de estudio (figura 32;  $p > 0,05$ ). Asimismo, se realizó la comparación del tiempo de reacción

de los animales de experimentación a lo largo de todas las pruebas de discriminación (en las que se utilizó una concentración de  $10^{-1}$  para ambos odorantes). En este análisis se puede observar cómo el tiempo de reacción de los grupos de animales silvestres no experimentó variaciones a lo largo de las pruebas. Por el contrario, el tiempo de reacción de los dos grupos de PCD experimentó un aumento en la última prueba, coincidiendo con la mayor dificultad de discriminación (figura 33). Tan sólo a este nivel de mezcla de odorantes (56/44%) se detectaron diferencias significativas entre los dos grupos de ratones silvestres y los de PCD ( $p < 0,05$ ). Hay que tener en cuenta que a esta concentración el nivel de discriminación de los dos grupos de ratones PCD fue estadísticamente inferior al de los silvestres, lo que pudo incrementar el tiempo de reacción.

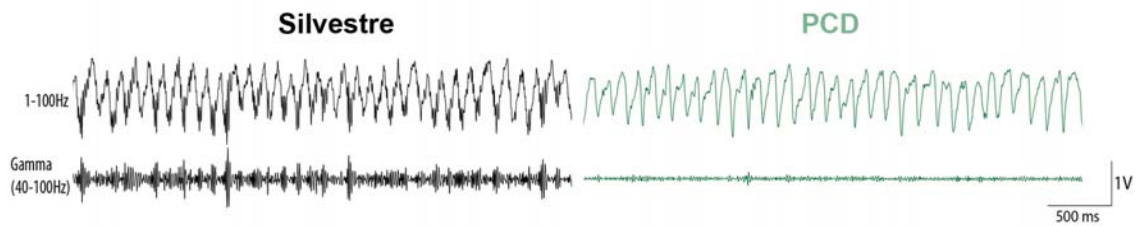
El dato más significativo de este análisis es que en aquellas pruebas en las que todos los grupos realizaron una ejecución de la tarea similar (sin sesgos debidos a una peor detección o discriminación), no se detectaron diferencias significativas en el tiempo de reacción ( $p > 0,05$ ). Por ello se puede descartar la influencia de las dificultades en el movimiento de los PCD en el análisis del comportamiento olfativo.



**Figura 33.** Tiempo de reacción a lo largo de la prueba de discriminación olfativa. Cada punto representa la media  $\pm$  ESM. \*  $p < 0,05$ . WT, tipo silvestre (*wild-type*).

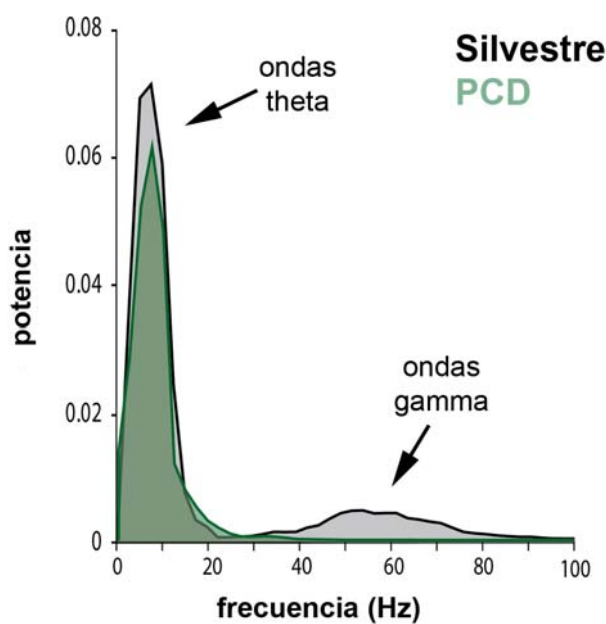
## Análisis electrofisiológico del bulbo olfativo

Una vez colocados los electrodos en el BO de los ratones y tras un tiempo prudencial de recuperación (48 horas), se inició el registro electrofisiológico de los potenciales de campo local de cada animal. En el primer registro analizado se dejó a los animales de forma libre en sus jaulas de origen, lo que constituye para ellos un ambiente familiar. Principalmente se pudieron distinguir dos tipos de ondas: ondas  $\theta$ , con una frecuencia entre 6 y 9 Hz, asociadas con las respiraciones y el olfateo; y ondas  $\gamma$ , con una frecuencia entre 40 y 100 Hz, relacionadas con las descargas sincrónicas de las células de proyección del BO. El análisis inicial de estos registros reveló que los ratones silvestres y mutantes no presentaron diferencias en las oscilaciones  $\theta$ . Sin embargo, la amplitud de las ondas  $\gamma$  resultó ser mucho menor (figura 34).



**Figura 34.** Ejemplo de las señales de potencial de campo local registradas en ratones silvestres y PCD colocados en sus jaulas de origen. La actividad de potencial de campo local típica está compuesta por picos de oscilaciones  $\gamma$  (40-100 Hz) superpuestas en ondas  $\theta$  (6-9 Hz). Nótese la gran diferencia entre la amplitud de las ondas  $\gamma$  mientras que los ritmos  $\theta$  no presentan diferencias.

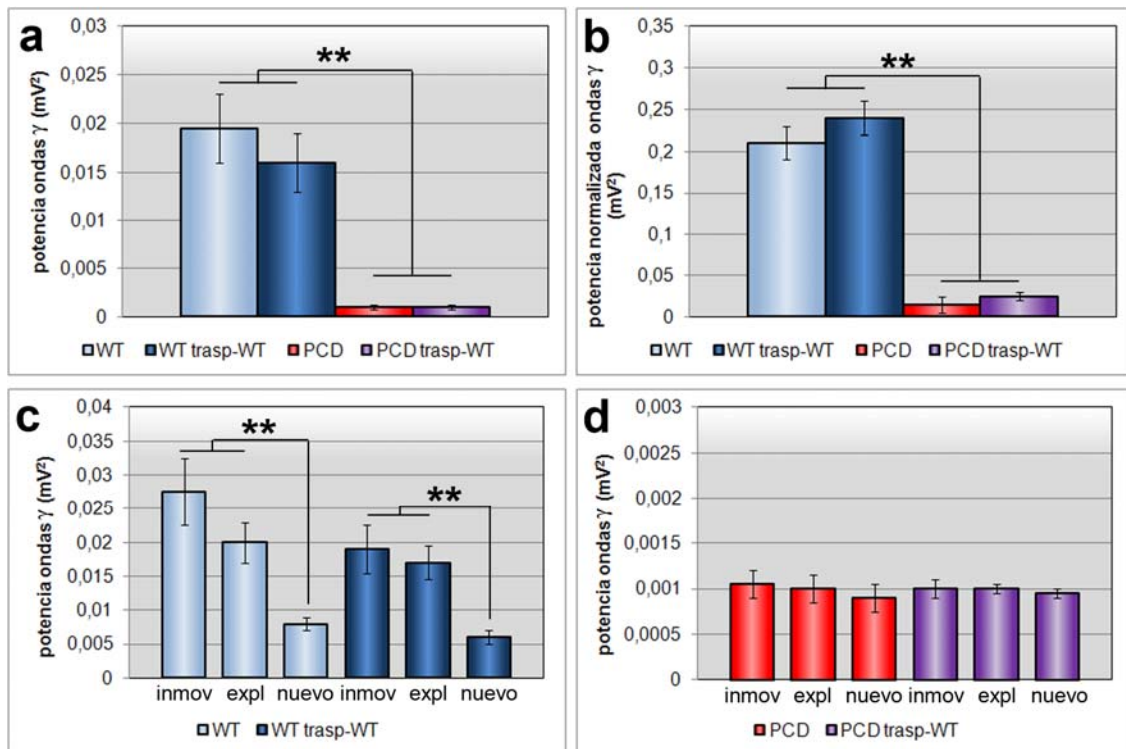
En el espectro de potencia -diagrama que representa la energía espectral para cada frecuencia de las oscilaciones registradas- de los registros realizados, podemos observar la práctica ausencia de las ondas  $\gamma$  en los ratones mutantes (figura 35).



**Figura 35.** Espectro de potencia de los potenciales de campo local registrados. En él se representa la potencia de las oscilaciones en función de su frecuencia. Nótese la gran magnitud de la potencia en la banda donde se encuentran las ondas  $\theta$  (1-10 Hz), similar para los animales mutantes y los silvestres. Asimismo, los ratones PCD carecen de ondas  $\gamma$  (40-100 Hz).

Un análisis más en profundidad de estas oscilaciones (comparando los cuatro grupos experimentales) corroboró los datos anteriores, demostrando además, la ausencia de diferencias significativas en la magnitud de la potencia de las ondas  $\gamma$  entre los dos grupos de animales silvestres y entre los dos grupos de ratones PCD, pero con una marcada diferencia entre ambos genotipos ( $p < 0,01$ ; figura 36 a, b).

El siguiente paso del análisis electrofisiológico consistió en someter a los animales a diferentes patrones de comportamiento, registrando las oscilaciones  $\gamma$  en tres situaciones distintas: con el animal inmóvil, con el animal en fase exploratoria y presentando al animal un olor novedoso, desconocido para él. En este caso, los dos grupos de animales silvestres tuvieron un comportamiento similar, sin diferencias entre la fase de inmovilidad en la jaula y la de exploración, pero con una potencia menor de las ondas  $\gamma$  en presencia del nuevo odorante ( $p < 0,01$ ; figura 36 c, d). El registro de los ratones mutantes fue muy diferente. Además de presentar una potencia de las oscilaciones  $\gamma$  mucho menor que los animales silvestres (como se reflejó anteriormente), los ratones PCD no experimentaron variación alguna en las diferentes fases de comportamiento ( $p < 0,05$ ; figura 36 c, d).

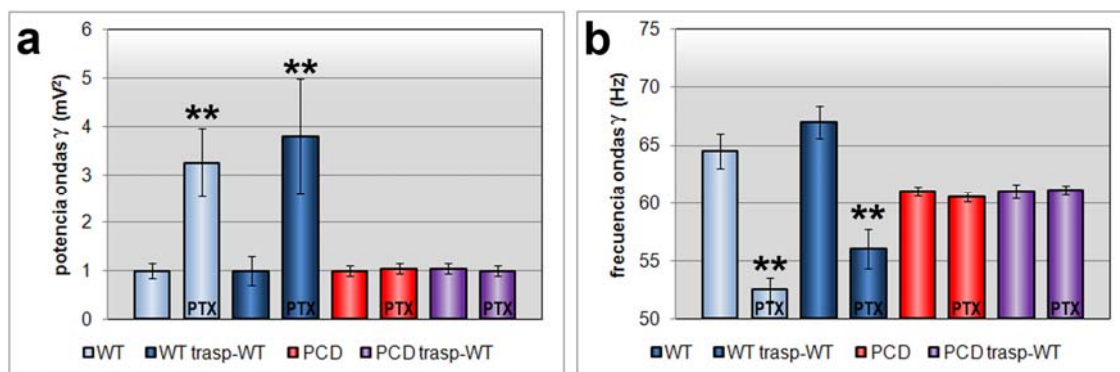


**Figura 36.** Potencia del espectro registrado correspondiente a la banda de oscilaciones  $\gamma$  (40-100 Hz) en los cuatro grupos experimentales. **a**, potencia absoluta; **b**, potencia normalizada (con respecto a toda la potencia de todas las bandas del espectro). **c** y **d**, potencia de las oscilaciones  $\gamma$  en diferentes fases comportamentales. \*\*  $p < 0,01$ . Inmov, animal inmóvil en su jaula; expl, animal explorando; nuevo, presentación de nuevo odorante. WT, tipo silvestre (*wild-type*).

La última parte del análisis electrofisiológico consistió en administrar a los ratones en su BO una concentración no saturante de picrotoxina (PTX), antagonista de los receptores  $GABA_A$  de las células mitrales y que, por tanto, im-



pide su inhibición por parte de los granos. Los resultados de esta prueba revelaron que los dos grupos de ratones silvestres presentaron potencias de sus ondas  $\gamma$  cuatro veces mayor con PTX debido a la ausencia de inhibición de sus células mitrales (figura 37 a). Asimismo, aún dentro de su rango característico de 40-100 Hz, la frecuencia de estas ondas se redujo significativamente ( $p < 0,01$ ; figura 37 b), probablemente por su incremento en potencia. Por el contrario, la potencia y frecuencia de las ondas  $\gamma$  de los grupos de ratones PCD no experimentó variación alguna por efecto de la picrotoxina, lo que encaja con una ausencia o gran escasez de células mitrales (figura 37).



**Figura 37.** Análisis de las oscilaciones  $\gamma$  tras la administración de picrotoxina (PTX). **a**, variaciones en la potencia de las ondas; **b**, variaciones en la frecuencia. Nótese el incremento de la potencia (**a**) y la reducción de la frecuencia (**b**) de las ondas  $\gamma$  tras la administración de PTX en los grupos silvestres, mientras que ambos parámetros permanecen invariables en los animales PCD. \*\*  $p < 0,01$ . WT, tipo silvestre (*wild-type*).

Finalmente, hay que remarcar que el análisis exhaustivo de las oscilaciones  $\theta$  y  $\beta$  (20-40 Hz) en las tres fases comportamentales reveló diferencias significativas globales no sólo entre los dos genotipos, sino también entre los animales irradiados y sin irradiar. Esto sugiere un cierto efecto deletéreo en estos tipos de oscilaciones tanto por parte de la mutación *pcd* como por la propia radiación (ver más adelante y la sección Discusión)

## Diferenciación celular y efectos en los tejidos del hospedador

Una vez realizadas las pruebas de comportamiento se procedió al sacrificio de los animales, a diferentes edades de supervivencia, para analizar la llegada y efectos de las CDMO en diferentes tejidos. El mecanismo de detec-



ción de las células procedentes de la médula ósea trasplantada fue la visualización y cuantificación de las células positivas para la GFP. Además, se realizaron otros tipos de tinciones y técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas para caracterizar dichas células y determinar otros efectos derivados del procedimiento del trasplante celular.

## ***Efectos del trasplante en regiones encefálicas***

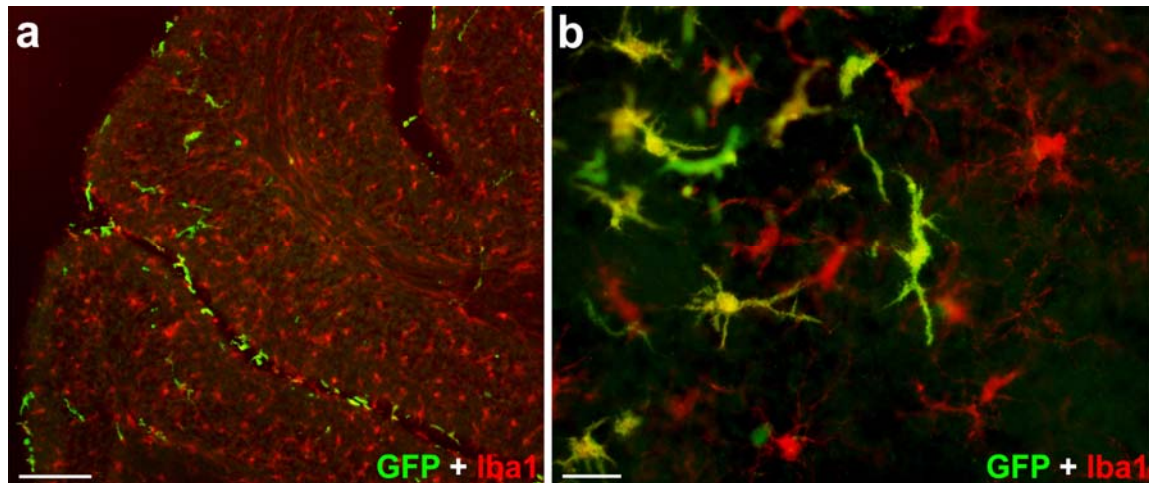
Teniendo en cuenta que el modelo experimental de la presente Tesis Doctoral es un modelo de neurodegeneración, el órgano analizado de forma preferente fue el encéfalo. Según las pruebas de comportamiento anteriormente descritas –motoras, en relación con la ataxia cerebelosa, y olfatorias, en relación con la pérdida de mitrales- las regiones encefálicas en las que hemos centrado nuestro estudio son el cerebelo y el BO. Asimismo, también se evaluaron los efectos de la radiación y el trasplante en las regiones proliferativas relacionadas con el BO (eje ZSV-CMR-BO).

### **Cerebelo**

Desglosaremos el análisis y la cuantificación de las CDMO según el genotipo de los animales receptores. Dentro de cada apartado se especificarán los resultados obtenidos de cada tipo de trasplante y del tipo de médula ósea utilizada.

#### ***Análisis en ratones silvestres***

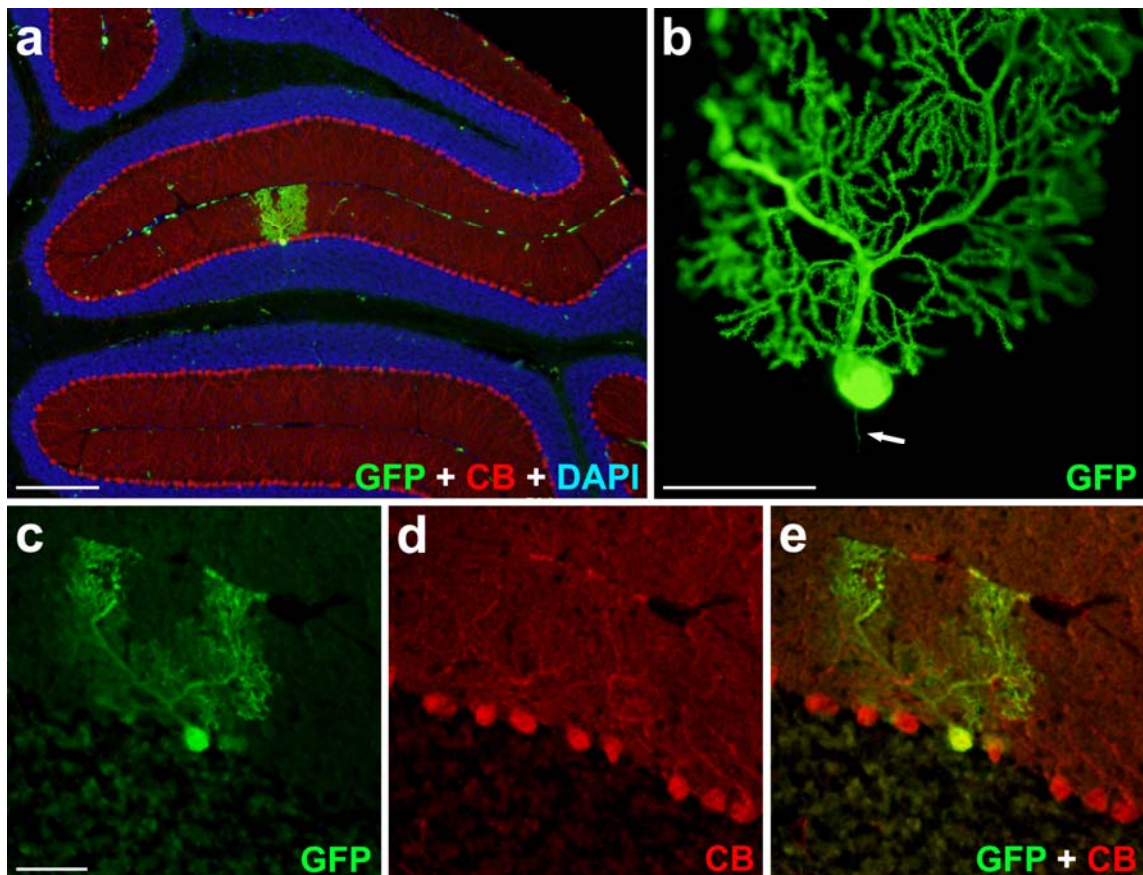
El análisis histológico de las secciones de cerebelo de los animales silvestres irradiados y trasplantados a P20 reveló que la mayor parte de las CDMO fueron células microgliales, positivas para los marcadores GFP e Iba1, a las tres edades de supervivencia estudiadas (P60, P110 y P150; figura 37). Aunque se detectaron estas células por todo el cerebelo, estaban más concentradas en la región más cercana a las meninges (figura 38). En cuanto a su cuantificación, la densidad de las células microgliales creció a lo largo de las edades de supervivencia estudiadas: P60,  $12,32 \pm 3,11$ ; P110,  $16,4 \pm 0,34$ ; P150,  $47,77 \pm 8,74$  (número de células /  $\text{mm}^2 \pm \text{ESM}$ ).



**Figura 38.** Células de microglía en el cerebelo. Imágenes de microscopía de fluorescencia. **a**, vista panorámica general de la corteza cerebelosa en el que se aprecian las células microgliales marcadas con Iba1 (rojo) y aquéllas derivadas de la médula ósea marcadas con GFP (verde). Obsérvese la mayor acumulación de las células de microglía derivadas de la médula ósea hacia las regiones más externas, próximas a la superficie pial. **b**, magnificación de la microglía positiva para GFP mostrando microglía procedente del trasplante (verde-amarillo) y otra endógena (rojo). Barra de escala en **a** = 100  $\mu\text{m}$ ; en **b** = 20  $\mu\text{m}$

En cuanto a los astrocitos, en ningún momento se detectaron células positivas para la GFP y para la GFAP al mismo tiempo, lo que indica la ausencia de astrocitos derivados de la médula ósea.

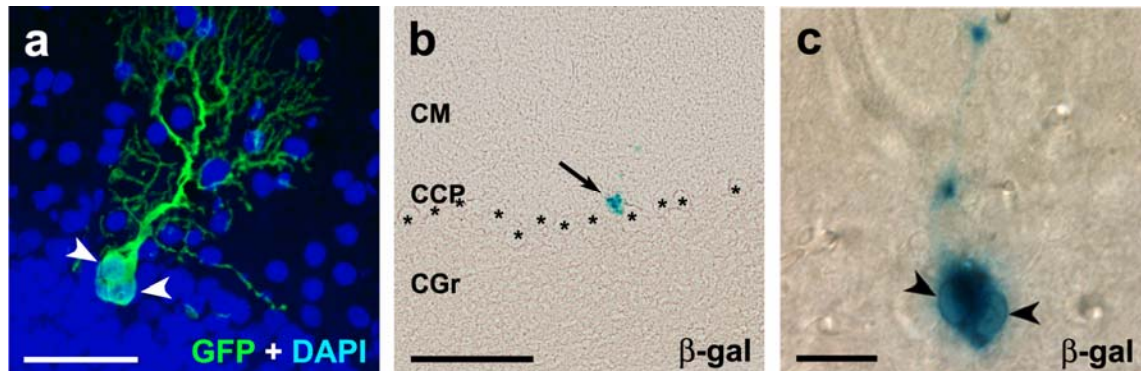
Aunque mucho menos abundantes que las células microgliales, el elemento celular derivado de la médula ósea más llamativo e interesante fueron las células de Purkinje, positivas para los marcadores calbindina y GFP (figura 39). De las tres edades de supervivencia anteriores, tan sólo se encontró este tipo de células a P150, no observándose ninguna ni a P60 ni a P110. Sin embargo, hay que tener en cuenta que a partir de esta edad el número de células de Purkinje derivadas de la médula ósea encontrada en animales silvestres se incrementó con el tiempo (como más adelante se podrá ver al comparar las edades de supervivencia de P150 y P300).



**Figura 39.** Imágenes microscópicas de secciones de cerebelo de ratones silvestres trasplantados con médula ósea silvestre. **a**, vista panorámica de la corteza cerebelosa donde se puede distinguir una célula de Purkinje además de otras células, posiblemente microgliales, positivas para la GFP (verde); la totalidad de las células de Purkinje se han marcado con calbindina (CB, rojo) y los núcleos celulares con DAPI (azul). **b**, magnificación de la misma célula de Purkinje derivada de la médula ósea; nótese las espinas dendríticas y el inicio del axón (flecha). **c-e**, colocalización de la GFP (verde) y la calbindina (CB, rojo) en una misma célula de Purkinje, lo que sugiere una neuroquímica normal de las células derivadas de la médula ósea. Barras de escala a = 250  $\mu\text{m}$ ; b = 50  $\mu\text{m}$ ; c-e = 50  $\mu\text{m}$ .

En cuanto a los mecanismos de formación de las células de Purkinje y las células gliales derivadas de la médula ósea, pudimos distinguir dos mecanismos diferentes. Con respecto a las primeras, podemos decir que el mecanismo seguido fue la fusión celular. Por una parte, en todas ellas detectamos dos núcleos, presumiblemente uno perteneciente a la célula derivada de la médula ósea y el otro perteneciente a la célula de Purkinje original con la que se ha fusionado la anterior. Además, la prueba histoquímica del X-Gal puso de manifiesto la presencia de la  $\beta$ -galactosidasa, presente tan sólo en las células derivadas de un proceso de fusión celular (ver Material y Métodos), como fueron las células de Purkinje (figura 40). Por el contrario, las células microgliales

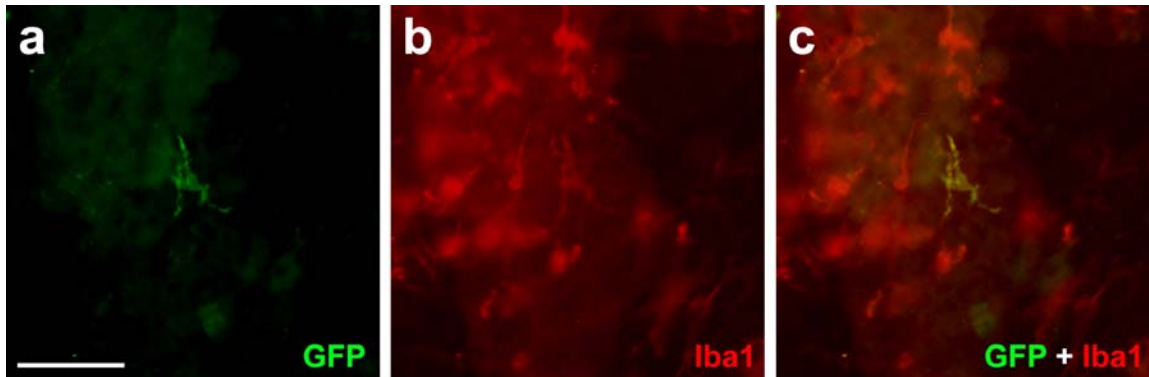
detectadas se formaron por un proceso de diferenciación celular, ya que en ningún caso resultaron positivas para la histoquímica del X-Gal y todas ellas presentaron un solo núcleo celular.



**Figura 40.** Fusión celular en las células de Purkinje. **a**, célula de Purkinje positiva para GFP (verde); los núcleos se han contrateñido con DAPI (azul); obsérvense los dos núcleos dentro de la misma célula (puntas de flecha). **b** y **c**, histoquímica del X-Gal que revela la presencia  $\beta$ -galactosidasa. **b**, imagen panorámica de una sección de cerebelo, con las células de Purkinje señaladas con asteriscos para facilitar su localización; la flecha señala una célula de Purkinje positiva para X-Gal. **c**, célula de Purkinje positiva para el X-Gal, dentro de la que se pueden apreciar dos núcleos (puntas de flecha). CCP capa de las células de Purkinje; CGr, capa de los granos; CM, capa molecular. Barras de escala a = 50  $\mu$ m; b = 100  $\mu$ m; c = 20  $\mu$ m.

En el caso de los animales silvestres sometidos a ablación química de la médula ósea y trasplantados a P0, se detectaron células microgliales derivadas de la médula ósea, pero en una cuantía mucho menor que en los animales irradiados y trasplantados a P20 (figura 41). En este caso, tampoco se detectaron astrocitos derivados de la médula ósea. Curiosamente, tampoco se detectaron células de Purkinje positivas para el marcador GFP. Una posible explicación para este quimerismo tan escaso visto en el encéfalo puede ser el corto periodo de supervivencia tras el que fueron analizados estos animales (ver el apartado Discusión). Al igual que con los animales irradiados y trasplantados a P20, el mecanismo de formación de las células microgliales derivadas de la médula ósea fue un proceso de diferenciación y no de fusión celular

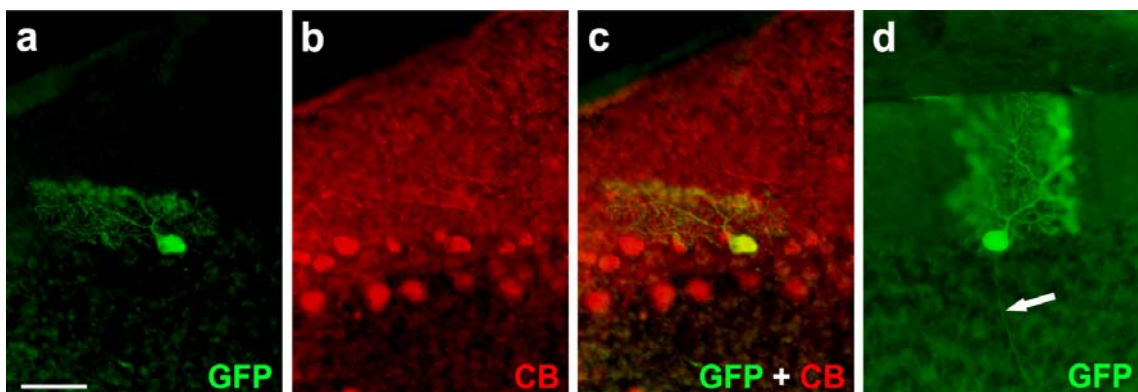




**Figura 41.** Células microgliales (Iba1, rojo) del cerebelo de un animal silvestre trasplantado a P0; en este caso, tan sólo un número muy reducido derivó de la médula ósea (a, c; GFP, verde). Barra de escala = 50  $\mu$ m.

### Empleo de médula ósea de PCD en animales silvestres

En el curso de nuestras investigaciones, quisimos comprobar la viabilidad y eficacia de las células de la médula ósea de ratones PCD para fusionarse con células de Purkinje. De esta manera, decidimos trasplantar un grupo de animales silvestres con médula ósea de PCD (y además con la expresión constitutiva de la GFP), a los que mantuvimos durante un tiempo de supervivencia de 150 días. En este caso, no sólo la incorporación de las células en la sangre periférica de los receptores fue normal y análoga a la procedente de donantes silvestres, sino que el número de células de Purkinje derivadas de eventos de fusión con células derivadas de la médula ósea, en este caso mutante, fue similar al número de estas células derivadas de un médula ósea silvestre (médula silvestre,  $1,38 \pm 0,63$  ESM; médula de PCD,  $2,0 \pm 0,89$  ESM;  $p > 0,05$ ; figura 42). Este hecho demuestra capacidad de la médula ósea de un animal mutante



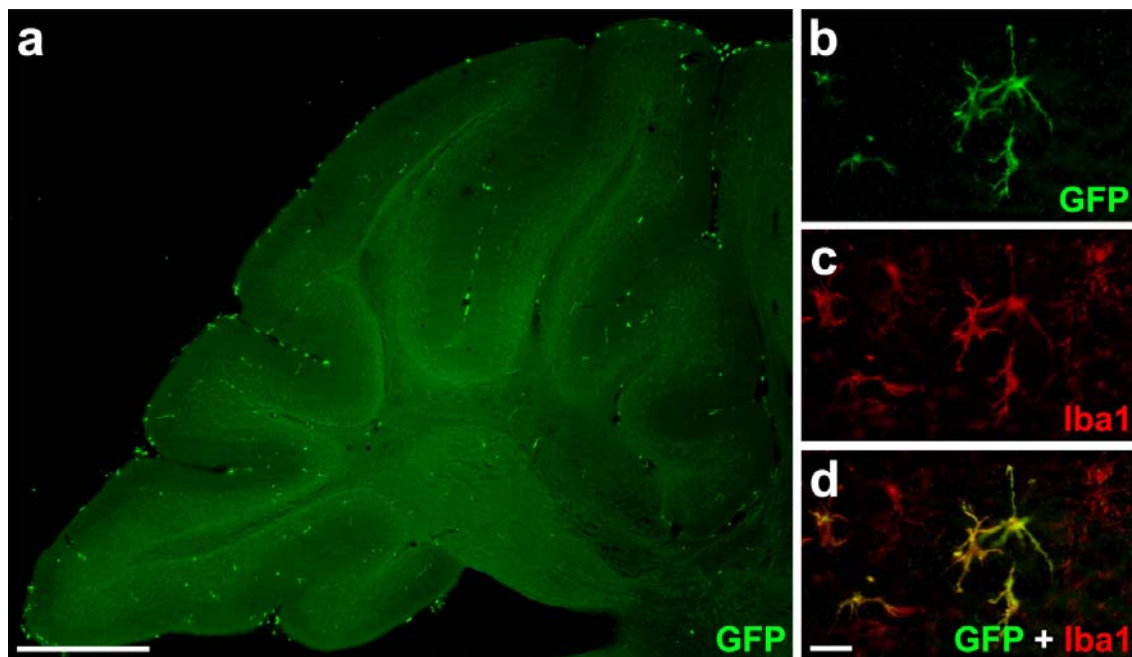
**Figura 42.** Cerebelos de animales silvestres con células de Purkinje derivadas de médula ósea procedente de animales PCD. a-c, colocalización de una neurona positiva para la GFP (verde) y el marcador de células de Purkinje calbindina (CB, rojo). d, Célula de Purkinje positiva para la GFP (verde) en la que se distingue el axón (flecha). Barra de escala = 50  $\mu$ m.

para llegar al encéfalo e integrarse en un sistema neuronal ya establecido, de forma similar a lo que se observa en un animal silvestre.

### **Análisis en ratones *pcd/pcd***

En el caso de los animales mutantes irradiados y trasplantados a P20, también el tipo celular mayoritario derivado de la médula ósea fueron las células microgliales (figura 43). Como en el caso de los animales silvestres, estas células se encontraron distribuidas por todo el cerebelo, con predominancia en las regiones más próximas a las meninges. La densidad celular de células microgliales también aumentó a lo largo del tiempo, como se refleja en las cuantificaciones realizadas a las distintas edades de supervivencia: P60,  $28,20 \pm 4,23$ ; P110,  $47,45 \pm 14,31$ ; P150,  $83,57 \pm 11,32$  (número de células /  $\text{mm}^2 \pm \text{ESM}$ )

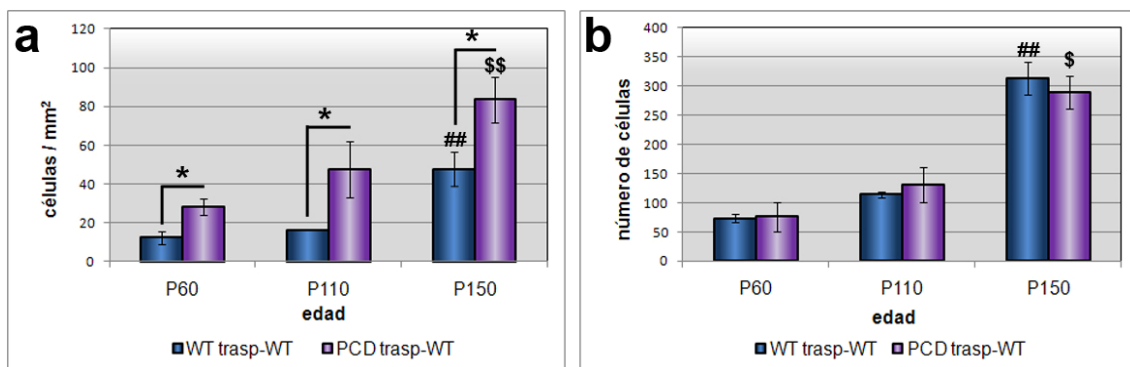
El proceso de formación de células microgliales fue por diferenciación de



**Figura 43.** Imágenes microscópicas de secciones de cerebelo de ratones PCD trasplantados con médula ósea silvestre. **a**, vista panorámica de la corteza cerebelosa donde se pueden apreciar las células microgliales derivadas de la médula ósea, positivas para la GFP (verde). **b-d**, microfotografías tomadas de secciones del mismo animal, con células microgliales (Iba1, rojo), muchas de ellas derivadas de la médula ósea (GFP, verde). Barras de escala a = 500  $\mu\text{m}$ ; b-d = 20  $\mu\text{m}$ .

las CDMO, análogo al de los animales silvestres. Todas las células de microglía detectadas presentaron un solo núcleo y en ningún caso se detectó marcaje para la histoquímica del X-Gal.

Decidimos realizar una comparación de la densidad de células microgliales derivadas de la médula ósea entre los animales silvestres y los mutantes a las diferentes edades de supervivencia. En este punto surgió un problema a la hora de comparar ambos valores: una comparación directa de la densidad celular podía verse enmascarada por la disminución del volumen del cerebelo que tiene lugar en los animales mutantes debido a la pérdida de las células de Purkinje. Por eso fue necesario otro tipo de cuantificación. En este caso, elegimos secciones comparables de los dos grupos experimentales todas ellas pertenecientes a la región del vermis, con una posición espacial lo más sagital posible, para cuantificar los números absolutos de células microgliales GFP positivas. El análisis de los datos de densidad celular junto con el número absoluto de las células de microglía sí nos permitió una comparación menos sesgada entre los dos grupos experimentales (figura 44). Los resultados demostraron una densidad mayor de células microgliales en los animales PCD, tanto a la edad de P60 ( $p < 0,05$ ), como a la de P110 ( $p < 0,05$ ) y a la de P150 ( $p < 0,05$ ; figura 44 a). Sin embargo, el análisis de los números absolutos no reveló diferencias significativas entre los animales analizados a ninguna de las edades de supervivencia ( $p > 0,05$ ; figura 44 b).



**Figura 44.** Análisis en el cerebelo de la microglía derivada de la médula ósea. Comparación entre animales silvestres y mutantes. a, densidad celular expresada en número de células de microglía por mm<sup>2</sup>. b, número total de células por sección. Cada barra representa la media ± ESM. \*  $p < 0,05$  en las comparaciones entre los dos grupos experimentales, en cada edad por separado. # indica diferencias significativas entre las diferentes edades para el grupo de animales silvestres; análogamente, \$ indica diferencias significativas entre las edades del grupo PCD; en ambos casos un símbolo indica  $p < 0,05$ , dos  $p < 0,01$ . WT, tipo silvestre (*wild-type*).

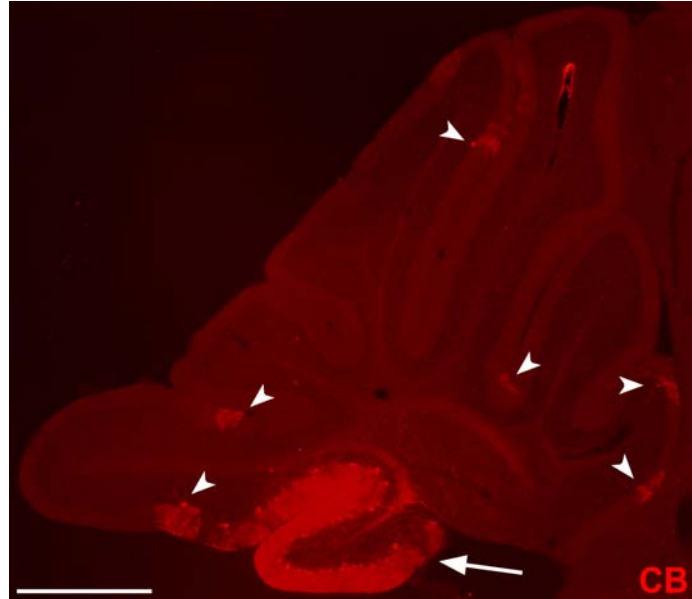
Al igual que en los animales silvestres, no se detectó ningún astrocito derivado de la médula ósea en los animales mutantes PCD trasplantados.

En cuanto a las células de Purkinje, la inmunohistoquímica realizada para la calbindina reveló una ausencia casi total de estas neuronas tanto en los animales mutantes trasplantados como en los animales sin trasplantar, a las diferentes edades de supervivencia. Tan sólo se detectaron en casos muy excepcionales células de Purkinje positivas a la calbindina con morfologías y disposiciones aberrantes. En ningún caso se detectaron células de Purkinje derivadas de la médula ósea positivas para la GFP o la histoquímica del X-Gal. En este sentido, el trasplante de médula ósea no pareció tener influencia en la pérdida de las células de Purkinje de los ratones PCD. Como se detallará más adelante en el apartado Discusión, la razón más plausible de la ausencia de elementos de fusión en los animales mutantes fue el rápido proceso de neurodegeneración. En este sentido, el trasplante de médula ósea se realizó a la edad de P20 cuando el proceso neurodegenerativo de los animales mutantes ya se ha iniciado. Por ello, las células de Purkinje de los animales PCD no sobrevivieron el tiempo suficiente como para ser rescatadas por las CDMO mediante procesos de fusión.

Siguiendo esta línea de razonamiento, el trasplante a P0 de animales a los que se les había eliminado la médula ósea mediante procedimientos químicos tuvo como principal objetivo adelantar el trasplante lo suficiente como para conseguir la incorporación de las CDMO al cerebelo de los ratones PCD. Sin embargo, ni a la edad de supervivencia de P20 ni a la de P30 se detectaron células de Purkinje derivadas de la médula ósea y el proceso degenerativo pareció similar al sufrido por animales de la misma edad que no han recibido el trasplante (figura 45).



**Figura 45** Microfotografía panorámica del vermis de un ratón PCD de P30 trasplantado a P0. Las células de Purkinje se han marcado con calbindina (CB, rojo). El patrón de distribución de estas células es similar al de un animal mutante sin trasplantar de la misma edad. Nótese la avanzada neurodegeneración, quedando tan sólo algunas células de Purkinje dispersas (puntas de flecha), a excepción del lóbulo X (flecha) donde el proceso degenerativo está retardado. Barra de escala = 500  $\mu$ m.



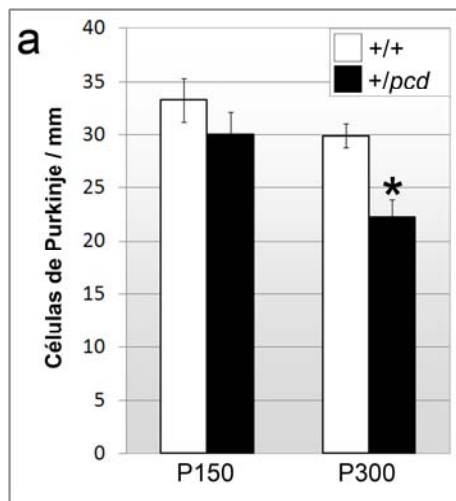
Los resultados referentes a las células gliales derivadas de la médula ósea en estos ratones mutantes trasplantados a P0 son análogos a los de los animales silvestres: no se detectaron astrocitos positivos para la GFP y el número de células microgliales derivadas de la médula ósea fue inferior al de los animales irradiados y trasplantados a P20.

### **Análisis en ratones +/-pcd**

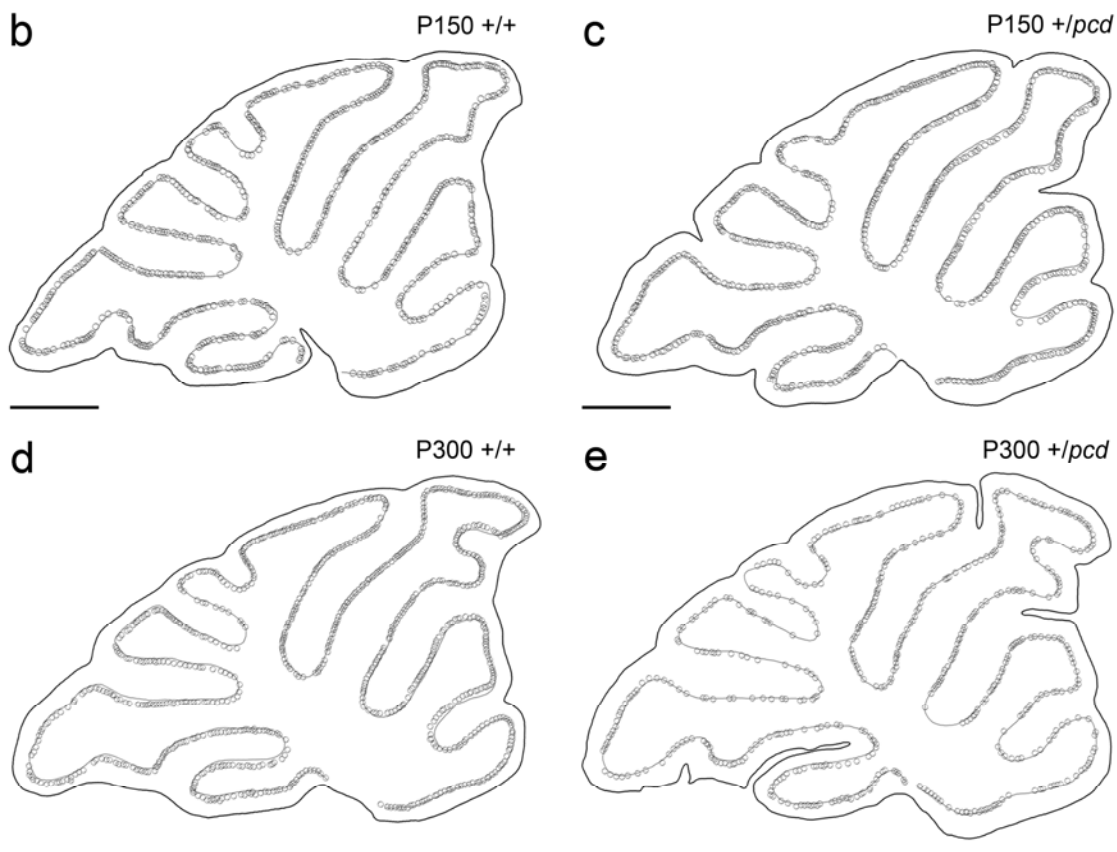
La rápida degeneración de las células de Purkinje de los ratones PCD no permitió determinar si el ambiente neurodegenerativo presente en los animales mutantes ejerce o no un efecto potenciador en la llegada e incorporación de las CDMO al cerebelo.

De esta manera, nos propusimos el empleo de un modelo de neurodegeneración más atenuado, para demostrar el efecto del ambiente neurodegenerativo. Estudios previos habían sugerido que los animales heterocigotos para la mutación *pcd* presentaban una cierta pérdida de células de Purkinje a edades avanzadas (Doulazmi et al., 2002). Por esta razón, decidimos analizar la incorporación de CDMO en el cerebelo de animales heterocigotos a la edad más avanzada posible, dentro de los límites de los tiempos de supervivencia empleados en nuestros experimentos.

En primer lugar decidimos comprobar si la pérdida de células de Purkinje se producía también a las edades experimentales analizadas. Como el proceso degenerativo de los animales PCD comienza en la región del vermis para luego extenderse hacia el resto del cerebelo, analizamos la densidad de las células de Purkinje en dicho vermis. Las edades de estudio empleadas para este análisis fueron P150 y P300. El análisis realizado a la edad de P150 no reveló diferencias significativas en la densidad de células de Purkinje entre animales heterocigotos y animales silvestres ( $p > 0,05$ ; figura 46). Sin embargo, a la edad de P300, los animales heterocigotos presentaron una densidad de células de Pur-

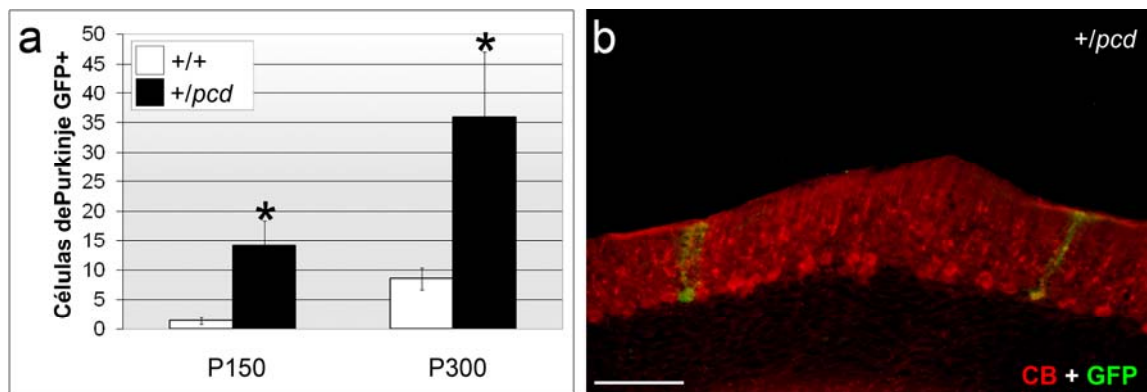


**Figura 46.** Análisis de la densidad de las células de Purkinje en ratones silvestres (+/+) y heterocigotos (+/pcd). **a**, gráficas de la densidad de las células de Purkinje de ambos grupos de estudio a P150 y a P300; los animales +/pcd a P300 experimentan una reducción en dicha densidad. Cada barra representa la media  $\pm$  ESM. \*  $p < 0,05$ . **b-e**, esquemas de NeuroLucida de secciones parasagitales del vermis a P150 y a P300; cada círculo representa una célula de Purkinje. Nótese la depleción de estas células a P300 en los ratones +/pcd. Barras de escala = 500  $\mu$ m.



kinje menor que el grupo control ( $p < 0,05$ ; figura 46). Por el contrario, no se detectaron variaciones en el volumen del vermis a ninguna de las edades estudiadas ( $p > 0,05$ ).

La siguiente fase de este análisis consistió en la detección de células de Purkinje GFP positivas tras el trasplante en ratones heterocigotos y controles. En este caso, el número total de células de Purkinje derivadas de la médula ósea fue significativamente mayor en los animales heterocigotos que en los animales silvestres, tanto a P150 como a P300 ( $p < 0,05$ ; figura 47). Además, se pudo observar un incremento de los eventos de fusión a lo largo del tiempo en ambos grupos de estudio.

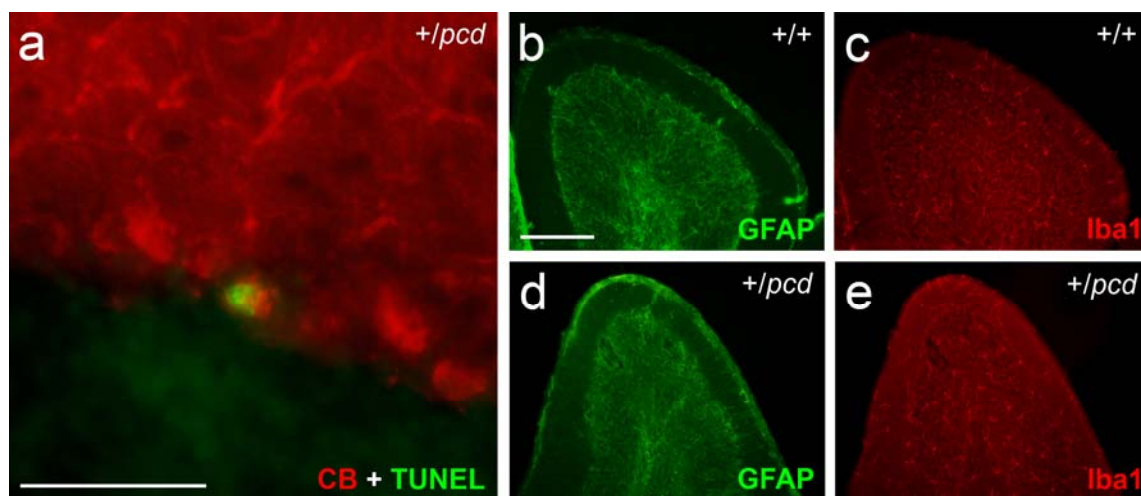


**Figura 47.** Células de Purkinje derivadas de la médula ósea en ratones heterocigotos (*+/pcd*) **a**, gráfico representativo del número de células de Purkinje positivas para la GFP a P150 y a P300; los ratones *+/pcd* presentan un mayor número de dichas células a ambas edades en comparación con los silvestres (*+/+*). Cada barra representa la media  $\pm$  ESM. \*  $p < 0,05$ . **b**, imagen de la corteza cerebelosa de un ratón *+/pcd*. Nótese dos células de Purkinje positivas para la GFP (verde). Todas las células de Purkinje se marcaron con calbindina (CB, rojo). Barra de escala = 100  $\mu$ m.

De esta manera, aunque quedó establecida la relación entre la muerte celular de los animales heterocigotos y el número de eventos de fusión, faltaba estudiar cómo este daño potenciaba la integración de las CDMO. Decidimos analizar directamente la muerte celular en los ratones heterocigotos empleando la técnica TUNEL. En este caso, tan sólo detectamos una única célula de Purkinje en proceso de muerte celular por apoptosis en los animales heterocigotos a P300 (figura 48 a), lo que indicaba la rareza de los fenómenos de apoptosis. Siguiendo esta línea de investigación, buscamos una posible reacción glial en estos grupos de estudio. Sin embargo, la inmunohistoquímica realizada para el marcaje de células microgliales (Iba1) y astrocitos (GFAP) no reveló diferencias

entre los ratones silvestres y los heterocigotos, ni a P150 ni a P300 (figura 48 b-e).

De los resultados obtenidos se puede concluir que la pérdida de células de Purkinje de los animales heterocigotos, aunque mucho más paulatina que en los ratones PCD homocigotos, parece potenciar la llegada y fusión de las CDMO en el cerebelo. Sin embargo, esta atracción no es debida, como en otros casos, a las sustancias liberadas por las células gliales cuando se da un proceso de gliosis reactiva, puesto que no se ha observado ninguna señal de esta reacción.



**Figura 48.** a, célula apoptótica de un animal *+/pcd* a P300 marcada con TUNEL (verde). Todas las células de Purkinje están marcadas con calbindina (CB, rojo). b-e, inmunomarcaje contra GFAP (b, d) e Iba1 (c, e) para localizar respectivamente astrocitos y microglía. Los animales silvestres (*+/+*; b-c) no mostraron diferencias cualitativas en comparación con los heterocigotos (*+/pcd*; d-e) en ningún caso. Barras de escala: en a = 50  $\mu$ m; en b-e = 200  $\mu$ m

## Bulbo olfativo

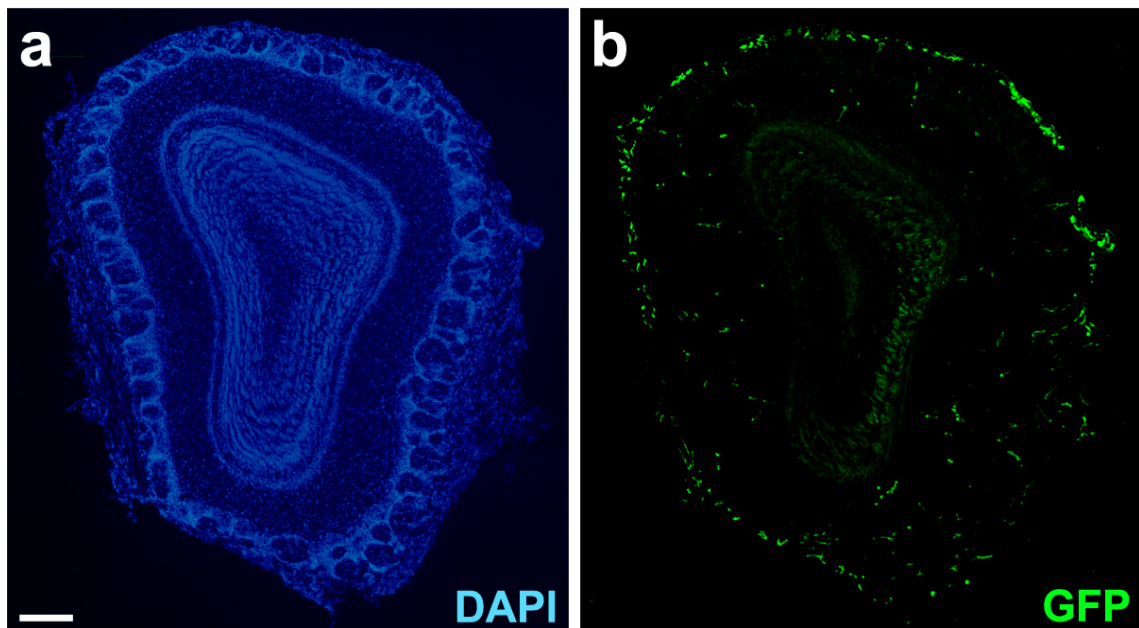
Como se detalló anteriormente, existen muy pocos trabajos en los que se analice la llegada de las CDMO al BO (ver Introducción). Por esta razón, decidimos analizar y cuantificar estas células en esta región encefálica, especialmente cuando nuestro modelo de neurodegeneración sufre un proceso de pérdida neuronal en esta estructura, la neurodegeneración de las células mitrales.

En este apartado se seguirá el mismo esquema de presentación de resultados que en el caso del cerebelo.

### **Análisis en ratones silvestres**

Al igual que en el cerebelo, el tipo celular mayoritario derivado de la médula ósea en los animales silvestres trasplantados fue la microglía. De manera análoga a lo observado en el cerebelo, las células aparecieron distribuidas por todas las capas del BO, pero con una mayor densidad en las capas más externas (figura 49). La cuantificación de la densidad de las células microgliales derivadas de la médula ósea en las diferentes edades de supervivencia también demostró un incremento progresivo a lo largo del tiempo: P60,  $15,39 \pm 1,54$ ; P110,  $18,34 \pm 2,99$ ; P150,  $94,00 \pm 22,13$  (número de células /  $\text{mm}^2 \pm \text{ESM}$ ).

En el caso del BO tampoco se detectó ninguna célula astrocítica derivada de la médula ósea.

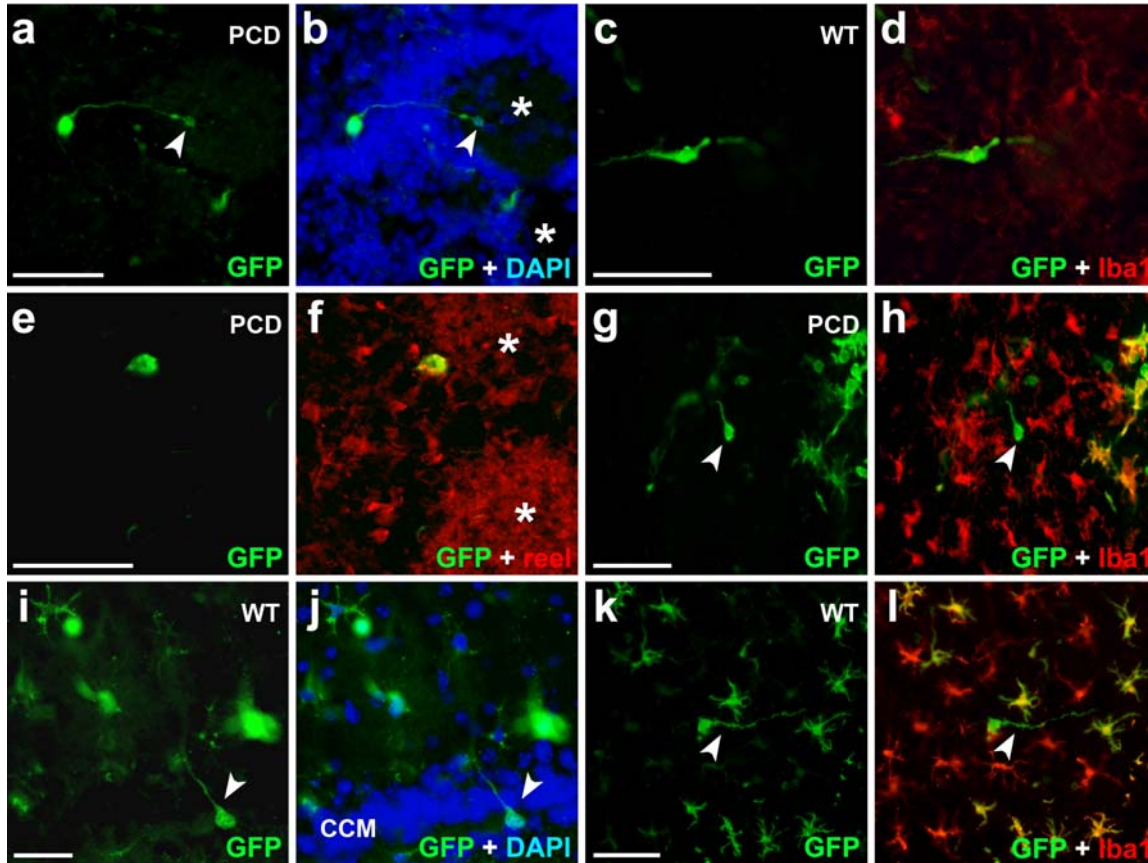


**Figura 49.** Imagen panorámica de una sección de bulbo olfativo de un ratón silvestre en la que se puede apreciar su laminación (a) gracias al marcaje de los núcleos celulares (DAPI, azul). Asimismo, se puede observar la distribución general de las células derivadas de la médula ósea (b) positivas para la GFP (verde), mayoritariamente microglía en la misma sección. Barra de escala = 200 $\mu\text{m}$ .

En cuanto a los elementos neuronales, se detectaron células derivadas de la médula ósea (positivas para GFP) negativas para los marcadores Iba1 (microglía) y GFAP (astrocitos), con una marcada morfología neuronal (figura 50), presentando prolongaciones similares a neuritas. Estos elementos aparecieron en diversas capas del BO: en la CGr, en la CPE y en la CG, regiones donde se sitúan la mayoría de las interneuronas del BO. Como en el caso de



las células de Purkinje, el número de estos elementos neuronales fue escaso, pero también se incrementó a lo largo del tiempo: P60,  $0,25 \pm 0,25$ ; P110,  $2,25 \pm 0,63$ ; P150,  $4,25 \pm 0,48$  (número total de neuronas por BO  $\pm$  ESM).

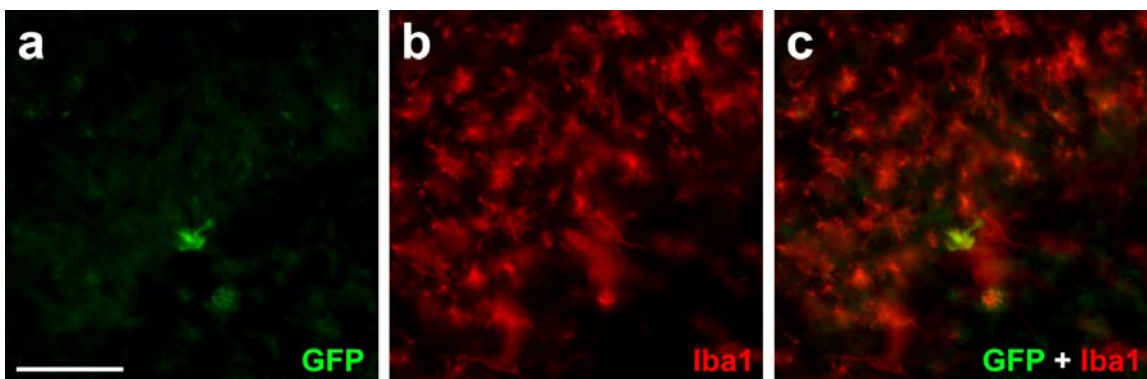


**Figura 50.** Ejemplos de neuronas derivadas de la médula ósea (GFP, verde) en las diferentes capas del BO. Microfotografías correspondientes tanto a animales silvestres como mutantes. **a y b**, célula periglomerular cuyo soma (punta de flecha) se encuentra en el interior de un glomérulo (\*), definido por el marcaje de DAPI (azul) y que extiende una prolongación fuera del mismo. **c y d**, célula yuxtglomerular en el borde de un glomérulo; no colocaliza con el marcaje para Iba1 (rojo), lo que demuestra que no es una célula microglial. **e y f**, célula empenachada externa en la proximidad de un glomérulo (\*), positiva para el marcador reelin (reel, rojo). **g y h**, interneurona (punta de flecha) perteneciente a la capa plexiforme externa, rodeada de microglía (Iba1, rojo); obsérvese su neurita. **i y j**, interneurona de la capa plexiforme interna o de la capa de los granos (punta de flecha). Obsérvese cómo envía una proyección que atraviesa la capa de las células mitrales, densamente marcadas con DAPI (azul). **k y l**, interneurona de la capa de los granos (punta de flecha); al igual que en casos anteriores, tampoco colocaliza para el marcador de microglía Iba1 (rojo). Barras de escala = 50  $\mu$ m. CCM, capa de las células mitrales; WT, tipo silvestre (*wild-type*).

Finalmente, cabe destacar que, a diferencia del cerebelo, donde se detectaron dos procesos de formación de los elementos neurales derivados de la médula ósea, en el BO no se detectó ni un solo evento de fusión celular. Todas

las células positivas para la GFP, tanto microglía, como interneuronas, presentaron un único núcleo y en ningún caso se detectó marcaje para la histoquímica del X-Gal.

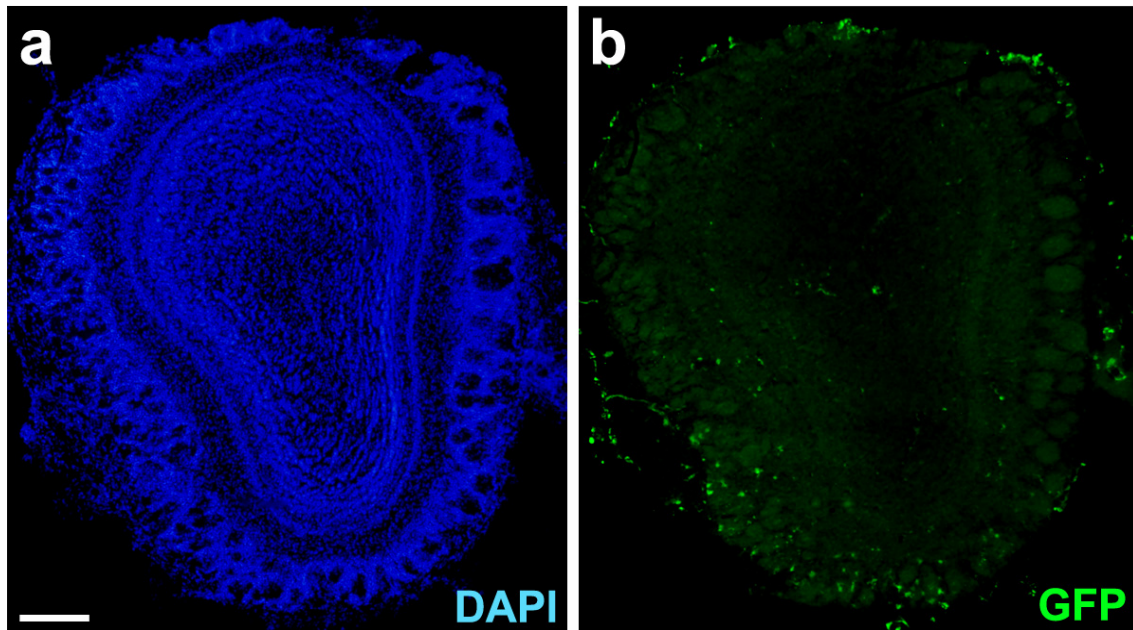
En los animales trasplantados a P0 (cuya médula se eliminó con busulfán), los resultados fueron análogos a los del cerebelo, detectándose tan sólo células microgliales derivadas de la médula ósea (figura 51) y en una cantidad mucho más reducida que en el caso de los animales irradiados y trasplantados a P20. De nuevo, la diferenciación fue el mecanismo por el que se integraron las CDMO en el BO de estos animales.



**Figura 51.** Células microgliales (Iba1, rojo) del BO de un animal silvestre trasplantado a P0; en este modelo, tan sólo un número muy reducido de células derivó de la médula ósea (a, c; GFP, verde). Barra de escala = 50  $\mu\text{m}$ .

### **Análisis en ratones *pcd/pcd***

Como sucedió con los animales silvestres y de forma similar al cerebelo, en los animales mutantes irradiados y trasplantados a P20, el tipo celular mayoritario derivado de la médula ósea fueron las células microgliales (figura 52). En este caso, también se situaron con una mayor profusión en las capas más externas del BO y su densidad aumentó a lo largo del tiempo, como se refleja en las cuantificaciones realizadas a las distintas edades de supervivencia: P60,  $27,96 \pm 2,34$ ; P110,  $66,64 \pm 13,23$ ; P150,  $188,40 \pm 60,93$  (número de células /  $\text{mm}^2 \pm \text{ESM}$ )



**Figura 52.** Imagen panorámica de una sección de bulbo olfativo de un ratón PCD de P150 en la que se puede apreciar su laminación (a) gracias al marcaje de los núcleos celulares (DAPI, azul); asimismo, se puede observar la distribución general de las células derivadas de la médula ósea (b) positivas para la GFP (verde), mayoritariamente microglía. Barra de escala = 200  $\mu$ m.

Asimismo, tampoco se detectaron astrocitos derivados de la médula ósea, aunque sí células con morfología neuronal, negativas para los marcadores gliales utilizados, similares a las encontradas en los animales silvestres. Análogamente, su número, también escaso, aumentó a lo largo de las diferentes edades de supervivencia P60,  $0.75 \pm 0.25$ ; P110,  $1.25 \pm 0.95$ ; P150,  $3.50 \pm 0.87$  (número total de neuronas  $\pm$  ESM). No se encontraron diferencias en el número de estas interneuronas entre ratones silvestres y mutantes a ninguna de las edades analizadas.

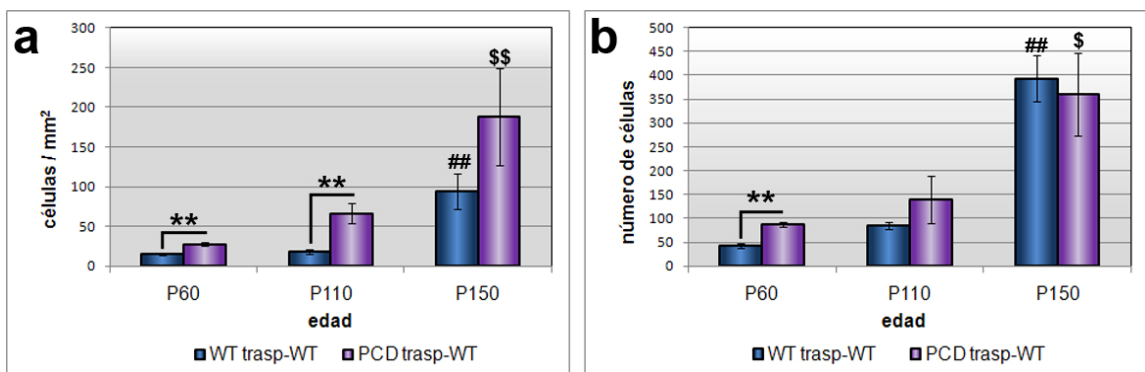
**Tabla 10.** Número medio ( $\pm$  ESM) de interneuronas derivadas de la médula ósea por BO, para cada grupo de estudio y a las diferentes edades analizadas

	P60	P110	P150
Tipo silvestre	$0,25 \pm 0,25$	$2,25 \pm 0,63$	$4,25 \pm 0,48$
PCD	$0,75 \pm 0,25$	$1,25 \pm 0,95$	$3,50 \pm 0,87$

Como sucedió con los individuos silvestres, el proceso de formación de estas células microgliales y de las interneuronas fue por diferenciación de las CDMO: Todas las GFP positivas detectadas presentaron un solo núcleo y en ningún caso se detectó marcaje para de X-Gal.



De forma similar a lo que ocurre en el cerebelo de los ratones PCD, el volumen del BO sufre una disminución debido a la pérdida de las células mitrales. Además, esta pérdida se produce a lo largo de las edades estudiadas, influyendo en la estimación de la densidad a lo largo de las edades de supervivencia y dificultando la comparación de ésta con la de los individuos silvestres. Es por ello que se realizó una cuantificación absoluta en secciones comparables de ambos grupos experimentales, al igual que en el caso del cerebelo (figura 53). Como en el cerebelo, los resultados demostraron una densidad de células de microglía derivadas de la médula ósea mayor en los animales PCD, tanto a la edad de P60 ( $p < 0.01$ ), como a la de P110 ( $p < 0.0$ ; figura 53 a). Sin embargo, el análisis de los números absolutos arrojó otros resultados. Por una parte, demostró que el aumento de la microglía positiva a la GFP de los animales mutantes a lo largo del tiempo no sólo se debió a la disminución del volumen del BO, sino también a una progresiva acumulación de la misma. Por otra parte, la comparación de los dos grupos experimentales tan sólo reveló diferencias significativas entre los animales analizados a la edad de supervivencia de P60 ( $p > 0.01$ ; figura 53 b).



**Figura 53.** Análisis en el bulbo olfativo de la microglía derivada de la médula ósea. Comparación entre animales silvestres y mutantes. **a**, densidad celular expresada en número de células de microglía por mm<sup>2</sup>. **b**, número total de células por sección. Cada barra representa la media ± ESM. \*\*  $p < 0.01$  en las comparaciones entre los dos grupos experimentales, en cada edad por separado. # indica diferencias significativas entre las diferentes edades para el grupo de animales silvestres; análogamente, \$ indica diferencias significativas entre las edades del grupo PCD; en ambos casos un símbolo indica  $p < 0,05$ , dos  $p < 0,01$ . WT, tipo silvestre (*wild-type*).

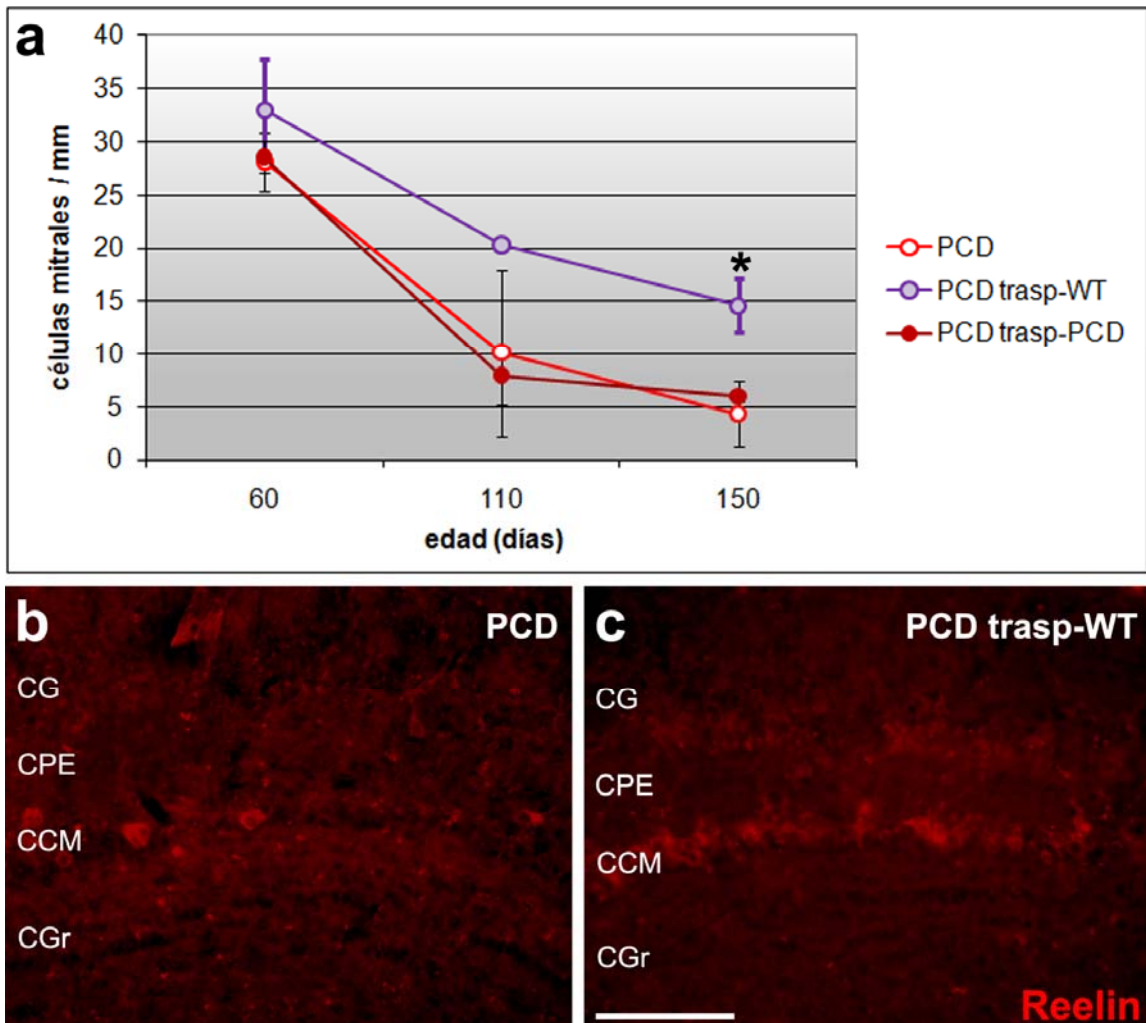
Finalmente, en el caso de los animales trasplantados a P0, como cabía esperar, los resultados fueron similares a los de los animales silvestres, teniendo en cuenta que el análisis se realizó antes de haber comenzado el proceso de gene-

rativo en el BO. Tan sólo se detectaron células microgliales derivadas de la médula ósea en una cantidad mucho más reducida que en el caso de los animales irradiados y trasplantados a P20, generadas por un proceso de diferenciación y no de fusión.

### **Análisis de la densidad de células mitrales en los ratones PCD**

Como se expuso anteriormente, no se encontraron células mitrales derivadas de la médula ósea en ninguno de los grupos experimentales. Sin embargo, la degeneración de este tipo celular sufrida por los ratones PCD es más lenta y tardía que la de las células de Purkinje (Mullen et al., 1976; Greer y Shepherd, 1982). De esta manera, es posible que el trasplante realizado a P20 pudiese tener alguna influencia indirecta en el proceso neurodegenerativo de las células mitrales de los ratones PCD, a diferencia de lo ocurrido con las células de Purkinje (ver más atrás). Por eso, decidimos hacer un recuento de las células mitrales de los ratones PCD a las distintas edades de supervivencia, comparando los animales sin trasplante con los trasplantados, tanto con médula ósea de tipo silvestre como mutante. De esta manera, se pudieron comprobar posibles efectos sólo debidos a la radiación y no al trasplante de médula ósea “sana”.

Los resultados obtenidos demostraron diferencias significativas en la densidad de células mitrales a la edad de P150 ( $p < 0.05$ ; figura 54). A esta edad, los animales heterotrasplantados (con médula ósea de tipo silvestre) presentaron una densidad de células mitrales significativamente mayor que los otros dos grupos analizados. De esta manera, el trasplante de médula ósea de tipo silvestre presentó un efecto neuroprotector que disminuye o al menos ralentiza la degeneración de las células mitrales en los ratones PCD.

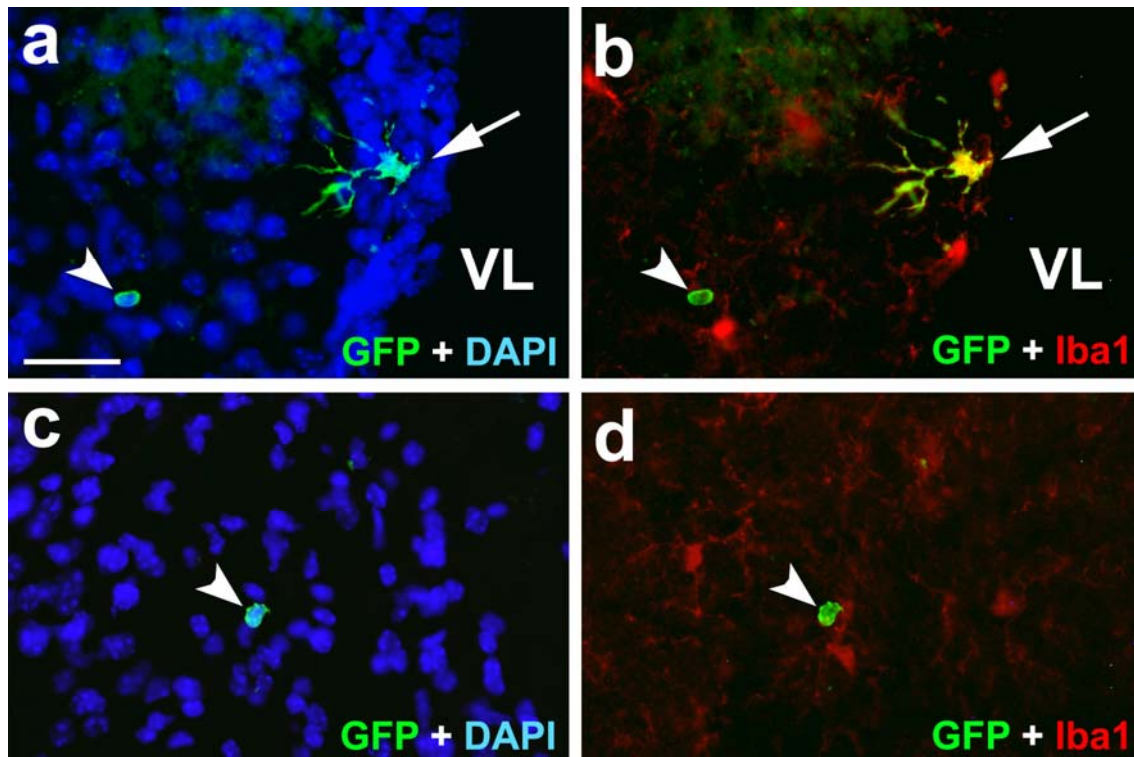


**Figura 54.** Análisis de la densidad de células mitrales en los ratones PCD. **a**, gráfica que muestra la degeneración progresiva en ratones PCD sin trasplante, heterotrasplantados y homotrasplantados. Cada punto representa la media  $\pm$  ESM. \*  $p < 0,05$ . **b** células mitrales de un animal mutante sin trasplante marcadas con reelina (rojo); **c**, las mismas células de un animal mutante homotrasplantado. CG, capa glomerular; CPE, capa plexiforme externa; CCM, capa de las células mitrales; CGr, capa de los granos. Barra de escala = 100  $\mu$ m. WT, tipo silvestre (*wild-type*)

La capacidad olfativa de los ratones PCD no se había estudiado con anterioridad. Además, la densidad de células mitrales incrementada en los ratones PCD trasplantados con médula ósea sana sugirió la posibilidad de cambios en la capacidad olfativa de estos animales. Fue en este momento cuando decidimos realizar una nueva serie de trasplantes para analizar el comportamiento olfativo de los ratones mutantes con y sin trasplante (ver más atrás).

## Eje proliferativo ZSV-CMR-BO

La ZSV es, junto con el giro dentado de la formación hipocampal, una de las dos regiones neurogénicas del encéfalo de los mamíferos adultos. Su continuación física, la CMR, supone la vía principal de llegada de nuevos neuroblastos al BO para asegurar la correcta reposición de las interneuronas perdidas en esta estructura a lo largo de la vida del animal. Teniendo en cuenta la detección en el BO de interneuronas derivadas de la médula ósea trasplantada y que la ZSV es un conocido nicho de células madre, nos propusimos el análisis de esta estructura de proliferación y migración para determinar una posible integración de células madre derivadas de la médula ósea en la misma.



**Figura 55.** Presencia de células derivadas de la médula ósea positivas para la GFP (verde) en las regiones neurogénicas rostrales. Las células microgliales marcadas con Iba1 (rojo) fueron el tipo celular derivado de la médula ósea más abundante en la ZSV (**a** y **b**, flechas). A su vez, se detectaron algunas células pequeñas positivas para la GFP pero negativas para Iba1 (puntas de flecha) en diferentes regiones encefálicas, incluidas regiones proliferativas como la CMR (**c** y **d**). Los núcleos celulares se contratiñeron con DAPI (azul). VL, ventrículo lateral. Barra de escala = 30  $\mu$ m.

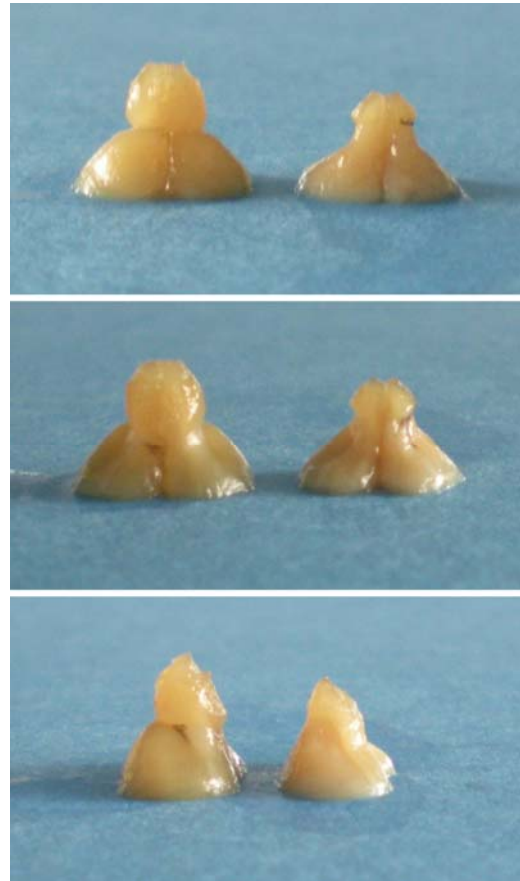
El análisis inmunohistoquímico no reveló la presencia de ninguna célula GFP positiva con morfología típica o marcadores propios de neuroblastos o células proliferativas. Sin embargo, se detectó la presencia de células muy pequeñas derivadas de la médula ósea a lo largo del eje ZSV-CMR-BO. Estas células también aparecieron en otras regiones del parénquima cerebral a las diferentes edades de estudio y resultaron negativas tanto para marcadores neuronales como gliales (figura 55).

Lo que sí resultó llamativo durante el análisis de estas regiones neurogénicas fue el pequeño tamaño de la CMR de los animales irradiados y trasplantados, en especial a las edades de supervivencia más avanzadas (ver más adelante). Además, la estructura de la ZSV también parecía estar alterada, y aún más impactante resultó el pequeño tamaño del BO

de los animales sacrificados a la edad de P300 (figura 56). Estaba claro que todo el procedimiento de radiación y trasplante había influido en la estructura tanto del BO como de las regiones proliferativas y de migración. Por ello nos propusimos realizar un análisis más exhaustivo de estas regiones

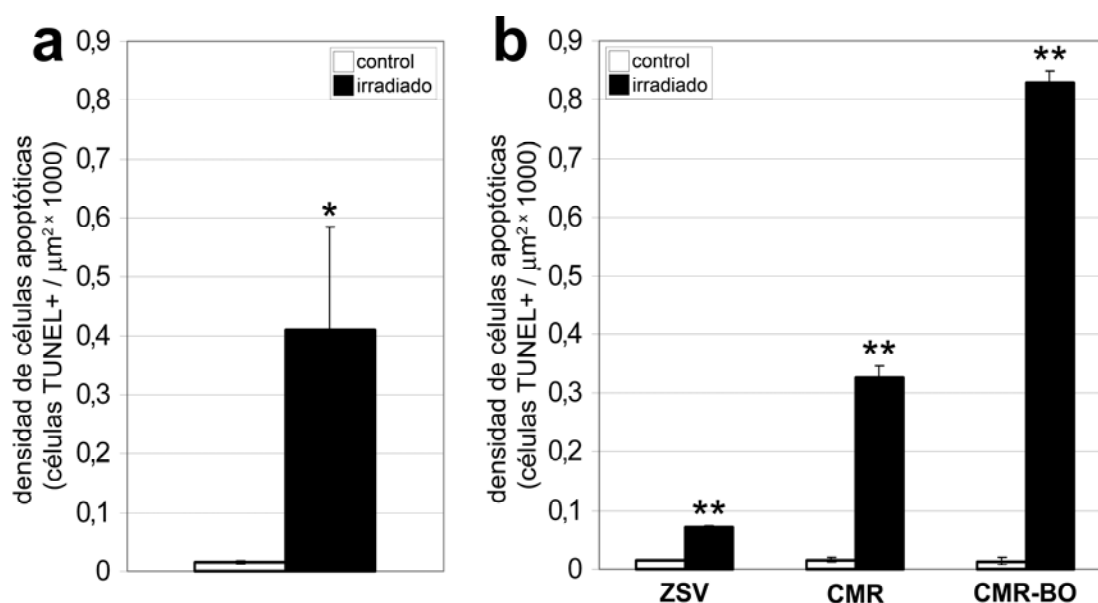
### ***Muerte celular***

Teniendo en cuenta los daños estructurales antes descritos, el primer estudio a realizar en esta región fue la muerte celular causada por la radiación. Para ello se analizaron encéfalos de ratones de P20, previamente irradiados (a P19), como si de un procedimiento normal de trasplante se tratase, y se compararon con animales de la misma edad sin irradiar. La técnica de TUNEL permitió la detección de células en apoptosis, cuya densidad a lo largo de todo el



**Figura 56.** Imágenes macroscópicas de la porción rostral de los encéfalos de un ratón control (izquierda) y uno irradiado (derecha). De arriba abajo, vistas dorsal, ventral y lateral. Nótese el pequeño tamaño del BO del ratón irradiado.

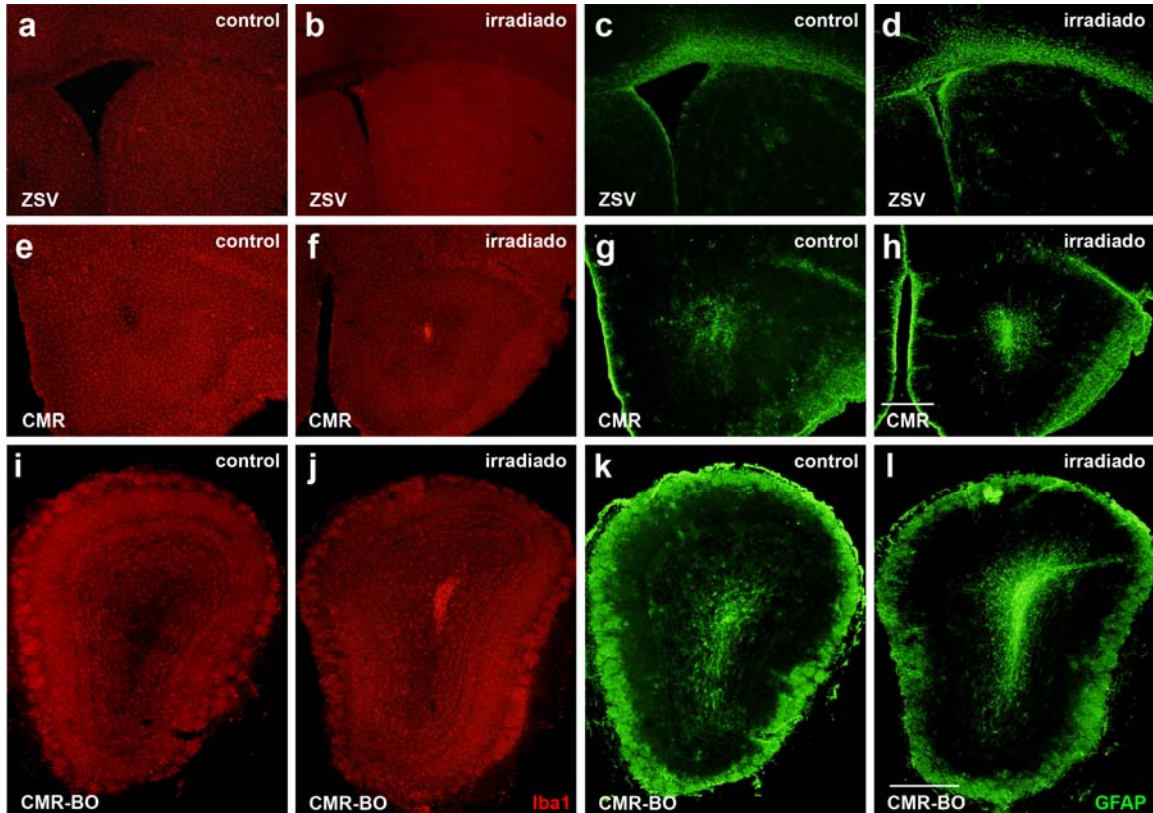
eje ZSV-CMR-BO resultó ser más elevada en los animales irradiados que en los animales sin irradiar ( $p < 0,05$ ; figura 57). Al analizar por separado cada una de las tres regiones de dicho eje, las diferencias entre los dos grupos experimentales se mantuvieron tanto en la ZSV ( $p < 0,01$ ), como en la CMR ( $p < 0,01$ ) y en la CMR-BO ( $p < 0,01$ ). Además, la densidad de células apoptóticas de los animales irradiados era cada vez mayor a medida que nos desplazábamos hacia regiones más rostrales (figura 57)



**Figura 57.** Densidad de células apoptóticas detectadas con la técnica TUNEL. **a**, resultados globales; **b**, resultados separados por regiones de estudio. Cada barra representa la media  $\pm$  ESM. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ . ZSV, zona subventricular; CMR, corriente migratoria rostral; CMR-BO, extensión de la corriente migratoria rostral en el bulbo olfativo.

Este resultado peculiar nos llevó a comprobar la aparición de una gliosis reactiva en las regiones anteriores, como indicador de un proceso de muerte celular inmediato. Los análisis inmunohistoquímicos realizados para los marcadores de microglía (Iba1) y de astrocitos (GFAP) revelaron una patente gliosis reactiva en los animales irradiados (figura 58). Sin embargo, la gliosis no era uniforme: en las regiones más caudales (ZSV) resultó prácticamente indetectable mientras que en las regiones más rostrales, en especial en la CMR-BO era particularmente intensa (figura 58). Los resultados del análisis de apoptosis y de la glía reactiva eran coincidentes: la muerte celular parecía estar desplazada hacia las regiones más rostrales del eje ZSV-CMR-BO.



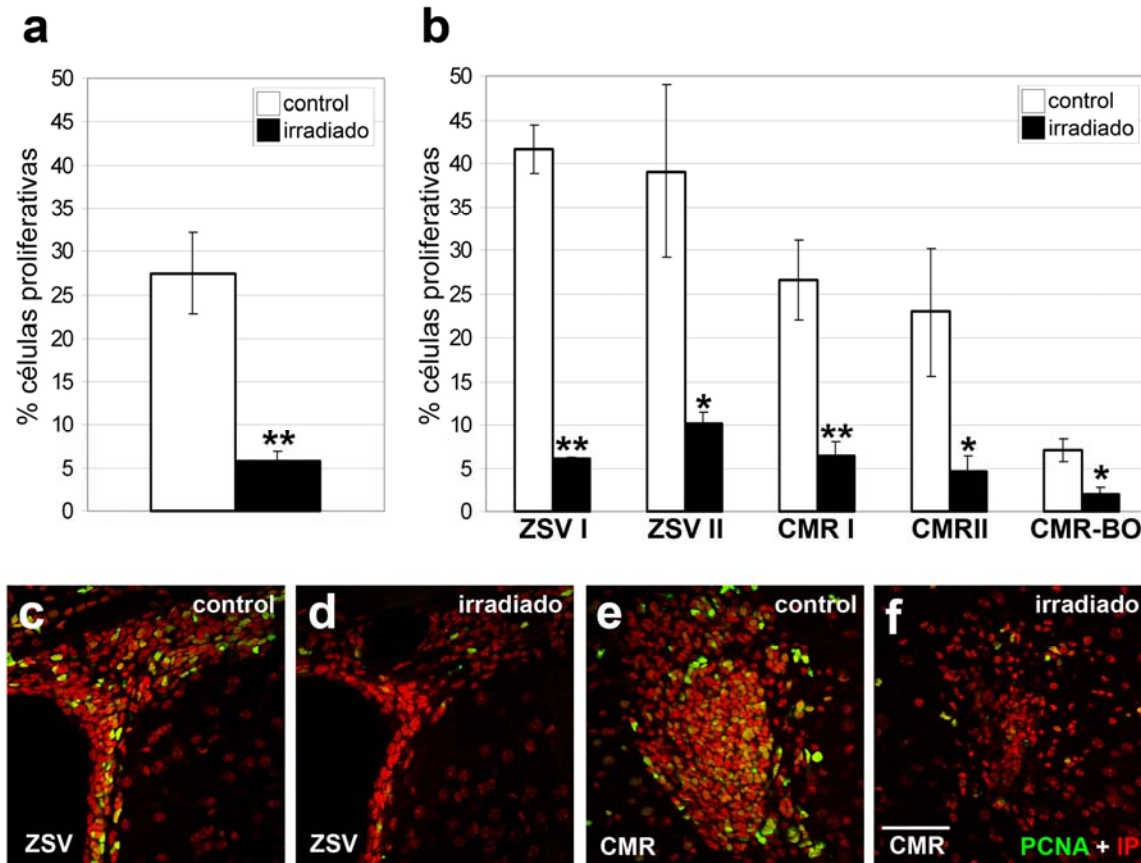


**Figura 58.** Imágenes de los niveles ZSV I (a-d), CMR I (e-h) y CMR-BO (i-l) de ratones de P20. Las células microgliales se marcaron con Iba1 (a, b, e, f, i, j) y los astrocitos con GFAP (c, d, g, h, k, l). Nótese la patente gliosis reactiva de los ratones irradiados en comparación con los controles en las regiones CMR I y CMR-BO. Barra de escala de a-h = 400  $\mu$ m; de i-l = 400  $\mu$ m. ZSV, zona subventricular; CMR, corriente migratoria rostral; CMR-BO, extensión de la corriente migratoria rostral en el bulbo olfativo.

### **Análisis de proliferación**

El siguiente paso en el estudio de las alteraciones estas regiones neurogénicas se basó en analizar la proliferación celular. La técnica inmunohistoquímica realizada contra el antígeno nuclear de proliferación celular PCNA reveló diferencias altamente significativas en el porcentaje de células proliferativas entre los dos grupos experimentales ( $p < 0.01$ ), con un marcado descenso de la proliferación celular en los animales irradiados (figura 59). Estas diferencias se mantuvieron al dividir el eje ZSV-CMR-BO en cinco regiones rostrocaudales equidistantes y comparables: ZSV I, ZSV II, CMR I, CMR II y CMR-BO. En todas ellas, los animales irradiados presentaron un porcentaje de células proliferativas menor que el del grupo control (figura 59 b).

Hay que destacar también la detección de alteraciones morfológicas notables en las regiones estudiadas, tanto de tamaño como de densidad celular (figura 59 c-f).



**Figura 59.** Análisis de la proliferación celular a P20. **a**, porcentaje global de células proliferativas (número de células positivas para PCNA con respecto al total); **b**, porcentaje de células proliferativas separadas por niveles de estudio rostrocaudales. **c-f**, Imágenes de microscopía confocal del nivel ZSV I y CMR I, representativos del porcentaje global de células proliferativas en cada grupo de estudio. Los núcleos de las células proliferativas se marcaron con PCNA (verde) y todos los núcleos celulares se contratiñeron con ioduro de propidio (IP, rojo). Nótese la reducción del número de células proliferativas en los animales irradiados y las alteraciones morfológicas sufridas. Barra de escala = 50  $\mu$ m. ZSV, zona subventricular; CMR, corriente migratoria rostral; CMR-BO, extensión de la corriente migratoria rostral en el bulbo olfativo.

Así pues, se demostró que el efecto directo de la radiación produjo una marcada muerte celular en las regiones neurogénicas estudiadas acompañada de gliosis reactiva y de un notable descenso del porcentaje de células proliferativas. Al tratarse el eje ZSV-CMR-BO de una región de generación de nuevos elementos neurales altamente plástica, nos planteamos continuar con su análi-

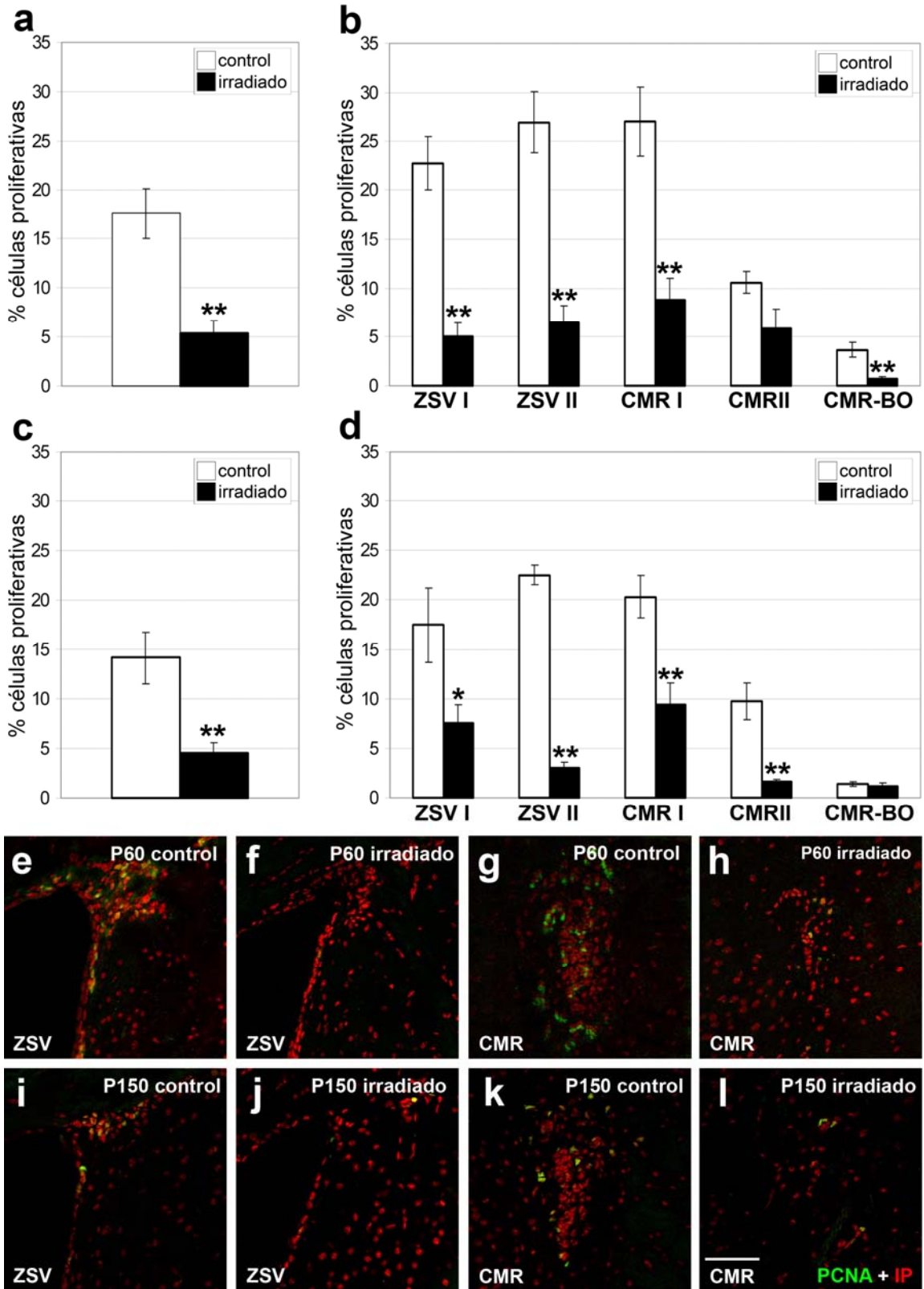


sis a medio y largo plazo, para comprobar si su recuperación funcional era posible.

Para ello, repetimos el estudio de la proliferación celular a las edades de P60 y de P150. Obviamente, los animales irradiados de estas edades tuvieron que ser trasplantados a P20 para asegurar su supervivencia. El primer resultado evidente fue que los daños estructurales sufridos por estas regiones y ya detectados 24 horas después de la radiación no sólo se mantuvieron, sino que incluso se incrementaron a P60 y a P150 (figura 60). Además, el análisis del porcentaje de células proliferativas reveló resultados análogos a los obtenidos a la edad de P20: tanto P60 como a P150 los animales irradiados presentaron un porcentaje de células proliferativas mucho menor que el de los animales que no se irradiaron ( $p < 0.01$ ; figura 60). Asimismo, este descenso en la proliferación celular también se mantuvo en las cinco regiones rostrocaudales en las que dividimos el eje ZSV-CMR-BO (figura 59). Hay que mencionar dos excepciones a este resultado global: el nivel CMR II a P60 y el nivel CMR-BO a P150, donde no se detectaron diferencias significativas entre los animales irradiados y sin irradiar ( $p > 0.05$ ; figura 60 b, d).

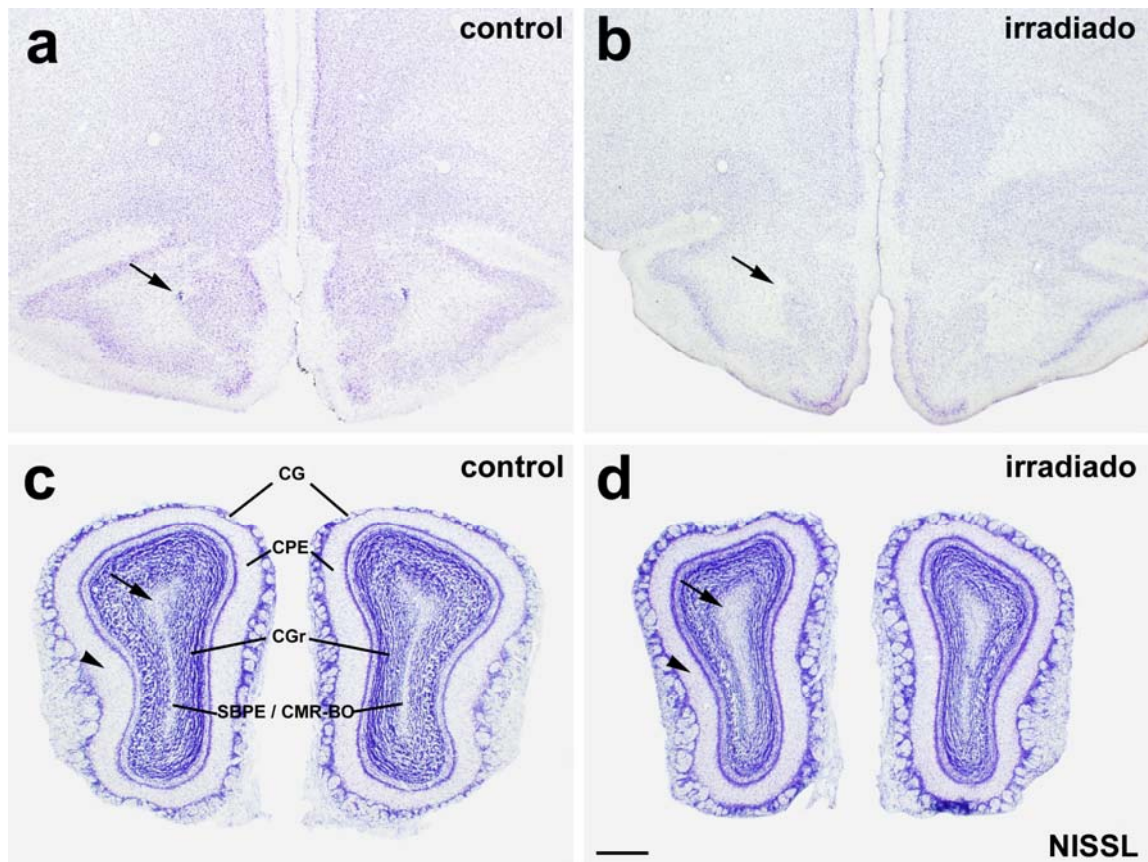
Si bien en los animales sin irradiar se observó un descenso progresivo en la proliferación debido a la edad, en ningún momento se detectó una recuperación en la proliferación celular de las regiones estudiadas en los animales irradiados (figura 60). Por ello, pudimos concluir que los efectos de la radiación son permanentes y que ni las células madre endógenas ni las exógenas, consiguen recuperar los niveles normales de proliferación.

**Figura 60 (página siguiente).** Análisis de la proliferación celular a P60 y P150. **a, b** porcentaje de células proliferativas a P60 (número de células positivas para PCNA con respecto al total); **a**, porcentaje global; **b**, porcentajes en los diferentes niveles de estudio rostrocaudales. **c, d** porcentaje de células proliferativas a P150; **c**, porcentaje global; **d**, porcentajes en los diferentes niveles de estudio rostrocaudales. **e-l**, Imágenes de microscopía confocal del nivel ZSV I y CMR I, representativos del porcentaje global de células proliferativas en cada grupo de estudio a P60 (**e-h**) y a P150 (**i-l**). Los núcleos de las células proliferativas se marcaron con PCNA (verde) y todos los núcleos celulares se contratiñeron con yoduro de propidio (IP, rojo). Nótese la persistencia del daño en las regiones estudiadas y la ausencia de recuperación de la proliferación celular. Barra de escala = 50  $\mu\text{m}$ . ZSV, zona subventricular; CMR, corriente migratoria rostral; CMR-BO, extensión de la corriente migratoria rostral en el bulbo olfativo.



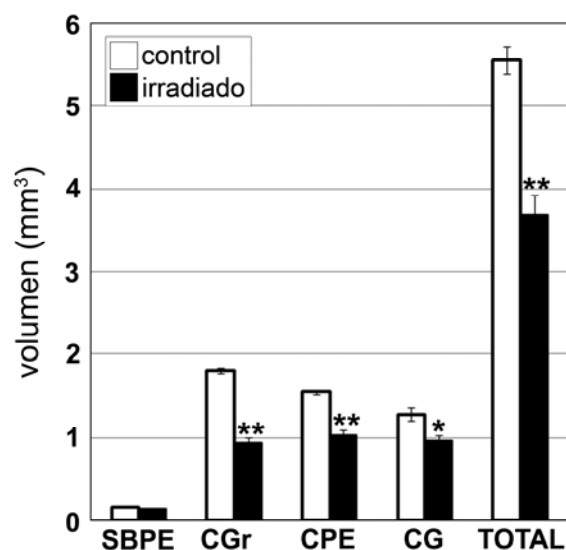
### Análisis a largo plazo del BO

Como se ha detallado anteriormente, el resultado que nos condujo al análisis de la muerte y la proliferación celular del eje neurogénico ZSV-CMR-BO fue la reducción radical del tamaño del BO de los animales irradiados y trasplantados sacrificados a la edad de P300, observable a simple vista. Por ello, una vez realizado el estudio mencionado de apoptosis y proliferación, y para acabar con el análisis de los efectos de la radiación en esta región, nos propusimos un análisis volumétrico de las diferentes capas del BO a P300.



**Figura 61.** Secciones de ratones de P300 teñidas con la técnica de Nissl. Imágenes de la CMR y el BO. Nótese la desaparición de la CMR en los ratones irradiados en comparación con los controles (**a**, **b** flechas). Se puede observar una cierta expansión de la SBPE en detrimento de la CGr (**c**, **d**, flechas). También se puede observar la disminución del volumen de la CPE. CG, capa glomerular; CPE, capa plexiforme externa; CGr, capa de los granos; CMR-BO, extensión de la corriente migratoria rostral al bulbo olfativo; SBPE, sustancia blanca periependimaria. Barra de escala = 200  $\mu$ m.

La tinción de Nissl nos permitió observar una CMR prácticamente inexistente a esta edad (figura 61 b), así como ciertos cambios en el tamaño de las capas del BO (figura 61 c, d). El análisis volumétrico demostró un descenso



**Figura 62.** Volumen medio estimado del BO y de sus capas en animales irradiados y sin irradiar. SBPE, sustancia blanca periepéndimaria; CGr, capa de los granos; CPE, capa plexiforme externa; CG, capa glomerular. Cada barra representa la media  $\pm$  ESM. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

marcado del volumen global del BO ( $p < 0,01$ ; figura 62), tal y como se podía intuir de la observación directa al extraer el encéfalo de los animales irradiados. Al analizar cada capa del BO por separado de los animales irradiados, se pudo comprobar una disminución del volumen en la CGr ( $p < 0,01$ ), la CPE ( $p < 0,01$ ) y en la CG ( $p < 0,05$ ), pero no en la SBPE ( $p > 0,05$ ). La reducción del volumen de las diferentes capas del BO a excepción de la SBPE hizo que esta última, en comparación, pareciera más grande en los animales irradiados que en los animales sin irradiar (figura 61 c, d).

Así pues, a tenor de los resultados obtenidos, podemos concluir que la radiación empleada para la ablación de la médula ósea produjo daños estructurales notables en el eje proliferativo ZSV-CMR-BO, que repercutieron en el volumen de las diferentes capas del BO, causando un deterioro persistente.

## **Efectos del trasplante fuera del encéfalo**

Los resultados obtenidos en las pruebas de comportamiento motor indicaron una clara mejoría en el movimiento de los ratones PCD irradiados y trasplantados con médula ósea silvestre a P20. Además, la comparación del número de eventos de fusión celular entre los animales silvestres y los heterocigotos demostró la influencia de un ambiente neurodegenerativo en la llegada y fusión de las CDMO con las células de Purkinje. Sin embargo, no se encontraron evidencias de una recuperación histológica en el cerebelo de los animales mutantes trasplantados: la pérdida de células de Purkinje era análoga a la de los animales mutantes sin trasplante y no se detectaron células de este tipo derivadas de eventos de fusión. Por ello nos propusimos estudiar otras estructuras

y tejidos que pudiesen tener influencia en dicha mejora en el comportamiento motor o ejercer un efecto protector.

## **Médula espinal**

Siguiendo con la línea de estudio propuesta en el apartado anterior, para determinar cuál es la causa de la mejora en el comportamiento de los ratones mutantes trasplantados con médula ósea sana, además del músculo esquelético se realizó un análisis análogo de la médula espinal.

En primer lugar se realizaron las tinciones de Nissl y hematoxilina-eosina para determinar posibles alteraciones en el tejido de los animales mutantes con respecto a los silvestres. No se encontraron alteraciones morfológicas significativas en los diferentes animales analizados, por lo que no pareció que la mutación *pcd* o el proceso de radiación y trasplante afectasen a la médula espinal.

Seguidamente se buscaron células derivadas de la médula ósea en esta estructura. Tanto en animales silvestres como en mutantes trasplantados se encontraron células microgliales positivas para la GFP. En ambos tipos de animales, dichas células aparecieron distribuidas preferentemente por la sustancia gris de la médula espinal, tanto en las astas ventrales como en las dorsales. Sin embargo, en ninguno de los grupos experimentales se encontró una acumulación de células de microglía (positivas o no para la GFP), descartándose cualquier reacción glial. Finalmente, no se encontró ninguna neurona positiva para la GFP ni en animales silvestres ni en mutantes PCD. A tenor de estos resultados, se puede descartar una posible implicación del efecto de las CDMO en la médula espinal como explicación para la mejora comportamental de los ratones PCD trasplantados con médula ósea sana.

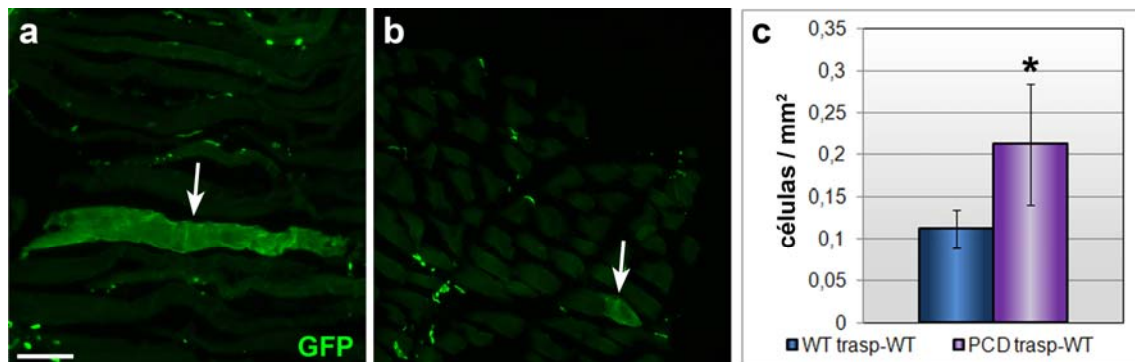
## **Músculo estriado**

El análisis inicial del músculo estriado tuvo como finalidad la detección de anomalías o daños estructurales en las fibras musculares derivados de la mutación o del proceso de radiación y trasplante. Este estudio se basó en tinciones histológicas básicas del músculo gastrocnemio (hematoxilina-eosina) de animales silvestres y mutantes con y sin trasplante. Los resultados derivados de dichas tinciones no revelaron diferencias entre los grupos experimentales,



por lo que la mutación o el proceso de radiación y trasplante no parecen afectar la morfología general del músculo estriado.

Para completar este estudio, se buscaron células derivadas de la médula ósea en el músculo gastrocnemio de los animales trasplantados a P20 de 150 días de edad. En este caso, el análisis de las secciones de dicho músculo reveló una incorporación de células derivadas de la médula ósea mayor, casi el doble, en animales mutantes en comparación con animales silvestres ( $p < 0,05$ ; figura 63), en términos de número de células /  $\text{mm}^2$ .



**Figura 63.** Fibras musculares derivadas de la médula ósea trasplantada. **a**, fibra muscular en sección longitudinal (flecha) marcada con GFP (verde). **b**, otra fibra en sección trasversal (flecha) Barra de escala = 100  $\mu\text{m}$ . **c**, densidad de células positivas para la GFP. Cada barra representa la media  $\pm$  ESM. \*  $p < 0,05$ . WT, tipo silvestre (*wild-type*).

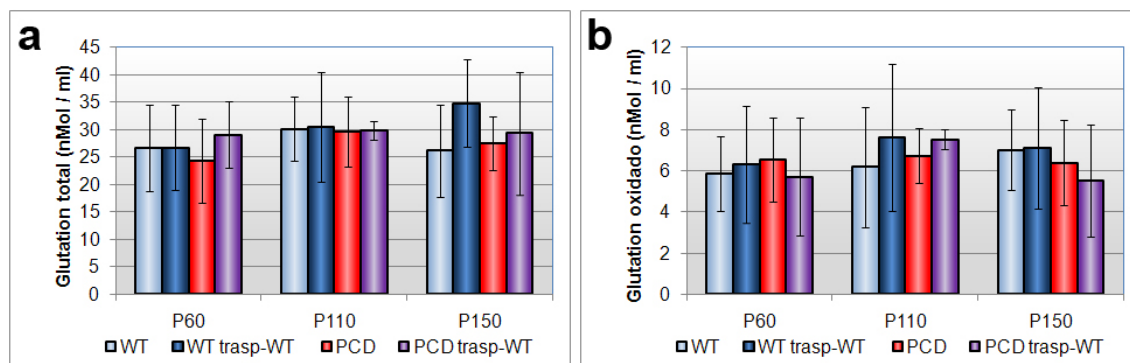
## Sangre periférica

Además de utilizar la sangre periférica de los animales receptores para seguir la incorporación progresiva del trasplante de médula ósea, se realizaron dos estudios bioquímicos encaminados a buscar posibles indicadores de moléculas neuroprotectoras presentes en los animales silvestres y, en cierta manera, también en los animales mutantes trasplantados con médula ósea sana. La presencia de estas sustancias podría suponer una posible explicación de la mejora comportamental y de la neuroprotección de las células mitrales de los animales mutantes trasplantados, en términos generales.

En primer lugar se hizo un análisis del glutatión presente en esta sangre periférica. Los niveles de glutatión oxidado y reducido son un buen indicador del estado general de estrés oxidativo del organismo (Dringen y Hirrlinger, 2003; Franco y Cidlowski, 2009; Hirrlinger y Dringen 2010). La figura 64 recoge

los resultados de los valores medios del nivel de glutatión oxidado y del glutatión total de los diferentes grupos experimentales.

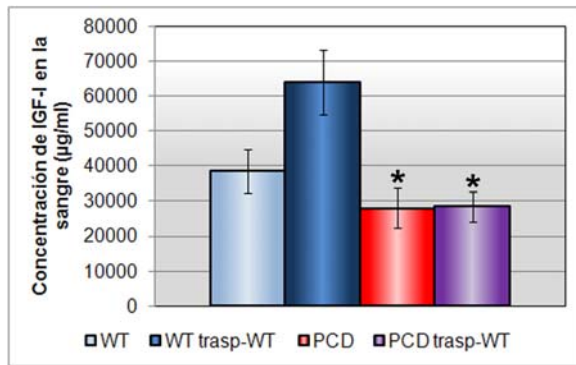
Como se puede apreciar en la gráfica, no se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos analizados ( $p > 0,05$ ) para ninguno de los parámetros analizados.



**Figura 64.** Análisis aproximativo de los niveles de glutatión en sangre periférica. **a**, niveles de glutatión total; **b**, niveles de glutatión oxidado. Cada barra representa la media  $\pm$  ESM. WT, tipo silvestre (*wild-type*).

El otro análisis bioquímico realizado se basó en determinar los niveles de IGF-1 de la sangre periférica de los animales experimentales a la edad de P150. El IGF-1 es un factor trófico con un marcado efecto neuroprotector (Zhang et al., 1996; Carro et al., 2001, Carrascosa et al., 2003). Además, esta molécula se supone deficitaria en el encéfalo de los ratones PCD (Zhang et al., 1997, 1999). En la figura 65 se muestran los resultados de los valores medios de IGF-1 en la sangre periférica de los sujetos de estudio.

Los resultados demostraron una disminución de los niveles de IGF-I en la sangre periférica en los dos grupos de ratones PCD en comparación con los animales silvestres trasplantados (figura 65;  $p < 0,05$ ). No se encontraron diferencias significativas entre los animales mutantes y los ratones silvestres sin trasplantar (figura 65). Cabe mencionar que algunas muestras de este último grupo experimental presentaron valores de IGF-I muy elevados y superiores a los de los animales mutantes; sin embargo, estos valores no se incluyeron en el estudio porque la densidad óptica asociada a ellos se encontró fuera de la recta patrón. Tampoco se detectaron diferencias entre los dos grupos de animales silvestres.



**Figura 65.** Análisis de los niveles de IGF-I en sangre periférica. Cada barra representa la media  $\pm$  ESM. \*  $p < 0,05$ . WT, tipo silvestre (*wild-type*).

Como resumen, los análisis bioquímicos realizados demostraron una aparente ausencia de estrés oxidativo en la sangre de los animales mutantes, sin influencia alguna del trasplante. Por otra parte, los niveles de IGF-I resultaron ser superiores en los animales silvestres en comparación con los mutantes. Sin embargo, el trasplante de médula

ósea no produjo variaciones en los niveles de IGF-I de los ratones PCD.



# Discusión

*“Lo peor no es cometer un error, sino tratar de justificarlo, en vez de aprovecharlo como aviso providencial de nuestra ligereza o ignorancia.”*

*Santiago Ramón y Cajal*



En el apartado anterior hemos desglosado y explicado los diferentes resultados de esta Tesis Doctoral. Se ha podido comprobar cómo el trasplante de células de la médula ósea silvestre mejora notablemente el comportamiento motor y el comportamiento olfativo de los ratones mutantes PCD. Además, dicho trasplante produjo una serie de efectos en los tejidos de los ratones receptores que, en muchos casos, están relacionados con estos cambios comportamentales. Por esta razón y para facilitar su comprensión, no seguiremos en la discusión el orden cronológico de los resultados obtenidos, sino que los agruparemos en diferentes apartados según su relación conceptual.

## **El trasplante de médula ósea es viable, seguro y efectivo**

El primer punto a tener en cuenta a la hora de realizar cada trasplante de células madre fue tener la certeza de que las células que se iban a trasplantar estuviesen vivas y fuesen funcionales. Las células sobrantes tras los diferentes trasplantes sufrieron las mismas manipulaciones que las inyectadas a los ratones receptores, por lo que constituyeron una buena muestra para comprobar esta viabilidad. El hecho de que no incorporasen el colorante Azul Tripán demuestra su supervivencia a lo largo del proceso de extracción; la capacidad de proliferar y diferenciarse en cultivos demuestra su funcionalidad. De esta manera, podíamos estar seguros de que las células trasplantadas tenían al menos la capacidad de reconstituir la médula ósea eliminada de los ratones receptores (Whetton y Graham, 1999). En cuanto al número de células inyectadas, existen trabajos que demuestran que una sola célula trasplantada es capaz de reconstituir la totalidad de la médula ósea (Krause et al., 2001). En nuestro caso, no pretendimos ajustar la cantidad de células trasplantadas ni estudiar esta capacidad de reconstrucción de la médula ósea. Por el contrario, el objetivo de nuestro trabajo fue conseguir el trasplante más efectivo posible, como herramienta de terapia celular, sin poner en riesgo la supervivencia de los receptores. De esta manera, la cantidad de células empleada, 7,5 millones, fue similar a la empleada en trabajos previos (Priller et al., 2001b; Álvarez-Dolado et al., 2003), obteniendo resultados positivos.

Los dos métodos de ablación empleados –radiación y busulfán- se consideran mecanismos efectivos para eliminar la médula ósea de los ratones receptores. En el caso de la radiación, se eligieron 7.5 Gy como dosis mínima suficiente para realizar su cometido, la denominada dosis letal mínima (Recio, 2008; Díaz et al., 2011; Recio et al., 2011). Por su parte, el busulfán es uno de los componentes químicos empleados de forma rutinaria para la realización de estos experimentos (Locatelli et al., 1994; Espejel et al., 2009), junto con otros como el treosulfán (Scheulen et al., 2000) o la fludarabina (Casper et al., 2004). De todas formas, cada vez que se procedió a la ablación de médula ósea por cualquiera de los dos métodos, se seleccionaron algunos animales como controles sin trasplante. En todos los casos, estos controles de ablación murieron, corroborándose así la efectividad de los métodos empleados.

Una prueba fehaciente de la eficacia del trasplante fue la supervivencia de los ratones trasplantados. Sólo en contadas ocasiones se produjo la muerte de alguno de estos animales. Estos escasos eventos no se debieron al proceso de ablación y fallo en la incorporación de las células trasplantadas, sino a otras causas comunes de mortalidad en un animalario. Podría concluirse así que el trasplante de médula ósea fue seguro y viable, permitiendo la supervivencia de la práctica totalidad de los animales trasplantados.

El hecho de la supervivencia de los animales trasplantados puede implicar que los métodos de ablación empleados no fuesen suficientes para destruir la médula ósea de los animales receptores. De esta manera, la supervivencia de estos animales pudo deberse no a un éxito del trasplante, sino a que un remanente de células de la médula ósea propia hubieran podido regenerarla. Para descartar esta posibilidad se llevó a cabo el análisis periódico de la sangre periférica de los animales trasplantados, como buen indicador de la reconstitución de la médula ósea por las células exógenas (Díaz et al., 2011; Recio et al., 2011). El incremento progresivo del porcentaje de células sanguíneas positivas para la GFP demostró claramente la sustitución progresiva de las células de la sangre de los animales receptores por aquéllas derivadas de la nueva médula ósea. En el caso de los animales irradiados a P19 y trasplantados a P20, tanto en ratones silvestres como en ratones PCD, este porcentaje llegó a niveles si-

milares a los de los ratones donantes, por lo que se prueba definitivamente la eficacia del trasplante.

En el caso de los ratones sometidos a ablación química y trasplantados a P0, los niveles de células positivas para GFP en la sangre, aunque se incrementaron de forma progresiva, no llegaron a niveles tan altos como en el caso anterior. El periodo de supervivencia de estos animales fue menor, por lo que no transcurrió un tiempo suficiente para la sustitución completa de la sangre de estos ratones receptores. Sin embargo, los niveles de GFP en la sangre de ratones irradiados y trasplantados a P20 a edades de supervivencia similares fueron también superiores. Para explicar este hecho, hay que tener en cuenta que el trasplante de los ratones a P0 se realizó por vía intrahepática de forma análoga a trabajos relacionados (Espejel et al., 2009). Dado el pequeño tamaño de los animales receptores, no descartamos que en algunos casos el trasplante pudiera haberse quedado en el peritoneo. El trasplante intraperitoneal, aunque ha sido previamente utilizado (Mezey et al., 2000; Corti et al., 2002; Álvarez-Dolado et al., 2003), presenta desventajas con respecto al trasplante intravenoso (Recio, 2008). Además, hay que tener en cuenta que se ha sugerido que la radiación incrementa o acelera el proceso de reconstitución sanguínea en animales trasplantados (Nygren et al., 2008). No se sabe a ciencia cierta si en estos animales en concreto el proceso de incorporación del trasplante y la sustitución progresiva de la sangre fueron más lentos y pudieran requerir de periodos de supervivencia aún mayores, pero entonces no tendría sentido para el objetivo buscado: ver las posibilidades de terapia celular antes de la degeneración de las células de Purkinje.

Finalmente, es necesario señalar la presencia de algunos animales trasplantados a P0 con porcentajes de células positivas para la GFP en sangre muy reducidos. Como hemos visto anteriormente, la incorporación del trasplante en la sangre es más lenta en los animales trasplantados a P0. Además, es posible que en esos casos, los métodos de ablación y trasplante no funcionasen de forma adecuada. Estos sujetos se retiraron del estudio para evitar posibles resultados erróneos.

## **Las células procedentes del trasplante se integran de forma progresiva en el encéfalo de los ratones receptores**

El análisis de la contribución de las CDMO al encéfalo de los ratones receptores demuestra claramente la formación de elementos neurales a partir de la médula ósea trasplantada, tanto en animales silvestres como en animales mutantes, a todas las edades estudiadas y con los dos métodos de ablación de la médula ósea. Esta incorporación se produjo de forma progresiva, incrementándose con el tiempo el número de CDMO integradas en el encéfalo del animal receptor.

### ***Incorporación de elementos gliales***

En primer lugar cabe destacar que el tipo celular derivado de la médula ósea más numeroso encontrado en todos los animales receptores fue la microglía, tanto en el BO como en el cerebelo, lo que corrobora los datos obtenidos previamente (Eglitis y Mezey, 1997; Priller et al., 2001a; Corti et al., 2002; Wagers et al., 2002; Hess et al., 2004; Massengale et al., 2005; Recio et al., 2011). Además, esta incorporación se incrementó a lo largo del tiempo, tanto en animales silvestres como en mutantes, sugiriendo que la médula ósea derivada de los donantes genera de forma permanente nuevas células microgliales a lo largo de la vida de los animales, de acuerdo con resultados anteriores (Eglitis y Mezey, 1997; Hess et al., 2004; Massengale et al., 2005; Recio et al., 2011). Más adelante discutiremos cómo esta integración se vio influida por un microambiente degenerativo.

En el caso de los animales trasplantados a P0, la cantidad de células de microglía encontradas tanto a P20 como a P30 fue sorprendentemente baja. Los niveles de células GFP en la sangre de estos ratones (25,21% y 34,45%, respectivamente) no fueron tan elevados como en los animales trasplantados a P20 (hasta 74,51%), luego la cantidad de células disponibles para integrarse en el encéfalo fue también menor. Además, el tiempo de supervivencia de los ratones trasplantados a P0 (20 ó 30 días) fue menor que en los ratones trasplantados a P20 (hasta 130 días). Por el contrario, no hay mucha diferencia entre el

periodo de tiempo de supervivencia tras el trasplante de los animales sacrificados a P30 y el de los sacrificados a P60. Estos últimos, trasplantados a P20, tuvieron 40 días de supervivencia tras el trasplante, luego sólo hay 10 días de diferencia entre estos dos grupos experimentales. Así pues, el hecho de que los animales trasplantados a P0 tuviesen una supervivencia menor y un nivel más bajo de células GFP en la sangre, no es suficiente para explicar que el número de células microgliales derivadas de la médula ósea fuese tan reducido. En este caso, es posible que la radiación a la que fueron sometidos los animales a P19 facilitase la extravasación de las células sanguíneas al encéfalo, al producir en éste cierta inflamación transitoria que pudiese alterar la barrera hematoencefálica, como otros autores han sugerido (Pachter et al., 2003; Yuan et al., 2006). De esta manera, los ratones irradiados podrían incorporar un número mayor de células microgliales derivadas de la médula ósea tras el trasplante que los animales sometidos a ablación química. La proliferación de estas células microgliales junto con el aporte continuo de la médula ósea produciría el incremento progresivo de la microglía GFP. En el caso de los animales trasplantados a P0, ya que no recibieron radiación, la incorporación de las células microgliales hacia el encéfalo pudo no verse facilitada, presentando niveles inferiores a los de los ratones irradiados.

En cuanto al mecanismo de plasticidad relacionado con la formación de las células de microglía, la presencia de un sólo núcleo y la ausencia de marcaje para el X-Gal (ver Material y Métodos) hacen suponer que fuese un proceso de transdiferenciación (Recio et al., 2011). Sin embargo, no se puede descartar un silenciamiento génico o un proceso de recombinación incompleto mediado por la recombinasa cre en algunas células, lo que enmascararía posibles eventos de fusión (Cohen-Tannoudji et al., 2000; Long y Rossi, 2009).

Finalmente, es necesario mencionar que no se encontraron astrocitos derivados de la médula ósea en ninguno de los animales analizados. Aunque existen datos previos que sugieren su presencia (Eglitis y Mezey, 1997; Kopen et al., 1999), nuestros resultados coinciden con la mayoría de los estudios realizados posteriormente a estos artículos (Brazelton et al., 2000; Nakano et al., 2001; Priller et al., 2001a; Wehner et al., 2003; Massengale et al., 2005; Recio



et al., 2011), confirmando la no presencia de células positivas a GFAP derivadas del trasplante de médula ósea.

### ***Células de Purkinje derivadas de la médula ósea***

La detección de células de Purkinje derivadas de la médula ósea trasplantada corrobora diferentes estudios que habían analizado previamente este fenómeno del cerebelo (Priller et al., 2001b; Corti et al., 2002; Wagers et al., 2002; Álvarez-Dolado et al., 2003; Weimann et al., 2003b; Magrassi et al., 2007; Johansson et al., 2008; Nygren et al., 2008). Además, la presencia de dos núcleos en estas células así como su marcaje positivo para el X-Gal demuestran que el mecanismo de plasticidad por el que se forman es la fusión celular. A pesar de las controversias que han surgido a la hora de explicar los diferentes tipos de plasticidad de las células madre (Terada et al., 2002; Álvarez-Dolado, 2007), en el caso de la formación de células de Purkinje a partir de CDMO el mecanismo aceptado es la fusión celular (Álvarez-Dolado et al., 2003; Weimann et al., 2003a, b; Magrassi et al., 2007; Johansson et al., 2008; Recio et al., 2011). Por el contrario, hay pocos trabajos que propongan la transdiferenciación para formar células de Purkinje *de novo* (Priller et al., 2001b). En cuanto a la frecuencia de los eventos de fusión detectados en la presente Tesis Doctoral, los resultados obtenidos fueron diversos dependiendo del genotipo de los animales receptores y de la edad del trasplante.

En el caso de los animales silvestres trasplantados a P20 el número de células de Purkinje derivadas de la médula ósea fue relativamente escaso, aunque en consonancia con resultados previos en los que se emplearon procedimientos y periodos de supervivencia análogos a los de la presente Tesis Doctoral: irradiación como método de ablación de la médula ósea, trasplante intravenoso y ausencia de daño u otro tipo de condicionante (Wagers et al., 2002; Álvarez-Dolado et al., 2003; Weimann et al., 2003b; Magrassi et al., 2007; Johansson et al., 2008; Nygren et al., 2008). Todo ello confirma que la fusión celular se produce en ausencia de fenómenos neurodegenerativos y de forma fisiológica, aunque con una frecuencia muy baja.

En el caso de un microambiente degenerativo, los resultados obtenidos variaron en función de la gravedad del daño. En primer lugar, con una neuro-

degeneración rápida y severa, como en el caso de los ratones PCD homocigotos trasplantados a P20, no se detectó ninguna célula de Purkinje derivada de la médula ósea. En condiciones normales, la neurodegeneración de las células de Purkinje sufrida por los ratones PCD ya ha finalizado a las tres edades de supervivencia analizadas (P60, P110 y P150; Mullen et al., 1976). Al no encontrarse ninguna célula de Purkinje positiva para la GFP, se puede concluir que no se ha producido un rescate celular por medio de la fusión celular. La explicación de este hecho se debe posiblemente a que a la edad a la que se realizaron los trasplantes, P20, el proceso neurodegenerativo en el cerebelo ya está avanzado, por lo que el rescate celular no es posible. Por el contrario, si el ambiente neurodegenerativo es más suave y lento, como en el caso de los ratones heterocigotos para la mutación PCD (+/*pcd*), el número de células de Purkinje derivadas de la médula ósea fue superior que en los animales silvestres. En las secciones siguientes discutiremos este resultado en mayor profundidad.

De todas formas, en cualquiera de los casos anteriores en los que se detectaron células de Purkinje derivadas de la médula ósea (ratones silvestres y heterocigotos), el número de éstas fue aumentando a lo largo del tiempo, coincidiendo con resultados previos (Weimann et al., 2003a, b; Magrassi et al., 2007). Además, el empleo de animales mutantes como donantes dio como resultado un número de células de Purkinje similar al obtenido empleando médula de ratones silvestres. Según la bibliografía revisada, este hecho demuestra por primera vez que la incorporación de elementos neurales al encéfalo no depende del genotipo de la médula ósea trasplantada, sino de las características del receptor.

El hecho de que la neurodegeneración de los ratones PCD fuese tan rápida que un trasplante a P20 no llegase a rescatar las células de Purkinje, nos inclinó a realizar el trasplante a edades más tempranas, es decir a P0. Los resultados fueron similares en los animales silvestres y en los mutantes: no se encontraron células de Purkinje derivadas de la médula ósea. Existen trabajos previos que demuestran la presencia de células de Purkinje derivadas de la médula ósea a los dos meses tras el trasplante (Álvarez-Dolado et al., 2003; Nygren et al., 2008). En el nuestro caso, el tiempo máximo de supervivencia permitido fue de 30 días, probablemente insuficiente para esta llegada, aunque

es un momento en el que la neurodegeneración está muy avanzada, por lo que no se analizaron animales a edades más avanzadas. Además, hay que tener en cuenta que la radiación puede ser un factor influyente para la integración de CDMO como células de Purkinje (Nygren et al., 2008), aunque no necesario (Johansson et al., 2008; Espejel et al., 2009). Si bien se ha comprobado la ausencia de diferencias en el número de células de Purkinje derivadas de la médula ósea utilizando radiación o métodos químicos de ablación (Magrassi et al., 2007) en animales adultos, en el caso de los neonatos la radiación estimula sensiblemente la formación de estas neuronas binucleadas (Espejel et al., 2009). Este hecho puede ser una explicación adicional para la ausencia de células de Purkinje derivadas de la médula ósea en los animales trasplantados a P0, dado que no recibieron radiación alguna. Finalmente, ya que un daño tisular favorece la incorporación de CDMO a un órgano (Magrassi et al., 2007; Johansson et al., 2008; Nygren et al., 2008; Espejel et al., 2009), cabría esperar una mayor cantidad de eventos de fusión en los ratones PCD debido a su degeneración cerebelosa. Sin embargo, nuestros resultados apuntan a que esta degeneración no acelera lo suficiente la fusión de las CDMO en el cerebelo a tiempos de supervivencia de 20 y 30 días postnatales.

### ***Formación de interneuronas del bulbo olfativo***

Existen pocos trabajos previos que analicen la incorporación de las CDMO al BO (Brazelton et al., 2000; Priller et al., 2001b; Corti et al., 2002; Massengale et al., 2005) y además sus resultados no son concluyentes. En la presente Tesis Doctoral se ha demostrado la existencia de interneuronas derivadas de la médula ósea en las diferentes capas de dicho BO, en concordancia con un trabajo previo de nuestro grupo (Recio et al., 2011). Asimismo, el hecho de que estas interneuronas tan solo poseyeran un núcleo y que en ningún caso fuesen positivas para el marcaje del X-Gal, apunta a que el mecanismo de plasticidad por el que se formaron es un proceso de transdiferenciación (Recio et al., 2011), con las posibles salvedades que han de tenerse en cuenta, como en el caso de la microglía (Cohen-Tannoudji et al., 2000; Long y Rossi, 2009). El hecho de no haberse detectado ningún neuroblasto o célula madre neural derivada de la médula ósea en la ZSV o en la CMR, descarta la posibilidad de

que dichas interneuronas pudiesen provenir de este eje de proliferación y migración del encéfalo rostral.

Más aun, la detección tanto de células de Purkinje como de interneuronas derivadas de la médula ósea en los mismos animales demuestra la capacidad de las CDMO para formar elementos neuronales mediante dos mecanismos de plasticidad bien diferenciados, dependiendo del tipo celular y de la región estudiada (Recio et al., 2011).

En el caso de los ratones irradiados y trasplantados a P20, se encontraron interneuronas derivadas de la médula ósea a las tres edades de supervivencia estudiadas (P60, P110 y P150), tanto en animales silvestres como en mutantes PCD, sin diferencias entre ambos grupos experimentales. Este resultado demuestra que el ambiente neurodegenerativo del BO en el caso de los ratones PCD no influye en la incorporación de este tipo neuronal. Además, nuestros resultados demostraron que el número de estas interneuronas se incrementó de forma progresiva a lo largo del tiempo de supervivencia (Recio et al., 2011). Este hecho demuestra, por primera vez, que la transdiferenciación de CDMO a elementos neuronales también se ve influida por el tiempo, al igual que lo que ocurre con los fenómenos de fusión en el cerebelo (Weimann et al., 2003a, b; Magrassi et al., 2007).

Finalmente, en el caso de los ratones trasplantados a P0, al igual que lo sucedido con las células de Purkinje, no se encontraron interneuronas derivadas de la médula ósea en el BO. La explicación de este fenómeno también es análoga a lo sucedido en el cerebelo: además de la falta de un posible efecto favorecedor de la radiación (Nygren et al., 2008), especialmente en neonatos (Espejel et al., 2009), el tiempo de supervivencia empleado probablemente no fuese suficiente para la llegada e integración de las CDMO al BO en forma de interneuronas.

### ***El ambiente neurodegenerativo incrementa la integración en el encéfalo***

Uno de los objetivos perseguidos en la presente Tesis Doctoral fue la determinación del efecto de un ambiente neurodegenerativo en la incorporación

de las CDMO al encéfalo. Como hemos podido observar en la sección “Resultados”, la neurodegeneración producida por la mutación PCD incrementó tanto la formación de células microgliales en el BO, como la fusión celular en las células de Purkinje del cerebelo de los animales *+/pcd*. A continuación discutiremos ambos fenómenos, tratando de explicar sus causas y posibles consecuencias.

### **La pérdida de células mitrales incrementa la llegada de células de microglía al bulbo olfativo**

Como se ha explicado anteriormente, el número de células de microglía positivas para la GFP aumentó a lo largo del tiempo tanto en el BO como en el cerebelo, en los animales silvestres y en los mutantes PCD, de acuerdo con resultados previos (Eglitis y Mezey, 1997; Hess et al., 2004; Massengale et al., 2005). Al comparar los animales silvestres y mutantes trasplantados, encontramos que la densidad de células microgliales derivadas de la médula ósea fue superior en los animales mutantes con respecto a los silvestres en todas las edades. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que debido a la degeneración, tanto el BO como el cerebelo de los ratones PCD sufren una reducción en su volumen (Mullen et al., 1976; Valero et al., 2007), siendo necesaria una corrección para estimar su densidad relativa. Por esta razón, se contabilizó también el número total de estas células microgliales positivas para la GFP, teniendo como resultado valores similares, con la particularidad del BO a P60, donde el número fue también superior en los ratones mutantes. Curiosamente, a esta edad, la pérdida de las células mitrales del BO de los ratones PCD se encuentra en etapas muy iniciales y los cambios en el volumen del BO aún no son apreciables (Valero et al., 2007). Resumiendo, la cantidad de células de microglía derivadas de la médula ósea fue similar en los dos grupos experimentales, PCD y silvestre, pero integrándose en un volumen menor en el caso de los ratones PCD; la única excepción fue el BO a P60, donde la cantidad de células de microglía fue superior en el PCD, a igualdad de volúmenes, resultando igualmente en una mayor densidad. Existen evidencias previas que demuestran que la reducción del volumen del BO de animales deprivados sensorialmente implica una mayor densidad de fibras serotoninérgicas (Gómez et al., 2007). Sin embargo, tras corregir esta densidad según la reducción del BO, el

número absoluto de estas fibras no resultó alterado, sugiriendo que los cambios de volumen de una estructura encefálica en ausencia de un proceso neurodegenerativo (ver más adelante), no influyen necesariamente en la llegada de otros elementos neurales (Gómez et al., 2007).

Los ratones PCD muestran diferencias en el grado de neurodegeneración en cada una de las dos regiones encefálicas estudiadas (Landis y Mullen, 1978; Greer y Shepherd, 1982; Fernández-González et al., 2002; Wang y Morgan, 2007, Baltanás et al., enviado). En el caso del cerebelo, el proceso neurodegenerativo ya ha concluido a las tres edades de supervivencia estudiadas, dada su rapidez (Landis y Mullen, 1978; Fernández-González et al., 2002; Wang y Morgan, 2007). Por el contrario, la degeneración de las células mitrales es más tardía y lenta, de manera que aunque a P110 y a P150 ya haya concluido, a P60 se encuentra en pleno proceso (Greer y Shepherd, 1982; Valero et al., 2007). Por eso mismo, en los casos en los que la muerte celular ya ha finalizado no se observan diferencias entre los dos grupos experimentales, pero sí cuando ésta se está produciendo, al propiciar la atracción de las células de microglía derivadas de la médula ósea.

Estudios previos han revelado que las células microgliales que proliferan tras una lesión en el sistema nervioso, no se originan a partir de la médula ósea, sino que parten de aquéllas residentes en el encéfalo (Massengale et al., 2005; Solomon et al., 2006; Ajami et al., 2007). Por el contrario, se ha propuesto que un ambiente neurodegenerativo podría atraer CDMO adicionales que incrementarían la población de microglía (Hess et al., 2004; Massengale et al., 2005). Teniendo en cuenta ambas observaciones, el incremento significativo de células microgliales observadas en el BO en degeneración de los ratones PCD a P60 podría deberse a ambos fenómenos, no excluyentes entre sí.

Como vimos anteriormente, los animales trasplantados a P0 presentaron una cantidad de células microgliales derivadas de la médula ósea mucho menor que los ratones irradiados y trasplantados a P20. La comparación entre los animales silvestres y mutantes sometidos a este tipo de trasplante no reveló diferencias entre los grupos experimentales. En el caso del BO, el proceso neurodegenerativo no ha comenzado a ninguna de las edades de supervivencia estudiadas (P20 y P30), por lo que no existe influencia de un microambiente

degenerativo. Sin embargo, en el caso del cerebelo, la muerte de las células de Purkinje a estas edades se encuentra en pleno proceso (Landis y Mullen, 1978; Fernández-González et al., 2002; Wang y Morgan, 2007), por lo que cabría esperar diferencias entre los dos grupos experimentales. Sin embargo, tampoco se encontraron diferencias en la cantidad de células microgliales derivadas de la médula ósea entre los animales silvestres y PCD. En este caso, es posible que no sólo sea necesario un ambiente neurodegenerativo para incrementar la incorporación de células microgliales al encéfalo, sino que sea también necesario el estado permisivo generado por la radiación, como se discutió anteriormente.

### **La degeneración lenta de las células de Purkinje de los animales *+/pcd* aumenta los fenómenos de fusión**

Se sabe que el número total de las células de Purkinje de los ratones *+/pcd* disminuye con la edad, presentando una reducción de aproximadamente un 18% a los 17 meses (P150; Doulazmi et al., 2002). Nuestros resultados demostraron que esta pérdida neuronal empieza antes, siendo claramente detectable a la edad de P300, es decir, más de 200 días antes de lo que se había propuesto previamente. Nuestro estudio se centró en el vermis, la región del cerebelo donde comienza el proceso neurodegenerativo en los ratones PCD homocigotos. En el trabajo citado anteriormente (Doulazmi et al., 2002), el análisis se llevó a cabo en todo el cerebelo, sin diferenciar los hemisferios y el vermis. Esta aproximación pudo determinar que a edades previas no se detectasen diferencias en determinadas regiones (al contrario que en nuestro caso), posiblemente por tomar el cerebelo como un todo, sin diferenciar sus partes. Por otra parte, el análisis del volumen del vermis no demostró diferencias entre los dos grupos experimentales ni a P150 ni a P300, corroborando los resultados previos obtenidos a la edad de P510 (Doulazmi et al., 2002), y demostrando que la pérdida neuronal detectada es real pero no lo suficientemente grande como para provocar una disminución del volumen de cerebelo, tal y como ocurre en los ratones PCD homocigotos (Mullen et al., 1976).

Tan sólo se detectaron escasos eventos de muerte celular por apoptosis de las células de Purkinje en los ratones *+/pcd* a P300. Además, no se detectó



una gliosis reactiva evidente en ninguno de los grupos experimentales, al contrario de lo que ocurre en los animales mutantes homocigotos, como se ha descrito previamente en nuestro laboratorio (Baltanás et al., enviado). De esta manera, nuestros resultados sugieren que la muerte celular en los ratones *+/pcd* se produce de forma puntual, en eventos aislados, y que, además, se inicia en el vermis, avanzando lentamente hacia los hemisferios cerebelosos. También se ha observado una apoptosis gradual de células de Purkinje en animales heterocigotos portadores de mutaciones neurodegenerativas recesivas, tanto *in vitro* (Zanjani et al., 2009) como *in vivo* (Doulazmi et al., 2006). En todos estos modelos, los eventos de muerte celular se detectan frecuentemente en animales envejecidos, lo que sugiere un efecto relacionado con la edad (Caston et al., 1995; Sakaguchi et al., 1996; Doulazmi et al., 2002, 2006). El silenciamiento del alelo silvestre, la acumulación de daño en el ADN o cualquier otra alteración genómica relacionada con el envejecimiento pueden ser explicaciones posibles para la muerte de determinadas células de Purkinje en animales heterocigotos (Gonzalo, 2010).

De acuerdo con nuestros resultados, la fusión celular es un proceso que se incrementa de forma progresiva, de manera que a lo largo del tiempo se observan cada vez más células de Purkinje binucleadas (Magrassi et al., 2007; Recio et al., 2011). Además, nuestros experimentos han demostrado que los ratones *+/pcd* presentan más eventos de fusión que los animales silvestres, tanto a P150 como a P300. Estudios previos sugieren que un daño tisular puede activar tanto la proliferación como la atracción de células madre, incluidas las CDMO (Gussoni et al., 1999; Lagasse et al., 2000). Como hemos podido comprobar, el ambiente neurodegenerativo de los ratones PCD homocigotos propicia la atracción de una mayor cantidad de células de microglía al BO; sin embargo, la degeneración de las células de Purkinje es tan rápida que las CDMO no llegan a tiempo al cerebelo para rescatar mediante fusión celular dichas neuronas (Recio et al., 2011). En el caso de los ratones *+/pcd*, sin embargo, la leve degeneración detectada es capaz de promover dicha fusión celular. Nuestros resultados revelan que los animales *+/pcd* mostraron un mayor número de eventos de fusión que los animales silvestres, tanto a P150 como a P300, sugiriendo así la eficacia del trasplante en la paliación de fenómenos



neurodegenerativos a largo plazo. Las células de Purkinje derivadas de los eventos de fusión presentaron dos núcleos: uno perteneciente a la neurona original y el otro a la CDMO fusionada (Weimann et al., 2003b). Por eso, el trasplante de CDMO con un genotipo silvestre (en este caso dos copias del gen *Nna1*, por ejemplo) puede ser considerado, a través de la fusión celular, como una herramienta terapéutica para determinadas enfermedades neurodegenerativas rescatando neuronas de la muerte celular al recuperar la expresión de un genotipo silvestre. Asimismo, las células derivadas de la médula ósea pueden actuar como vectores de diferentes genes y moléculas, induciéndose su expresión *de novo*, al fusionarse con las células de Purkinje en su destino. Por otra parte, hay que tener en cuenta que esta terapia celular no sólo tiene un efecto directo, sino que las células integradas en un tejido determinado y derivadas de una médula ósea “sana” pueden liberar factores antiapoptóticos, proliferativos o neuroprotectores, que proporcionen beneficios terapéuticos adicionales (Álvarez-Dolado, 2007).

Un aspecto a tener en cuenta es que la inflamación tisular incrementa notablemente los procesos de fusión celular (Magrassi et al., 2007; Johansson et al., 2008). Sin embargo, en nuestros experimentos no se detectó una gliosis reactiva, típica de un proceso de inflamación, ni tampoco apenas células de Purkinje en apoptosis. Además, el descenso en el número de células de Purkinje en los animales heterocigotos se identificó a P300 pero no a P150. Por ello cabe suponer que una señal diferente es la responsable de la migración de las CDMO al cerebelo de los ratones *+/pcd*; una señal que no esté relacionada con una reacción glial o con una apoptosis masiva. Más aún, nuestros resultados sugieren que la muerte de las células de Purkinje de los animales *+/pcd* es un proceso lento y a largo plazo, caracterizado por casos esporádicos de apoptosis. De esta manera, esta neurodegeneración parece tener lugar durante un periodo de tiempo más extendido de lo que parece, incluso antes de que la reducción del número de células de Purkinje pueda ser detectada. Experimentos anteriores llevados a cabo en nuestro laboratorio revelaron fenómenos de pre-neurodegeneración en los ratones PCD antes de que la muerte celular tenga lugar (Valero et al., 2006; Baltanás et al., 2010). Estos fenómenos se caracterizan por cambios transcripcionales y silenciamiento génico. Por ello es posible

que la pérdida de células de Purkinje en los ratones *+/pcd* pueda comenzar antes de que sea identificable (por ejemplo a P150) y que células en proceso de pre-neurodegeneración (que puedan parecer sanas) liberen ciertas señales que promuevan la fusión celular. Este hecho reviste importancia a la hora de dirigir determinados tipos celulares como herramientas terapéuticas a tejidos lesionados, evitando los efectos secundarios indeseados que puede provocar la gliosis reactiva, dañando aún más si cabe, al tejido afectado (Milligan y Watkins, 2009).

## **La dosis de radiación empleada afecta a la neurogénesis del encéfalo rostral**

La radiación empleada para eliminar la médula ósea de los ratones a P19 fue de 7,5 Gy. Esta cantidad se considera la dosis letal mínima (Recio, 2008; Díaz et al., 2011), es decir, aquella radiación capaz de eliminar la médula ósea de los ratones receptores, causando el menor daño y la mayor supervivencia posibles. Sin embargo, nuestros resultados demostraron que, a pesar de ser una dosis muy ajustada, se produjo una lesión irreversible en las regiones neurogénicas del encéfalo rostral. Estas regiones tienen son fundamentales para la continua reposición de interneuronas en el BO, necesarias para una correcta olfacción (Mouret et al., 2008). La radiación afectó no sólo a la proliferación celular sino también a otros sistemas neurales, variando notablemente el volumen del BO. Por todo ello, los efectos secundarios de la radiación han de tenerse en cuenta a la hora de interpretar resultados futuros para evitar resultados erróneos. A continuación discutiremos en detalle los distintos puntos de este estudio.

### ***La radiación empleada incrementa los fenómenos de apoptosis, y los desplaza rostralmente hacia el bulbo olfativo***

El daño que producen las radiaciones ionizantes en las células proliferativas depende de la tasa de proliferación de las mismas (Romanko et al., 2004a, b; Hellstrom et al., 2008), de manera que aquéllas que se dividen más

activamente son las más susceptibles. Este razonamiento que es la base de los tratamientos de radioterapia contra tumores, nos ha llevado a pensar que los precursores altamente proliferativos de la ZSV y la CMR (las células de tipo C) serían las más afectadas por la radiación, al poseer la tasa proliferativa más alta, seguidas por los neuroblastos (células de tipo A) y las células madre de la ZSV (células de tipo B2; Doetsch et al., 1997, 2002; García-Verdugo et al., 1998; Hellstrom et al., 2008). De esta manera, la mayor densidad de células apoptóticas debería encontrarse en la ZSV, disminuyendo hacia el BO. Sin embargo, los resultados obtenidos con la técnica TUNEL revelaron que la apoptosis causada por la radiación se incrementaba progresivamente desde la ZSV hacia el BO. Además, nuestros experimentos mostraron una gliosis reactiva patente en la CMR y en la CMR-BO, mientras que en la ZSV esta gliosis era prácticamente inexistente. De esta manera, la gliosis reactiva apareció desplazada hacia las regiones más rostrales, al igual que la densidad de células apoptóticas.

Existe una relación estrecha entre la apoptosis y la activación glial, de tal suerte que las neuronas dañadas son capaces de inducir una gliosis reactiva muy rápidamente (Garden y Moller, 2006; Milligan y Watkins, 2009). Las diferencias en el número de células apoptóticas entre ratones irradiados y sin irradiar pueden detectarse 3 horas después de la radiación, alcanzando un máximo a las 6 horas (Shinohara et al., 1997). Veinticuatro horas después de la radiación, las diferencias disminuyen pero son aún detectables (Shinohara et al., 1997). Por el contrario, la respuesta de las células gliales al daño neuronal es extremadamente rápida (cuestión de minutos; Garden y Moller, 2006; Milligan y Watkins, 2009), indicando dónde se ha producido una muerte neuronal reciente. Así, una fracción sustancial de las células apoptóticas detectadas pueden corresponder a células que no murieron en el momento de la radiación, sino un tiempo más tarde. Por otra parte, los neuroblastos son células migratorias que se dividen a lo largo de su trayectoria hacia el BO (Lois et al., 1996; Doetsch et al., 1997; Doetsch, 2003; Carleton et al., 2003), por lo que pudieron verse afectadas por la radiación pero no de forma tan severa como las células de tipo C (Romanko et al., 2004a, b; Hellstrom et al., 2008). Una hipótesis para explicar este hecho sería que los neuroblastos dañados pudieron continuar su migra-

ción a lo largo de la CMR, pero en el momento en el que se hubieran detenido para dividirse (Lois y Álvarez-Buylla, 1994; Peretto et al., 1999) habrían muerto a causa de los daños sufridos, si tenemos en cuenta que la radiación induce no sólo un daño agudo, sino también una toxicidad y muerte retardada (Haydont et al., 2007). Por todo ello, las células apoptóticas se podrían acumular en las regiones más rostrales, coincidiendo con la distribución de la gliosis reactiva.

### ***La radiación empleada afecta la morfología y la proliferación de las regiones neurogénicas sin que exista recuperación con el tiempo***

Nuestros resultados demostraron que la radiación provocó un daño directo en las regiones neurogénicas, alterando su morfología. Los cambios sufridos en la ZSV concuerdan con datos previos (McGinn et al., 2008). Sin embargo, también se detectaron alteraciones morfológicas en la CMR 24 horas tras la radiación y, de forma especial, a tiempos de supervivencia más prolongados. La CMR es una región caracterizada por la presencia de neuroblastos densamente empaquetados (Lois y Álvarez-Buylla, 1994; Lois et al., 1996; Doetsch et al., 1997; Peretto et al., 1997; Carleton et al., 2003) y fácilmente distinguible en secciones de tejido. Sin embargo, en los ratones irradiados fue complicado distinguir los límites de la CMR debido a la reducción de la densidad de los neuroblastos, en especial a las edades de supervivencia de P150 y P300.

Por otra parte, nuestros resultados revelaron un descenso marcado en la proliferación celular 24 horas tras el trasplante a lo largo de todo el eje proliferativo de la ZSV-CMR-BO. El descenso en el porcentaje de células en división a la edad de P20 fue, además, similar al encontrado a las edades de P60 y P150, sin diferencias significativas entre las tres edades, por lo que se puede concluir que el daño sufrido en el eje ZSV-CMR-BO no se recuperó a lo largo del tiempo. Estudios previos han demostrado que la radiación provoca un descenso inicial en la proliferación de la ZSV seguido de un incremento, en un “intento” de restaurar dicha proliferación celular (Shinohara et al., 1997; Tada et al., 1999). Sin embargo, este aumento secundario de la proliferación celular sufre un retraso temporal en función de la dosis empleada; además, la proliferación

vuelve a reducirse posteriormente (Tada et al., 1999). En este último estudio, no se encontraron variaciones en la morfología de la CMR o del OB. Sin embargo, el objetivo principal del mismo fue estudiar la ZSV sin que la CMR fuese analizada en detalle; de hecho, los autores no especificaron la dosis de radiación utilizada en el análisis de la CMR y los resultados obtenidos en esta estructura coinciden con los observados tras el tratamiento con dosis reducidas de radiación. El grupo de Hellström (Hellström et al., 2009) describió una recuperación parcial de la proliferación celular de la ZSV, aunque no del giro dentado de la formación hipocampal. Los autores explicaron esta discrepancia en función de la diferente composición celular de las dos estructuras: la ZSV posee más células madre “verdaderas” que el giro dentado. Teniendo en cuenta que las células madre presentan una tasa de proliferación más lenta que los progenitores neurales, dichas células madre son menos vulnerables a la radiación (Romanko et al., 2004a, b), por lo que la ZSV podría recuperarse más fácilmente tras un daño moderado. Además, los animales de dicho estudio se irradiaron con una dosis de 6,5 Gy (Hellstrom et al., 2008), insuficiente para eliminar la médula ósea y, por ello, incapaz de destruir sus células madre y posiblemente otras células madre como las neurales (Díaz et al., 2011). Por el contrario, la dosis empleada en nuestro estudio de 7,5 Gy sí es capaz de dañar la población de células madre “verdaderas” de la ZSV, evitando la recuperación del eje ZSV-CMR-BO. Otros estudios que se han centrado en los efectos de la radiación en la CMR han descrito un incremento en la proliferación celular (Balentova et al., 2006, 2007). Sin embargo, estos autores emplearon dosis de radiación más bajas que en nuestro estudio (3 Gy), lo que explica esta gran diferencia con nuestros resultados.

Es necesario destacar en este apartado que en dos de los niveles rostrocaudales en los que se dividió el eje ZSV-CMR-BO no se encontraron diferencias entre los animales irradiados y los controles: CMR II a P60 y CMR-BO a P150; figura 58 b, d). Esta discrepancia con la tónica general de reducción en el porcentaje de células proliferativas de los animales irradiados puede explicarse por los cambios en la morfología y la densidad celular observados en estas regiones. La tasa de proliferación se calculó como el porcentaje de células proliferativas con respecto al total de células. Como pudimos observar, en

especial a las edades de supervivencia más avanzadas, la radiación redujo tanto el número de células en división como el número total de células y, por eso, la proporción de las primeras pudo alcanzar valores similares a los del grupo control. Además, se ha demostrado que la edad produce una disminución de la proliferación celular (Tropepe et al., 1997). Ambos fenómenos pudieron enmascarar las diferencias en proliferación entre los animales irradiados y los controles, de manera que en aquellas regiones donde los valores entre los grupos no fuesen muy dispares, no se pudieron detectar diferencias significativas.

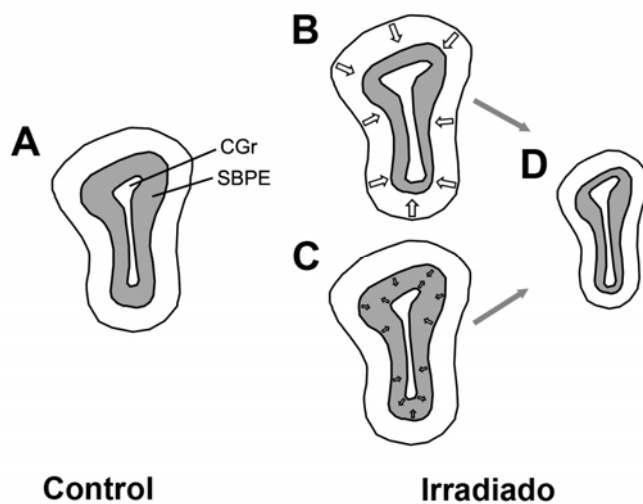
### ***Las CDMO no tuvieron efectos en las regiones dañadas por la radiación***

Como se ha descrito anteriormente, las CDMO llegaron y se integraron en el cerebro de los animales trasplantados. Sin embargo, no se detectó ninguna célula que expresara la GFP con características neuronales o astrocitarias en las regiones proliferativas de la ZSV-CMR-OB. Tan sólo se encontraron en estas zonas, células microgliales y las pequeñas células positivas para GFP pero negativas para Iba1 (posiblemente células no neurales de tipo hemato-poyético; Massengale et al., 2005; Moore et al., 2005). Además, no se encontraron diferencias a lo largo del tiempo en el número de estas células en estas regiones neurogénicas, ni se observó una recuperación en la proliferación celular. Por todo ello, las CDMO no tuvieron efecto en la recuperación de las regiones dañadas por la radiación.

### ***La irradiación empleada reduce notablemente el tamaño del bulbo olfativo***

La considerable reducción del BO y los cambios morfológicos observados en su laminación a P300 son la consecuencia final del daño producido por la radiación: el daño permanente sufrido por la vía de proliferación y migración (ZSV-CMR-BO) hace que muy pocos neuroblastos sean capaces de llegar a las diferentes capas del BO para reemplazar las interneuronas perdidas de forma natural a lo largo de la vida del animal. Un estudio reciente ha demostrado que una dosis de radiación de 15 Gy reduce de forma significativa la neu-

rogénesis rostral, afectando a la llegada de los neuroblastos a las capas del BO (Lazarini et al., 2009). Al igual que en nuestro trabajo, no se detectó una recuperación en la proliferación a lo largo del tiempo, pero tampoco cambios en el volumen del BO, posiblemente porque el tiempo de supervivencia empleado (131 días) no fue suficientemente largo para constatarlo (Lazarini et al., 2009). Nuestros resultados demostraron cambios en la CGr, la CPE y la CG, destino final de los neuroblastos migratorios (Lois y Álvarez-Buylla, 1994; Petreanu y Álvarez-Buylla, 2002; Carleton et al., 2003), pero no en la SBPE. La mayoría de los neuroblastos procedentes de la CMR se incorporan a la CGr (Valero et al., 2007) que fue la capa afectada más gravemente por la radiación. La CPE está caracterizada por una baja densidad celular y una gran cantidad de neuropilo, siendo las dendritas de los granos su principal componente (Shepherd, 1972; Kratskin y Belluzzi, 2003). Por ello, la reducción del volumen de la CPE pudo deberse tanto al defecto en la llegada de sus propias células procedentes de la



**Control**

**Irradiado**

**Figura 66.** Esquema explicativo de los cambios de las capas del BO. **a**, BO de un animal control. La radiación induce una disminución en la CGr (**b**) que revela fibras de la SBPE, incrementando su área (**c**). Sin embargo, la disminución general del tamaño del BO (**d**) compensa el aumento de la SBPE, que no muestra diferencias con la de un animal sin irradiar (**a** y **d**).

CMR (Lazarini et al., 2009), como al defecto en la reposición de los granos y, en consecuencia, a la pérdida de sus dendritas. En cuanto a la SBPE, es la capa más interna del BO, a la que llega la CMR-BO (Lois y Álvarez-Buylla, 1994; Lois et al., 1996; Carleton et al., 2003). Además, las fibras aferentes y eferentes al BO discurren por esta capa conectando el BO con el resto del encéfalo (Price y Sprich, 1975; Willey et al., 1983). La pérdida celular de la CGr pudo

dejar al descubierto dichas fibras, incrementando la extensión de la SBPE. Sin embargo, la disminución general del tamaño del BO pudo compensar esta variación, por lo que finalmente no se detectaron cambios en el tamaño de la misma entre los dos grupos de estudio (figura 66). Además, los granos no env-



ían ninguna neurita a la SBPE, al carecer de axón (Ramón y Cajal, 1911; Shepherd, 1972; Kratskin y Belluzzi, 2003). Por ello, la pérdida de estas células no afectaría al tamaño de la SBPE. Más aún, se ha demostrado que la pérdida de neuronas del BO con axón –tales como las células mitrales– afecta más a las capas más externas del BO, que a las internas. Esto se debe a que el tamaño del axón es despreciable en comparación con el del soma y los árboles dendríticos (Valero et al., 2007). Finalmente, se ha descrito que la radiación puede afectar también al reemplazo celular de la CG (Lazarini et al., 2009). Nuestros resultados revelaron una disminución en el volumen de esta capa, pero en menor medida que en el caso de la CGr o la CPE. Si tenemos en cuenta que a dicha CG llega un menor número de neuroblastos que a la CGr (Valero et al., 2007), su volumen se vería afectado en menor medida por el daño producido por la radiación (Lazarini et al., 2009).

## **El trasplante de médula ósea mejora la capacidad de movimiento de los ratones PCD**

Las pruebas de comportamiento motor con los ratones irradiados y trasplantados a P20 fueron las primeras en realizarse. Su objetivo fue el estudio del efecto funcional del trasplante de una médula ósea silvestre en ratones mutantes, a lo largo de su periodo de supervivencia. Se llevaron a cabo a edades en las que la ataxia de los ratones PCD es muy marcada (Mullen et al., 1976), por lo que no fue posible colocarlos en la varilla del rota-rod para realizar un análisis motor. Por esta razón, las pruebas realizadas fueron la de campo abierto y la de velocidad de desplazamiento. Para excluir posibles sesgos debidos a la radiación que pudiesen enmascarar los resultados derivados del trasplante de médula ósea sana (Recio, 2008) se emplearon varios grupos experimentales. Además de los PCD sin trasplante, PCD trasplantado con médula ósea sana (heterotrasplante) y el grupo silvestre, se incluyeron los grupos de PCD trasplantado con médula de PCD (homotrasplante) y silvestre trasplantado con médula sana.

En la prueba de campo abierto se analizaron cinco parámetros diferentes: *cruces completos*, *medios cruces*, *alzadas*, *limpiezas* y *defecaciones*. Los



parámetros *cruces completos* y *medios cruces*, aunque tienen que ver con el estado emocional de un animal (moviéndose menos aquellos animales con un cierto nivel de depresión), están muy relacionados con la capacidad motora (Ramos et al., 2008). De esta manera, los cruces completos implican un movimiento dirigido hacia un punto concreto, de forma estable y continua, siendo más frecuentes en aquellos animales con un desplazamiento normal. Por el contrario, los medios cruces serán más frecuentes en aquellos desplazamientos inestables y poco dirigidos con frecuentes cambios de dirección, típicos de animales con una capacidad de movimiento alterada. Los parámetros *alzadas* y *limpiezas* no presentan una relación exclusiva con un tipo de comportamiento. Su relación es compleja y compartida con tendencias exploratorias y emocionales, pero también están implicados con la capacidad de movimiento (Ramos et al., 2008), de manera que si un animal tiene alteraciones motrices, también tendrá más dificultades para incorporarse sobre sus patas traseras. Finalmente, la cuantificación de las *defecaciones* no reveló diferencias significativas entre los grupos de estudio. Este parámetro es un indicador de la reactividad emocional y del estrés al que se encuentran sometidos los animales durante las pruebas comportamentales (Takahashi et al., 2006). De esta manera y a tenor de los resultados obtenidos, podemos descartar la influencia de posibles sesgos, respondiendo todos los animales de manera similar a cierto nivel de estrés por manipulación. Finalmente, la prueba de velocidad de desplazamiento es posiblemente la que permite tener un conocimiento de la capacidad motora de los animales de forma más exclusiva y natural, además de permitirnos comparar los resultados obtenidos con trabajos previos (Recio, 2008).

A modo de resumen, los valores medios recogidos a lo largo de estas pruebas de comportamiento demostraron una notable mejoría en la motricidad de los animales PCD trasplantados con médula ósea de tipo silvestre, con resultados intermedios entre los grupos silvestres y los otros dos grupos de PCD. A pesar de los efectos de la radiación en el BO (ver más arriba), la ausencia de diferencias comportamentales entre los dos grupos silvestres excluyó la influencia de este tratamiento agresivo en la motricidad de los animales. Por otra parte, los valores similares del grupo de PCD homotrasplantados y sin trasplantar apuntan a la carencia de un efecto beneficioso de la médula ósea mutante.

La mejora notable en el movimiento de los ratones PCD heterotrasplantados hacía pensar en un rescate de las células de Purkinje, dada la ataxia cerebelosa característica de este modelo experimental (Mullen et al., 1976). Sin embargo, como discutiremos más adelante, no se encontraron evidencias de esta recuperación en el cerebelo de los ratones PCD.

Una vez que se demostró que el trasplante de médula ósea mutante en ratones PCD (homotrasplante) no tenía efecto alguno, se eliminó este grupo experimental del resto de pruebas de comportamiento, con el fin de reducir el uso de animales. Por otra parte, el objetivo de esta Tesis Doctoral era utilizar las células derivadas de una médula ósea silvestre para recuperar funcionalmente a los ratones mutantes PCD. Por eso, no tuvo sentido continuar con el trasplante de células de médula ósea mutante. Así pues, en los trasplantes realizados a P0 sólo se empleó médula ósea de tipo silvestre. Como se ha mencionado anteriormente, el objetivo de estos experimentos fue anticipar todo lo posible el trasplante para ver si era posible el rescate de las células de Purkinje de los animales mutantes. En este caso, la prueba de comportamiento motor elegida fue el rota-rod ya que, a la edad a la que se realizó, la ataxia de los ratones PCD aún no es tan grave (Mullen et al., 1976) y se pueden colocar en la varilla giratoria para comprobar posibles mejoras en su motricidad (Carro et al., 2001; Carrascosa et al., 2004). Los dos grupos de animales silvestres (con y sin trasplante) presentaron valores superiores a los grupos de PCD, sin diferencias significativas entre los animales mutantes trasplantados y sin trasplantar. En este caso, no se observó una llegada notable de CDMO al cerebelo de estos ratones (tan sólo algunas células de microglía), descartando efectos tanto directos (rescate celular mediado por fusión) como indirectos del trasplante (ver más adelante; Chen et al., 2003; Li et al., 2006; Spees et al., 2006; Prockop y Olson, 2007; Chopp et al., 2008). De hecho, la degeneración cerebelosa de los ratones trasplantados a P0 fue similar a la de los ratones sin trasplante (Mullen et al., 1976), confirmando la ausencia de un efecto del trasplante en esta región encefálica, traducida en la ausencia de un efecto en el comportamiento motor. Por todo ello, nuestros resultados indican a que la mejora en el movimiento debida al trasplante de médula ósea sana se produce a largo plazo, al menos en los casos en los que no se observa un rescate de células de Purkinje.

## ***La mejoras comportamentales son independientes de los cambios del cerebelo estudiados***

Como hemos visto en el apartado anterior, los ratones PCD trasplantados con médula ósea de tipo silvestre a la edad de P20 experimentaron una mejora general en su motricidad. Sin embargo, la ausencia total de células de Purkinje en el cerebelo de estos animales, originadas o no a partir de la médula ósea, descartó cualquier rescate celular.

En un trabajo anterior realizado en nuestro laboratorio se propuso la radiación como una posible causa de esta mejora (Recio, 2008), ya que ésta provoca procesos inflamatorios locales (incluido el encéfalo), rotura temporal de la barrera hematoencefálica, inducción de cambios en los niveles de quimiocinas, secreción de citocinas proinflamatorias y extravasación de células sanguíneas (Recio, 2008). Sin embargo, descartamos esta teoría ya que si así fuese, deberíamos haber detectado diferencias en el comportamiento de los ratones mutantes trasplantados con médula ósea de PCD (homotrasplantados), con respecto a los animales mutantes sin trasplantar. Así, la mejora comportamental de los ratones PCD heterotrasplantados hubo de deberse forzosamente a los efectos de la médula ósea silvestre.

Existen evidencias previas en modelos de neurodegeneración cerebelosa donde se ha conseguido una mejora funcional sin que exista necesariamente un rescate de las células de Purkinje mediante procesos de fusión celular (Jones et al., 2010). La médula ósea silvestre o sus derivados pueden producir la secreción de diversas quimiocinas y citocinas con efectos muy diversos, tales como la estimulación de la regeneración y proliferación celular, la disminución de la apoptosis, la supresión de reacciones inmunes o el incremento de la angiogénesis, de manera que se favorecería la recuperación funcional (Chen et al., 2003; Li et al., 2006; Spees et al., 2006; Prockop y Olson, 2007; Chopp et al., 2008). Todos estos factores podrían contribuir a la mejora funcional en los ratones PCD trasplantados con médula ósea sana, pero no en aquellos homotrasplantados o sin trasplantar, ya que la médula de estos dos últimos grupos portaría la mutación. De esta manera, no se pueden excluir otros cambios plásticos debidos al efecto beneficioso del trasplante. Por ejemplo, la disminu-

ción de degeneraciones secundarias a la pérdida de las células de Purkinje, como la de los granos del cerebelo, los oligodendrocitos o los núcleos cerebelosos profundos (Mullen et al., 1976; Triarhou et al., 1987; Fernández-González et al., 2002; Baltanás et al., enviado). Además, nuestro estudio se centró en el análisis del BO y del cerebelo, por lo que no se puede excluir que el trasplante afectase a otras regiones encefálicas relacionadas con el comportamiento motor.

La mejora funcional de los ratones PCD heterotrasplantados puede encontrarse también fuera del encéfalo. En el presente trabajo se analizó una porción torácica de la médula espinal y el músculo gastrocnemio para tener una aproximación a estos posibles efectos. El análisis realizado en la médula espinal demostró la presencia de células microgliales derivadas de la médula ósea. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre los grupos experimentales en la morfología de dicha médula espinal o en el número de dichas células de microglía, así como tampoco se observaron neuronas ni otros tipos gliales derivados de las células trasplantadas. Ello nos inclina a descartar la influencia de cambios en la médula espinal como posible explicación de la mejora funcional. Por otra parte, se ha demostrado que las CDMO son capaces de llegar al músculo estriado e integrarse en él formando fibras musculares funcionales (Ferrari et al., 1998; Gussoni et al., 1999; LaBarge y Blau, 2002), fenómeno que ya se ha aprovechado con fines terapéuticos (Gussoni et al., 1999). En nuestro trabajo se detectó la presencia de fibras musculares derivadas de la médula ósea en los ratones trasplantados, tanto silvestres como PCD. Además, la densidad de estas fibras fue superior en los ratones mutantes, sugiriendo una mayor integración que pudo ayudar a la mejora comportamental de los mismos.

Una aproximación al estudio de estos factores fue el análisis de la sangre periférica de los animales trasplantados. En primer lugar, se analizó el estado de óxido-reducción del glutatión, como indicador del nivel de estrés oxidativo de los animales (Dringen y Hirrlinger, 2003; Franco y Cidlowski, 2009; Hirrlinger y Dringen 2010). En este caso, no se encontraron diferencias entre los grupos experimentales, por lo que el nivel de estrés oxidativo general de los diferentes grupos experimentales no parece ser la causa de la mejora en el comportamiento.

El análisis de IGF-I se basó en el hecho de que los ratones PCD son deficitarios para este factor neurotrófico (Zhang et al., 1997, 1999) y que su administración externa ejerce un efecto neuroprotector en la pérdida de las células de Purkinje (Carro et al., 2001; Carrascosa et al., 2003). Según nuestra hipótesis, el IGF-I derivado de las células de la médula ósea sana podría ser mediador del efecto neuroprotector de dicho trasplante también en las células mitrales de los ratones PCD. Nuestros resultados demostraron que los niveles de IGF-I de los ratones PCD, con y sin trasplante, fueron inferiores a los niveles de los animales silvestres, corroborando resultados previos (Zhang et al., 1997, 1999). Sin embargo, los ratones PCD trasplantados no presentaron niveles de IGF-I superiores a los de los ratones PCD sin trasplante. De este resultado se deduce que el trasplante de médula ósea sana no incrementa los niveles de IGF-I de los ratones PCD; por tanto, tampoco es mediador de la neuroprotección observada en las células mitrales de los animales mutantes trasplantados con médula ósea de tipo silvestre.

Finalmente, otra posible explicación a la mejora en la motricidad de los ratones PCD heterotrasplantados es la relación de ésta con el comportamiento olfativo. En la presente Tesis Doctoral quisimos analizar el efecto del trasplante de médula ósea sana en la función sensorial (olfato) y motora de los ratones mutantes PCD. El SNC es extraordinariamente complejo y el organismo es una unidad integrada. Por eso, no es de extrañar que ambos parámetros puedan estar, en cierta medida, relacionados. Nuestros resultados demostraron que los ratones PCD trasplantados poseen una mayor capacidad olfativa que los PCD sin trasplante, lo que también puede implicar una mayor capacidad exploratoria, que tendría como consecuencia una mayor movilidad. Además, la deprivación olfatoria en los roedores provoca alteraciones en el sistema serotoninérgico, desencadenando fenómenos de depresión (Lumia et al., 1992; Slotkin et al., 2005; Gómez et al., 2007). Los parámetros registrados en la prueba de campo abierto están influidos por la reactividad emocional (Ramos, 2008); es decir, el grado de depresión de los animales. Si una mayor capacidad olfativa y, por tanto, una mejor percepción del entorno implican cambios en el estado emocional, es lógico que los PCD trasplantados con médula ósea sana presenten una mo-

vilidad mejor, además de los datos demostrados en relación específica con cada uno de los dos sistemas.

## **El trasplante de médula ósea ralentiza la pérdida de células mitrales de los ratones PCD y mejora su capacidad olfativa**

El análisis de la densidad de células mitrales de los ratones PCD trasplantados a P20 reveló que la pérdida de este tipo celular en los animales homotrasplantados y sin trasplantar fue idéntica y seguía una progresión similar a la descrita previamente (Valero et al., 2007). Por el contrario, la degeneración de las células mitrales de los ratones PCD trasplantados con médula ósea sana fue más lenta que en los dos grupos anteriores, encontrándose diferencias significativas entre ellos a la edad de P150. Este hecho nos llevó a analizar la capacidad olfativa de los ratones trasplantados a esta edad de supervivencia, incluyendo tanto animales mutantes como silvestres, dados los cambios estructurales que se habían detectado en el BO a causa de la radiación.

Las pruebas realizadas en los olfatómetros demostraron, en primer lugar, que la capacidad de detección y discriminación olfativa de los dos grupos de ratones silvestres, con y sin trasplante, fue similar. Por eso, aunque la radiación empleada para eliminar la médula ósea de los ratones receptores causó un cierto daño en la neurogénesis del BO, no mermó la capacidad olfativa de estos animales, al menos a P150. Según nuestros resultados, el daño producido por la radiación provocó una alteración en la estructura del eje ZSV-CMR-BO y un descenso en su proliferación celular que llevó a una reducción del volumen del BO a P300 (Díaz et al., 2011). Sin embargo, a la edad de P150, aunque la proliferación celular estaba alterada, la capacidad olfativa de los ratones trasplantados había cambiado. La neurogénesis del eje ZSV-CMR-BO, fundamental para la continua reposición de las interneuronas del BO, es clave para la memoria olfativa, pero no parece influir directamente en la capacidad de olfacción (Mouret et al., 2008; Lazarini et al., 2009). De todas formas, no se debe excluir la posibilidad de que, a más largo plazo, con un BO con una fuerte

pérdida de interneuronas, se produzcan alteraciones en la capacidad olfativa de los ratones irradiados y trasplantados.

Según los datos obtenidos, los ratones PCD presentaron una capacidad reducida de detección y discriminación olfativas, por debajo de la capacidad de los ratones silvestres. Es lógico pensar que esta anomalía se deba a la pérdida de las células mitrales, ya completada a la edad a la que se realizó esta prueba (Greer y Shepherd, 1982). Además, la capacidad olfativa de los ratones PCD trasplantados con médula ósea sana, aunque no tan buena como la de los silvestres, sí que fue sensiblemente superior a la de los PCD sin trasplantar, al menos en los procesos de detección y discriminación de la (+)-carvona y la (-)-carvona. Este dato está en clara relación con la pérdida más reducida o más lenta de las células mitrales de los ratones PCD trasplantados en comparación con los PCD sin trasplantar. Tras nuestros estudios, no se encontraron en ningún momento células mitrales derivadas de la médula ósea, ni por fenómenos de fusión ni de transdiferenciación. Así pues, de alguna manera la médula ósea sana trasplantada parece ejercer cierta neuroprotección en la población de células mitrales de los ratones PCD trasplantados. Posiblemente, esta neuroprotección se deba a los efectos orgánicos de esta médula ya discutidos en el apartado anterior, bien ejercidos desde la sangre misma, o bien vía la microglía que coloniza estas regiones (Chen et al., 2003; Li et al., 2006; Spees et al., 2006; Prockop y Olson, 2007; Chopp et al., 2008). A pesar de la contundencia de estos resultados, no se puede excluir que la pérdida (y a la vez la neuroprotección) de las células mitrales afecte de forma diferente a la capacidad de detección o discriminación de otros odorantes diferentes a los empleados en la presente Tesis Doctoral.

Finalmente, la evaluación del tiempo de reacción de las retiradas correctas -retirar la cabeza de la cámara de presentación de odorantes tras un estímulo negativo- en las pruebas de comportamiento olfativo descartó un posible sesgo debido a las dificultades motoras de los ratones PCD. El análisis de este parámetro se realizó tan sólo en aquellas pruebas realizadas correctamente por los ratones y en las que éstos pudieran detectar adecuadamente los odorantes. No tendría sentido su evaluación en sesiones de entrenamiento o a concentraciones de odorante difíciles de detectar, ya que en estos casos los animales no

tienen una pauta de comportamiento establecida. El tiempo de reacción de todos los grupos fue idéntico a excepción de la última prueba de discriminación olfativa (mezcla de odorantes de 56% / 44%). En este caso, el tiempo de reacción de los dos grupos de animales mutantes fue mayor, lógicamente, al no ser capaces de realizar una discriminación adecuada.

### ***La pérdida de las células mitrales en los ratones PCD altera la electrofisiología del bulbo olfativo***

Una vez realizadas las pruebas de comportamiento, se analizó la actividad del BO de los diferentes grupos de animales, mediante el registro de potenciales de campo locales. El análisis se centró en las oscilaciones  $\gamma$  del BO relacionadas con la descarga sincrónica de las células de proyección del BO (Lagier et al., 2007), aunque también se registraron las oscilaciones  $\theta$  (relacionadas con la respiración y el olfateo) y  $\beta$  (derivadas de la información que llega al BO desde centros superiores).

En primer término, los registros electrofisiológicos demostraron un patrón de oscilaciones  $\theta$  similares para todos los animales, indicando un ritmo de respiración y olfateo similar. Sin embargo, las oscilaciones  $\gamma$  mostraron claras diferencias entre los grupos experimentales: la amplitud era mucho mayor en los dos grupos de animales silvestres en comparación con los dos grupos de ratones PCD. Además, mientras que la amplitud de estas oscilaciones en los ratones silvestres variaba considerablemente en función de la actividad exploratoria, en los PCD se mantuvo invariable. Por último, la administración de picrotoxina, antagonista de los receptores GABA<sub>A</sub> de las células mitrales (Friedman y Stowbridge, 2000), incrementó la amplitud y redujo la frecuencia de las ondas  $\gamma$  en los dos grupos de ratones silvestres, sin modificar en cambio los parámetros correspondientes a los animales mutantes. Si tenemos en cuenta que los ratones PCD pierden las células mitrales pero no otras poblaciones de neuronas de proyección del BO (Greer y Shepherd, 1982; Greer y Halász, 1987; Recio et al., 2007; Valero et al., 2007), nuestros resultados apuntan a que las descargas sincrónicas del BO que dan origen a las oscilaciones  $\gamma$  son propiciadas de forma exclusiva por las células mitrales y no por todas las neu-



ronas de proyección, como se pensaba anteriormente (Laurent et al., 2001; Egger y Urban, 2006).

En cuanto a los trasplantes, no se encontraron diferencias entre los patrones de amplitud y frecuencia de las oscilaciones  $\gamma$  entre los ratones PCD trasplantados y sin trasplantar. Este resultado parece contradecir la mejora en el comportamiento olfativo de los animales trasplantados y la mayor densidad de células mitrales en comparación con los ratones PCD sin trasplantar. Hay diversas explicaciones para este hecho. En primer lugar, aunque la densidad de células mitrales de los ratones PCD trasplantados es superior a la de los ratones PCD sin trasplante, aún es reducida en comparación con la densidad en ratones silvestres (Valero et al., 2007). Los registros electrofisiológicos realizados son potenciales de campo locales que recogen la actividad debida a las descargas sincrónicas de una parte del BO (Laurent et al., 2001). Por ello, puede que no lleguen a registrar por completo la actividad total del BO, aunque son el mecanismo más utilizado y fiable para analizar la actividad electrofisiológica del mismo (Laurent et al., 2001; Lagier et al., 2007). Por eso, es posible que aunque el mayor número de células mitrales de los ratones trasplantados fuese suficiente para mejorar la capacidad olfativa en la que interviene todo el BO, resultase insuficiente para detectar cambios locales en la actividad eléctrica. Por otra parte, el proceso de neurodegeneración del BO implica una serie de cambios plásticos en la sinaptología de las neuronas remanentes (Greer y Halász, 1987; Recio et al., 2007). Así pues, es posible que la actividad electrofisiológica de las células mitrales supervivientes en los ratones PCD trasplantados experimente variaciones, cambiando sus patrones de frecuencia y amplitud. De esta manera, el análisis de las oscilaciones de estas células sería completamente distinto y difícilmente comparable con otros grupos experimentales, lo que abre toda una nueva línea de investigación.

Finalmente, el análisis exhaustivo de las oscilaciones del BO en diferentes contextos comportamentales (inmovilidad, exploración o presencia de un olor desconocido), además de revelar las ya comentadas diferencias en las ondas  $\gamma$  entre los dos genotipos, también mostró un cierto efecto deletéreo en las ondas  $\theta$  y  $\beta$  debido a dos factores: el fenotipo y el trasplante. En los ratones mutantes PCD, las anomalías en estas ondas son fácilmente explicables por

los grandes cambios volumétricos que experimenta el BO y que pueden afectar a las oscilaciones debidas a las entradas sensoriales del nervio olfativo (ondas  $\theta$ ) y a las aferencias superiores (ondas  $\beta$ ). En el caso de los ratones trasplantados, este efecto muy probablemente se deba al proceso de radiación empleado para eliminar la médula ósea de los receptores. Además, los cambios en el BO debidos a la mutación o a la radiación pueden provocar reorganizaciones estructurales plásticas que alteren también estas oscilaciones (Recio et al., 2007; Valero et al., 2007). Las ondas  $\theta$  y  $\beta$  tienen relación con las entradas de información al BO, ya sea procedentes del nervio olfativo durante el olfateo, o procedentes de centros nerviosos superiores, y están influidas por la estructura y el tamaño del BO. Así, aunque nuestros resultados demostraron que aunque la radiación no afecta la capacidad olfativa, sí provoca daños en la neurogénesis que afectan en último término al volumen del BO. De esta manera, estos efectos deletéreos de la radiación pudieron afectar a las oscilaciones  $\theta$  y  $\beta$  antes de que el cambio en el volumen del BO fuese sensible. Trabajos parecidos apoyan esta hipótesis, al demostrar que la radiación provoca alteraciones en la neurogénesis del BO, sin afectar a la capacidad olfativa, pero detectando otros cambios sutiles, como en la memoria olfativa a largo plazo, sin que el volumen del BO estuviese afectado (Lazarini et al., 2009).

A pesar de todos estos cambios en la electrofisiología del BO, se puede comprobar que las alteraciones debidas al procedimiento empleado de radiación y trasplante resultan intrascendentes, en comparación con los beneficios en la mejora de la olfacción de los animales mutantes.



# Conclusiones

*"Conclusión es el lugar donde llegaste cansado de pensar."*

*Anónimo*



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

- I. El trasplante de médula ósea exógena es seguro y efectivo, al promover la supervivencia de los animales receptores, tras una ablación tanto física como química de su propia médula.
- II. Las células derivadas de la médula ósea trasplantada por vía intravenosa llegan al encéfalo de los animales receptores y se integran de forma progresiva en el mismo, formando tanto elementos gliales como neuronales. La llegada de microglía es notablemente mayor en los animales irradiados que en los animales sometidos a ablación química de la médula ósea.
- III. Los mecanismos de plasticidad detectados que están implicados en la integración de las células derivadas de la médula ósea en el encéfalo son dos: fusión y transdiferenciación, sucediendo de forma simultánea en un mismo animal, aunque en distintas poblaciones celulares.
- IV. El microambiente neurodegenerativo causado por la mutación *pcd* tanto en homocigosis como en heterocigosis incrementa la integración de células derivadas de la médula ósea en el encéfalo de los animales receptores trasplantados.
- V. El trasplante perinatal de médula ósea tras la ablación química con busulfán en animales gestantes no es lo suficientemente rápido como para rescatar las células de Purkinje de los ratones PCD antes del final de su degeneración.
- VI. El trasplante de médula ósea de tipo silvestre aumenta la capacidad de movimiento de los ratones mutantes PCD. Sin embargo, el trasplante no supone un rescate de las células de Purkinje, lo que no se correlaciona con dicha mejora comportamental. Probablemente, esta recuperación se deba a otros mecanismos de plasticidad en diferentes regiones encefálicas o extra-encefálicas, sin descartar una exploración más activa gracias a la mejora en la capacidad olfativa de los ratones PCD trasplantados con médula ósea de tipo silvestre.

- VII. El trasplante de médula ósea sana produce un efecto neuroprotector en las células mitrales de los ratones PCD ralentizando, al menos, su pérdida y posibilitando una mayor capacidad olfativa en comparación con los mutantes sin trasplantar para los odorantes (+)-carvona y (-)-carvona.
- VIII. La mutación *pcd* produce la práctica supresión del patrón de oscilaciones  $\gamma$  del bulbo olfativo. Estas alteraciones no se revierten con el trasplante realizado.
- IX. La radiación empleada para eliminar la médula ósea provoca alteraciones en la neurogénesis del bulbo olfativo que llevan en último término a una reducción del volumen del mismo, modificando sutilmente su electrofisiología. Sin embargo, estos efectos de la radiación no afectan a la capacidad olfativa o al movimiento de los animales receptores.
- X. El nivel de óxido-reducción del glutatión en la sangre de los ratones no se ve influido ni por el genotipo ni por los trasplantes realizados. Los niveles de neuroprotección ejercidos por el trasplante no parecen estar influidos por la cantidad de IGF-I detectada en la sangre, ya que este factor de crecimiento sólo varía en función del genotipo del animal.
- XI. De forma global, podemos concluir que el trasplante de médula ósea sana, aunque entraña ciertos efectos secundarios, constituye una herramienta eficaz para el tratamiento paliativo de las enfermedades neurodegenerativas basado en la terapia celular. Es necesaria una investigación más profunda en este campo, sobre todo a la hora de acelerar y optimizar la integración de las células derivadas del trasplante en las regiones afectadas por la neurodegeneración.

# Summary







**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

Cell therapy in the central nervous system:  
structural and functional recovery in a mu-  
rine model of selective cell death

**-DOCTORAL THESIS-**  
(ABSTRACT)

DAVID DÍAZ LÓPEZ

Salamanca, May 2011



## Introduction

One of the top current research fields in Biomedicine is the study of stem cells. Moreover, the term “stem cell” has passed to the general public, and it often appears in newspapers, TV programs, and nearly all the mass media. However, the question remains as what a stem cell really is, and which the possible applications of these cells might be. This Doctoral Thesis addresses these issues in greater depth, advancing another step in the field of research into stem cells.

One of the most accurate definitions of stem cells belongs to the National Institutes of Health: “*Stem cells are distinguished from other cell types by two important characteristics. First, they are unspecialized cells capable of renewing themselves through cell division, sometimes after long periods of inactivity. Second, under certain physiologic or experimental conditions, they can be induced to become tissue- or organ-specific cells with special functions*” (<http://stemcells.nih.gov/policy/2009guidelines.htm>). In sum, stem cells have two main properties: self-renewal and an unlimited potential for differentiation.

Stem cells have been isolated from almost all the body organs and tissues, and not only in embryonic stages but also in adulthood. These locations include the gastrointestinal tract (Brittan and Wright, 2002), the corneal epithelium (Sun and Lavker, 2004), the skin (Tumbar, 2006; Clayton et al., 2007; Gurtner et al., 2008), the mammary glands (Clayton et al., 2004), adipose tissue (Lindroos et al., 2010), the pancreas (Seaberg et al., 2004), the heart (Leri et al., 2005), the liver (Ogawa and Miyagawa, 2009), the lungs (Griffiths et al., 2005), the gonads (von Schalburg et al., 2006), the prostate gland (Burger et al., 2005), bone marrow (Wilson and Trumpp, 2006) and the brain (Altman, 1969; Lois and Álvarez-Buylla, 1993; Doetsch et al., 1997, 2002, 2003; García-Verdugo et al., 1998).

Adult stem cells were originally believed to have a potential for differentiation restricted to the organ to which they belonged, maintaining its homeostasis and the number of cells (Blau et al., 2001). Nevertheless, in the later 90's it was demonstrated that stem cells from a given organ can travel throughout the

body and settle in other tissues, bone marrow stem cells being one of the best examples (Eglitis and Mezey, 1997; Wilson and Trumpp, 2006). These cells can change their natural fate and differentiate into cells of several tissues both *in vitro* (Grove et al., 2004; Mimeault and Batra, 2006; Tögel and Westenfelder, 2007) and *in vivo* (Wilson and Trumpp, 2006). In fact, bone marrow stem cells are able to differentiate into cells of diverse organs, including the lung, heart, muscle, gut, kidney, retina, liver, pancreas, spleen, skin and brain (Forbes et al., 2002; Grove et al., 2004; Álvarez-Dolado, 2007). The plasticity of bone marrow stem cells is so extensive that a single bone marrow cell can reconstitute the complete hematopoietic system, whose cells can also differentiate into cells of diverse organs (Krause et al., 2001).

The differentiation of bone marrow-derived cells (BMDC) into glial elements was demonstrated for the first time in the late 90's (Eglitis and Mezey, 1997). Three years later, it was reported that such cells can also differentiate into neurons (Brazelton et al., 2000; Mezey et al., 2000). This process has mainly been analyzed in the cerebellum, where BMDC contribute to the Purkinje cell population (Priller et al., 2001b; Wagers et al., 2002; Álvarez-Dolado et al., 2003; Weimann et al., 2003b; Corti et al., 2004; Bae et al., 2005; Bae et al., 2007; Magrassi et al., 2007; Johansson et al., 2008; Nygren et al., 2008; Recio et al., 2011), even in humans (Weimann et al., 2003a). Two possible mechanisms have been proposed as being responsible for this plasticity: transdifferentiation and cell fusion, thus creating a certain controversy. A stem cell transdifferentiates when its original fate changes, and it becomes another cell type different from what it was supposed to become. In cell fusion, two cells join their cytoplasm and, eventually, their nuclei, forming a single binucleated or polyploid cell. Originally, some authors supported the first mechanism (Priller et al., 2001b), but there is now further and more recent evidence that supports the second possibility (Álvarez-Dolado et al., 2003; Weimann et al., 2003a, 2003b; Magrassi et al., 2007; Johansson et al., 2008; Recio et al., 2011). However, little is known about the regulation or the physiological/pathological significance of the cell fusion process.

Cell fusion increases over time (Weimann et al., 2003a, 2003b; Magrassi et al., 2007), and the cells derived during its course can survive for months

(Magrassi et al., 2007; Johansson et al., 2008). In addition, it may be modified by the microenvironment or the degenerative condition of the surrounding tissue. Indeed, the arrival of BMDC at a given organ is increased by pathological conditions or injuries (Gussoni et al., 1999; Lagasse et al., 2000; Jackson et al., 2001), and the brain is no exception. The effect of a neurodegenerative environment has been observed both in direct cerebellar engraftments (Bae et al., 2005), and in systemic bone marrow transplantations (Magrassi et al., 2007; Johansson et al., 2008; Nygren et al., 2008; Espejel et al., 2009). It has been demonstrated that radiation is not necessary for cell fusion to be induced (Magrassi et al., 2007; Johansson et al., 2008), although radiation-induced damage can boost the number of cell fusion events (Nygren et al., 2008; Espejel et al., 2009), probably by means of an inflammatory trigger (Johansson et al., 2008). Finally, in the process of cell fusion, most of the resulting Purkinje cells express markers of both donor and recipient origin (Álvarez-Dolado et al., 2003; Weimann et al., 2003b; Johansson et al., 2008). Accordingly, this process of cell plasticity can be employed as a therapeutic method in the sense that through fusion, a donor cell is able to afford a Purkinje cell a “healthy” genotype. Contrary to the cerebellum, other encephalic regions have been poorly analyzed. This is the case of the olfactory bulb (OB), a neurogenic structure characterized by a continuous cell turnover that has an origin in neural stem cells (Lois et al., 1996; Doetsch et al., 1997; Doetsch, 2003; Carleton et al., 2003). In addition, the OB is characterized by the plasticity of its axonal circuitry, which may change after different alterations (Recio et al., 2007). Moreover, until very recently (Recio et al., 2011), the results regarding the contribution of BMDC to this structure were controversial and inconsistent (Brazelton et al., 2000; Priller et al., 2001b; Corti et al., 2002; Massengale et al., 2005).

In the present work we employed the PCD (Purkinje Cell Degeneration) mouse as a model of neurodegeneration. PCD mice undergo a selective post-natal neuronal loss in different encephalic areas at specific ages (Mullen et al., 1976; Fernández-González et al., 2002; Wang and Morgan, 2007). There are different alleles of the *pcd* mutation, with common features but with different specific characteristics (Wang and Morgan, 2007). Here we employed animals with the original mutation, denominated *pcd*<sup>1J</sup>, the strain most widely used. Ho-

mozygous recessive mice (*pcd/pcd*) undergo a degeneration of Purkinje cells around postnatal day 20 (P20), which causes severe ataxia (Mullen et al., 1976). In addition, these mice undergo a selective cell loss of mitral cells in the OB at around P60 (Greer and Shepherd, 1982). Previously, the cellular and synaptic organization of the OB seems to be normal, but after the progressive mitral cell loss, an almost complete absence of these projection neurons is observed at around P90-P120. PCD mice also suffer degeneration of the lateral olfactory tract (Recio et al., 2007), thalamic neurons (O'Gorman, 1985; O'Gorman and Sidman, 1985) and photoreceptors (Mullen and LaVail, 1975; Blanks et al., 1982).

PCD mutant mice are completely normal at birth and hence lack prenatal compensatory mechanisms for their neurodegenerative processes (Greer and Shepherd, 1982). They can therefore be considered as a suitable animal model to analyze the effects of cell therapy based on the transplantation of healthy bone marrow stem cells with a view to addressing neurodegeneration.

## Objectives

This work described here is a further step in the study of the application of BMDC for possible regenerative purposes. Its main aim has been to develop an efficient cell therapy in PCD mice aimed at palliating the neurodegeneration of both the Purkinje cells and mitral cells, and an amelioration of the symptoms derived from their loss. The specific objectives are as follows:

- I. To perform engraftments of healthy bone marrow in wild-type and PCD mutant mice, employing both physical and chemical methods of bone marrow ablation, and to compare both methods of ablation and their results.
- II. To check the survival of the recipients, following the progressive incorporation of transplanted cells in order to determine the viability of the transplants.
- III. To study the behaviour and the physiology of the transplanted animals, especially their motor and olfactory functions.

- IV. To analyze the integration of bone marrow-derived cells in the OB and the cerebellum of the transplanted animals. To perform a quantitative study of this integration and to compare it between wild-type and mutant recipients. Also, to analyze extra-encephalic regions, such as the skeletal muscle or the spinal cord, in order to check the possible effects of the transplant outside the brain.
- V. To study the effect of the neurodegenerative micro-environment at different levels of severity in the incorporation of the transplanted cells into the encephalon.
- VI. To study the effects of the bone marrow transplantation in the encephalic tissues of the recipients, both the positive –concerning the possible recuperation from neurodegeneration-, and the negative ones, regarding the possible secondary effects of the aggressive methods of bone marrow ablation.

The achievement of these objectives should increase our knowledge of the application of bone marrow cells as a possible therapeutic tool to combat neurodegenerative diseases.

## Material and methods

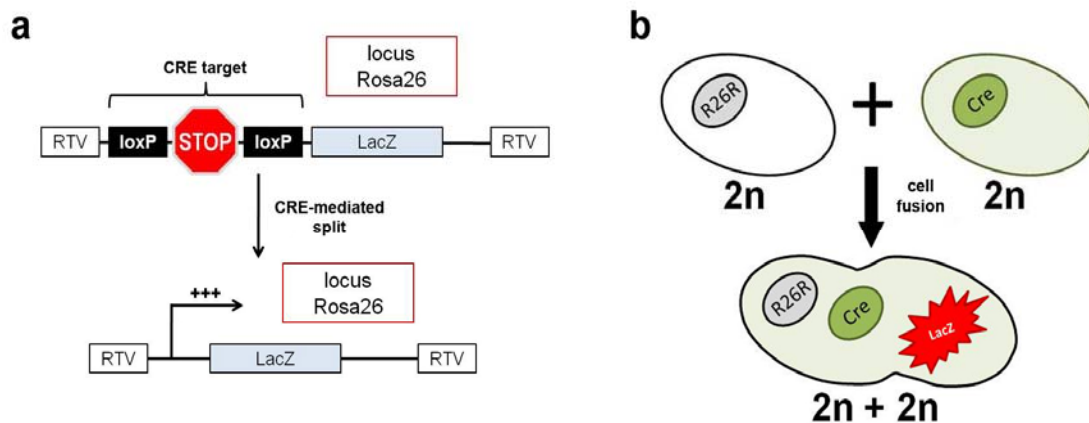
### *Animals*

The animals employed in this Doctoral Thesis for experimentation were mice, *Mus musculus* L. 1758 (Muridae, Rodentia, Mammalia) of the C57BL/6J, DBA/2J and BALB/c-Tg(CMV-cre)1Cgn/J strains (Jackson Laboratories, Bar Harbor, USA). We crossed mice from both strains to obtain the donor (C57BL/6J x DBA/2J) and the recipient animals (C57BL/6J x BALB/c-Tg(CMV-cre)1Cgn/J). All mice were housed at the animal facilities (Servicio de Experimentación Animal) of the University of Salamanca with an artificial photoperiod of 12/12 hours, and were fed *ad libitum* with water and special rodent chow. All animals were housed, manipulated and sacrificed according to current European (86/609/ECC, directive 2003/65/CE) and Spanish (RD 1201/2005, law



32/2007) legislation. All procedures were approved by the Bioethical Committee of the University of Salamanca.

In bone marrow transplantation studies, it is very important to identify the donor-derived cells (in this case, BMDC) and their progenies in recipient tissues. We employed two methods to detect these cells: green fluorescent protein (GFP) detection and the CRE-loxP system. Donor mice were transgenic for the GFP. Accordingly, after bone marrow transplantation the cells derived from the donor bone marrow were readily distinguishable in the recipient tissues owing to their distinctive fluorescent green labelling. The CRE-loxP system allowed us to discriminate between the different processes of cell plasticity. Donor animals were transgenic for the CRE recombinase whereas the recipient mice were transgenic for the *lacZ* reporter gene, which encodes the expression of  $\beta$ -galactosidase. This gene is preceded by a “stop” codon also flanked by two loxP sequences. Thus, only if CRE recombinase is in the same cell of the *lacZ* system will the “stop” codon be removed and  $\beta$ -galactosidase expressed. Taking into account these two systems, cells derived from the grafted bone marrow would be GFP-positive, but only those with  $\beta$ -galactosidase expression would result from a fusion process (figure 1).



**Figure 1. Detection of cell fusion.** **a**, Schematic representation of the R26R mice line and the effect of the CRE-mediated split of the stop codon. **b**, only when a cell expressing CRE recombinase fuses with a R26R cell will the *lacZ* reporter gene be expressed in the fused cell.

Regarding the genotype of the recipient animals, we employed wild-type mice as well as homozygous and heterozygous mice for the *pcd* mutation (+/*pcd* and *pcd/pcd*, respectively). In general, we used wild-type GFP CRE mice

as donors and wild-type, *+/pcd* and *pcd/pcd lacZ* animals as recipients. In some experiments, we also used *pcd/pcd* GFP CRE mice as donors when we analyzed the consequences of ablation and transplantation without the influence of the effect of healthy bone marrow.



Figure 2. Mouse performing the open field test

## ***Bone marrow ablation and transplantation***

We deployed two methods of ablation: radiation and chemical ablation with busulfan. The animals subjected to the first procedure were irradiated at P19 with a dose of 7.5 Gy provided by a  $^{137}\text{Cs}$  source. Chemical ablation was performed by means of injecting busulfan intraperitoneally in a pregnant female at embryonic days E17 and E18, as previously described (Espejel et al., 2009), in order to have offspring lacking bone marrow. Cell transplants were carried out at P20 in the tail vein of the irradiated mice. In the case of newborns treated prenatally with busulfan, cell injections were performed intrahepatically at P0.

Grafted cells came from the femurs and tibias of the donor mice, and were extracted as reported previously (Recio et al., 2011; Díaz et al., 2011). Each recipient animal -both mice transplanted at P20 and mice transplanted at P0- received a suspension of  $7.5 \times 10^6$  bone marrow cells.

After the transplantation the mice were housed for 15 days in a sterile insulation rack and then under normal conditions at the animal facilities of the University of Salamanca. The level of engraftment was assessed by measuring the percentage of GFP-positive blood cells by flow cytometry of the peripheral blood at different time points during the survival of the mice and immediately before sacrifice.

## ***Behavioural tests***

The mice were subjected to different behavioural tests to assess the effects of transplantation in the PCD animals. The mice transplanted at P20 were tested for both motor and olfactory capacities. Behavioural motor tests were

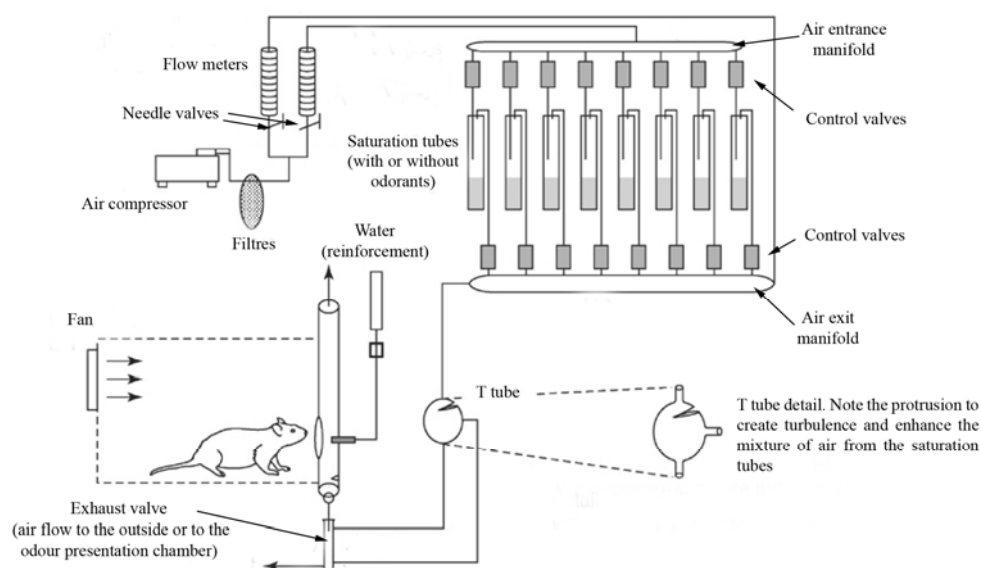
begun once mice had been moved from the insulation rack, and were performed weekly over 7 weeks. Taking into account the severe ataxia of PCD mice, the rota-rod test could not be performed, and hence open-field tests and average speed of displacement were assessed. The open-field test was performed in the box shown in figure 2. Different parameters were counted: “*complete crosses*”, when the four paws of a mouse crossed a line completely, and “*half crosses*” 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 average speed of displacement test, we measured the time taken by the different animals to move one metre.

Five groups of animals were employed: wild-type mice (WT), PCD mice (PCD), wild-type mice grafted with healthy bone marrow (WT transp-WT), PCD mice grafted with healthy bone marrow (PCD transp-WT) and PCD mice grafted with PCD bone marrow (PCD transp-PCD). The latter three groups allowed the assessment not only of the possible benefits of the healthy bone marrow transplantation, but also possible side effects –either positive or negative- due only to the process of irradiation and transplantation.

Olfactory tests were performed at the facilities of the Pasteur Institute (Paris). Taking into account the results obtained with the motor tests (see “Results” below), PCD-derived bone marrow had no effects and therefore, in order to minimize the use of animals, we employed only the other four groups. Both olfactory detection and discrimination were evaluated using home-made olfactometers similar to those employed previously (Mouret et al., 2008), based on the designs of Bodyak and Slotnick (1999). Briefly, animals partially deprived of water were trained to place their snouts in the odour presentation tube of the olfactometer to detect a given odorant (figure 3). Depending on the presence of a positive (S+) or negative (S-) stimulus, the animals received or not a droplet of water as reinforcement of the task. Two different tests were performed: odorant detection and odorant discrimination. In the **detection** test, the S+ was the presence of the odorant (+)-carvone and the S- was the absence of odorant. Different odorant concentrations were tested along this experiment. The stimuli of the **discrimination** tasks were (+)-carvone as S+, and (-)-carvone as S-. In

addition, both enantiomers were progressively mixed. To assess the capacity of olfaction in both tests, each animal was scored with a percentage based on four parameters: (1) “*hit*”, when the mouse licked the droplet of water in the presence of S+; (2) “*miss*”, when the animal did not lick in the presence of the S+; (3) “*correct rejection*”, when the mouse did not lick with the S-; (4) “*false alarm*”, when the animal licked with the S-.



**Figure 3.** Diagram of the employed olfactometers (modified from Slotnick and Restrepo, 2005)

After these tests, the animals underwent surgical procedures to set two electrodes stereotaxically in their OB to record local field potentials. The recordings were focused on the analysis of the gamma ( $\gamma$ ) oscillations (40-100 Hz) formed by the synchronic signals of mitral cells. In addition, both theta ( $\theta$ ; 1-12 Hz) and beta ( $\beta$ ; 20-40 Hz) waves were recorded. These oscillations are related to the sniffing and the OB efferent information, respectively. Moreover, a capillary tube was also emplaced to infuse picrotoxin (PTX), an antagonist drug of the GABA<sub>A</sub> receptor subunit of mitral cells to test their over-excitation.

Taking into account the results obtained with the mice irradiated and transplanted at P20 (see Results and Discussion), P0 engraftments were performed to advance the arrival of the bone marrow-derived cells in the brain as much as possible. Then, mice transplanted at P0 were allowed to survive until P30, as a maximum, to detect the effects of this possible arrival before the

complete degeneration of Purkinje cells in the PCD mice (Mullen et al., 1976). In this case, the milder ataxic state of the mice allowed the performance of the rota-rod test at P30.

### ***Sacrifice, dissection, and tissue analysis***

Most mice transplanted at P20 were sacrificed at 3 different ages: P60, P110 and P150. Moreover, we sacrificed old (P300) wild-type and heterozygous mice to study the effects of the radiation at very long-term survival times and to assess the arrival of bone marrow-derived cells in cerebella with a mild neurodegeneration process. P0-grafted animals were sacrificed sooner at 2 different ages: P20 and P30.

The animals were anaesthetized and perfused through the ascending aorta with fixative solution. This solution was chosen according to the methods later employed for identifying donor cells (X-Gal histochemistry or immunofluorescence). The brains were dissected and cut into blocks. A thoracic portion of the spinal cord and a sample of the gastrocnemius muscle were also analyzed. Tissue blocks were carefully rinsed and cryoprotected with 30% (w/v) sucrose in PBS (Phosphate Buffered Saline; 0.1 M, pH 7.4) overnight at 4 °C. Following this, serial sections were obtained with a freezing microtome (40 µm), for the encephalon; a cryostat (14 µm) for the muscle; or a rotating microtome (7 µm), for the spinal cord. Finally, BMDC were visualized and characterized in both wild-type and PCD transplanted animals. Receptors grafted with CRE-GFP cells were analyzed by both X-Gal histochemistry and double or triple immunofluorescence (see below). X-Gal is an artificial substrate of  $\beta$ -galactosidase, and its histochemical visualization allows the recognition of the contribution of BMDC to the recipients' encephalon through cell fusion. Immunofluorescence techniques were used to identify GFP cells with other cellular antigens for both neurones (calbindin for Purkinje cells; reelin for mitral cells) and glial cells (GFAP for astrocytes; Iba1 for microglia). We also performed PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) immunohistochemistry to detect proliferating cells and the TUNEL technique to reveal apoptosis.

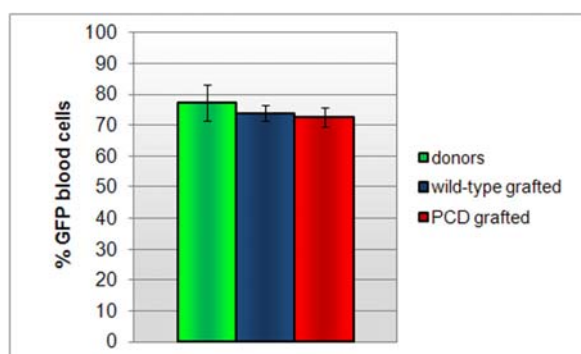
Cell counting was performed using the NeuroLucida, (V8.23, MicroBrightField, Colchester, VT, USA) the Neuroexplorer (V4.70.3, MicroBrightField) and

the ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) programs. Once homoscedasticity had been checked (Kolmogorov-Smirnov test), quantitative differences for behavioural studies or tissue analyses were assessed by ANOVA (with the Bonferroni *post hoc* test) or by Student's *t* test. The level of significance for inter-group differences was set at  $p < 0.05$  (\*) and  $p < 0.01$  (\*\*). The statistical software employed was SPSS v17.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA).

## Results

### *Viability of the transplants and mouse survival*

All grafted animals survived for a long period after transplantation, with very few exceptions (i.e. few animals died due to ineffective incorporation of the transplant). In contrast, control animals whose bone marrow had been ablated but had not received a transplant, died. Moreover, the percentage of GFP-



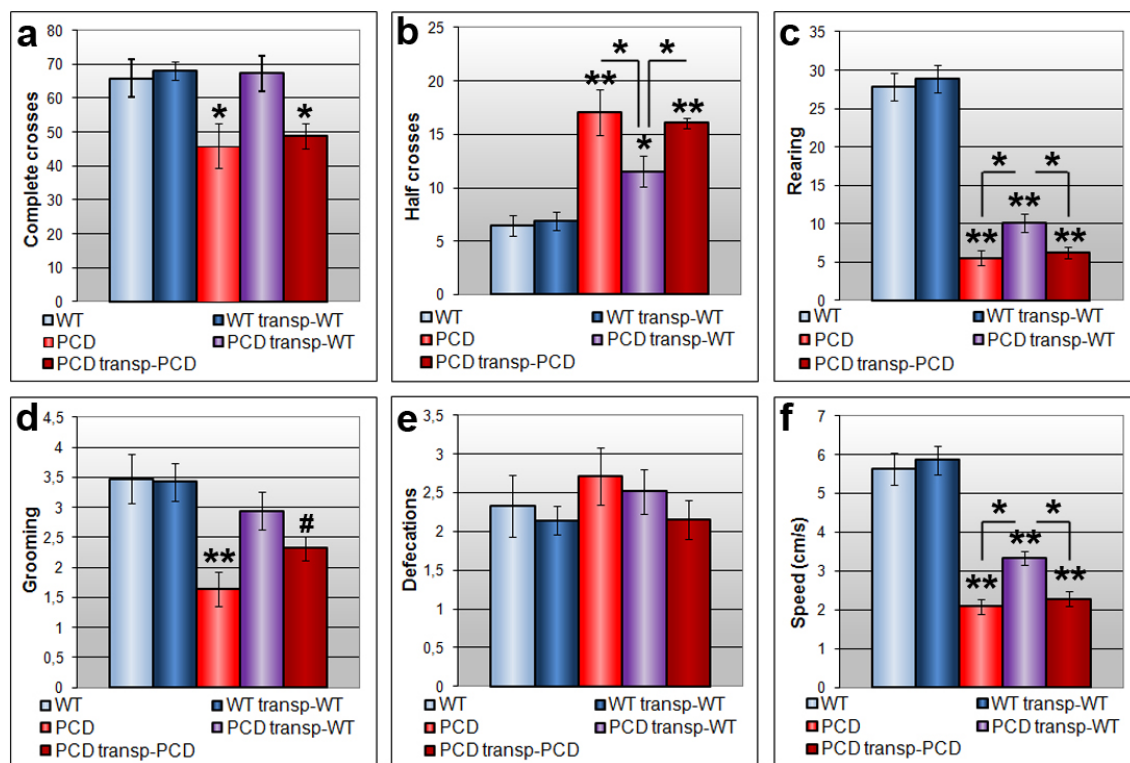
**Figure 4.** Percentage of GFP-positive blood cells of donors and recipients at P150.

positive blood cells increased with time in the transplanted animals. Regarding the mice irradiated and transplanted at P20, this percentage reached the level of the donor animals at 6 weeks post-engraftment and persisted over time (figure 4). These findings demonstrated the substitution of the bone marrow of the recipients by the newly transplanted marrow and hence the safety and efficacy of the transplantation procedure. In the case of the mice transplanted at P0, the percentage of GFP positive blood cells also increased over time (survival at P20,  $25.21 \pm 6.82$  SEM; survival at P30,  $34.45 \pm 2.80$  SEM). However, the engraftment of these animals was lower than that corresponding to the animals irradiated and transplanted at P20.

## Behavioural improvements of the transplant

### Motor coordination

Regarding the different behavioural tests, in the open-field analysis significant differences were observed for all parameters related to movement capacity. No differences were detected between either of the wild-type groups for each parameter. Similarly, no differences were also detected between the PCD animals without grafts and the PCD mice transplanted with PCD bone marrow (homotransplanted). A comparison among these four groups revealed a notably lower capacity of movement of the mutant animals. However, the PCD mice

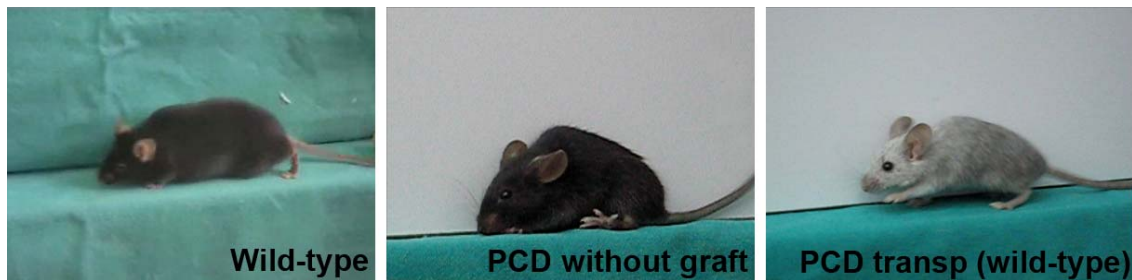


**Figure 5.** Motor behaviour. **a-e**, open field tests revealed significant differences between wild-type (WT) animals and both non-grafted PCD and PCD animals transplanted with PCD bone marrow. However, PCD mice transplanted with WT bone marrow showed intermediate values between WT mice and the other two PCD groups, demonstrating the positive effect of healthy bone marrow transplantation. Only the “number of defecations” (**e**) parameter did not show any difference between the experimental groups, pointing to a similar stress level among the animals. The speed of displacement (**f**), was higher in the wild-type animals than in the PCD mice. Lower symbols (over SEM bars) indicate comparisons between the non-grafted WT animals and the other four groups. Symbols over connecting lines indicate comparisons amongst PCD groups. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; # indicates differences only between the WT mice and the PCD mice transplanted with PCD bone marrow,  $p < 0.05$ .  $n = 5$  animals each group.



transplanted with wild-type bone marrow (heterotransplanted) displayed intermediate behaviour between the wild-type animals and the other PCD groups (figure 5).

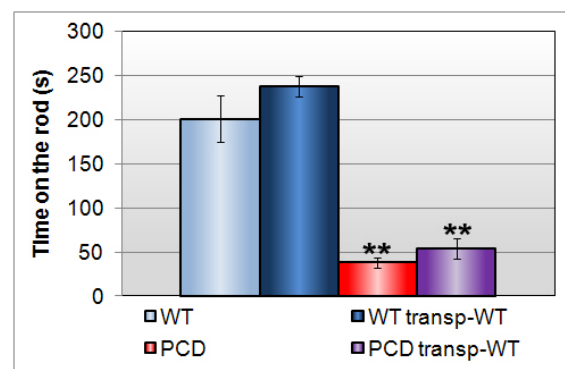
All animals showed the same stress level (measured by the *defecation* parameter), which allowed a comparison of the results obtained for the different groups.



**Figure 6.** Examples of the gait of mice. Note that PCD mice without transplant walked on their heels whereas wild-type animals and PCD mice transplanted with healthy bone marrow walked on their toes.

The results of the speed of displacement test were similar to those of the open field test: the speed of PCD mice after wild-type bone marrow transplantation was increased in comparison with their wild-type littermates (figure 5). This parameter was intermediate in comparison with both the other PCD animals and the wild-type mice. In addition, differences in the gait of animals were observed when they performed the speed of displacement test. The wild-type animals walked on their toes, but the PCD mice without treatment and PCD mice transplanted with PCD bone marrow walked on their heels. Interestingly, the gait of the PCD mice transplanted with healthy bone marrow, walking mainly on their toes, was more similar to that of wild-type animals than to PCD ones (figure 6).

In the case of the rota-rod test performed by mice transplanted at P0, significant differences were detected between the wild-type and PCD groups. However, regarding the effect of transplantation, no significant differences were observed between the



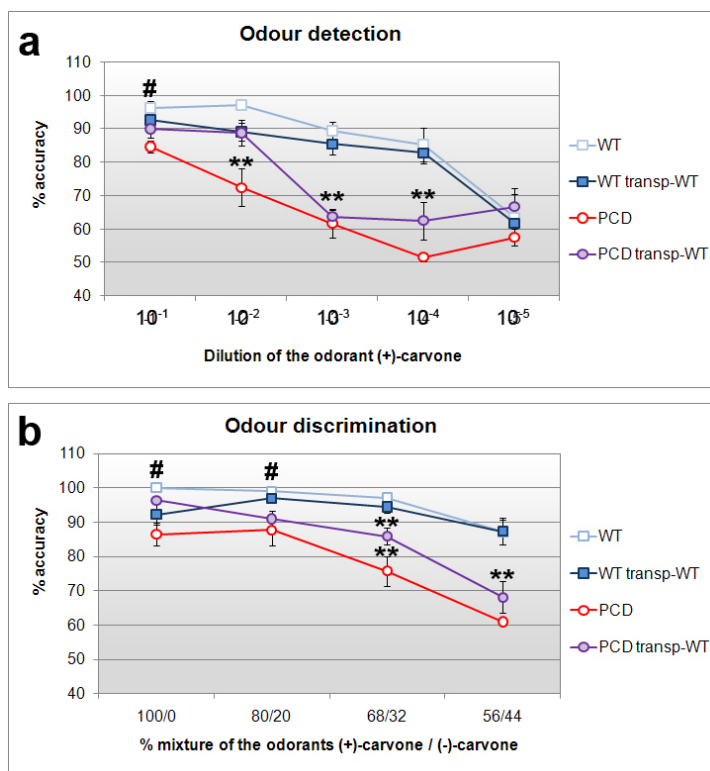
**Figure 7.** Rota-rod test performed in the P30 animals. Wild-type animals remained more time on the rod than the PCD ones. Further, no differences were detected between the two WT or the two PCD groups. \*\*  $p < 0.01$ .  $n = 5$  animals each group.



two wild-type groups or between the PCD animals (figure 7).

## Olfactory capacity

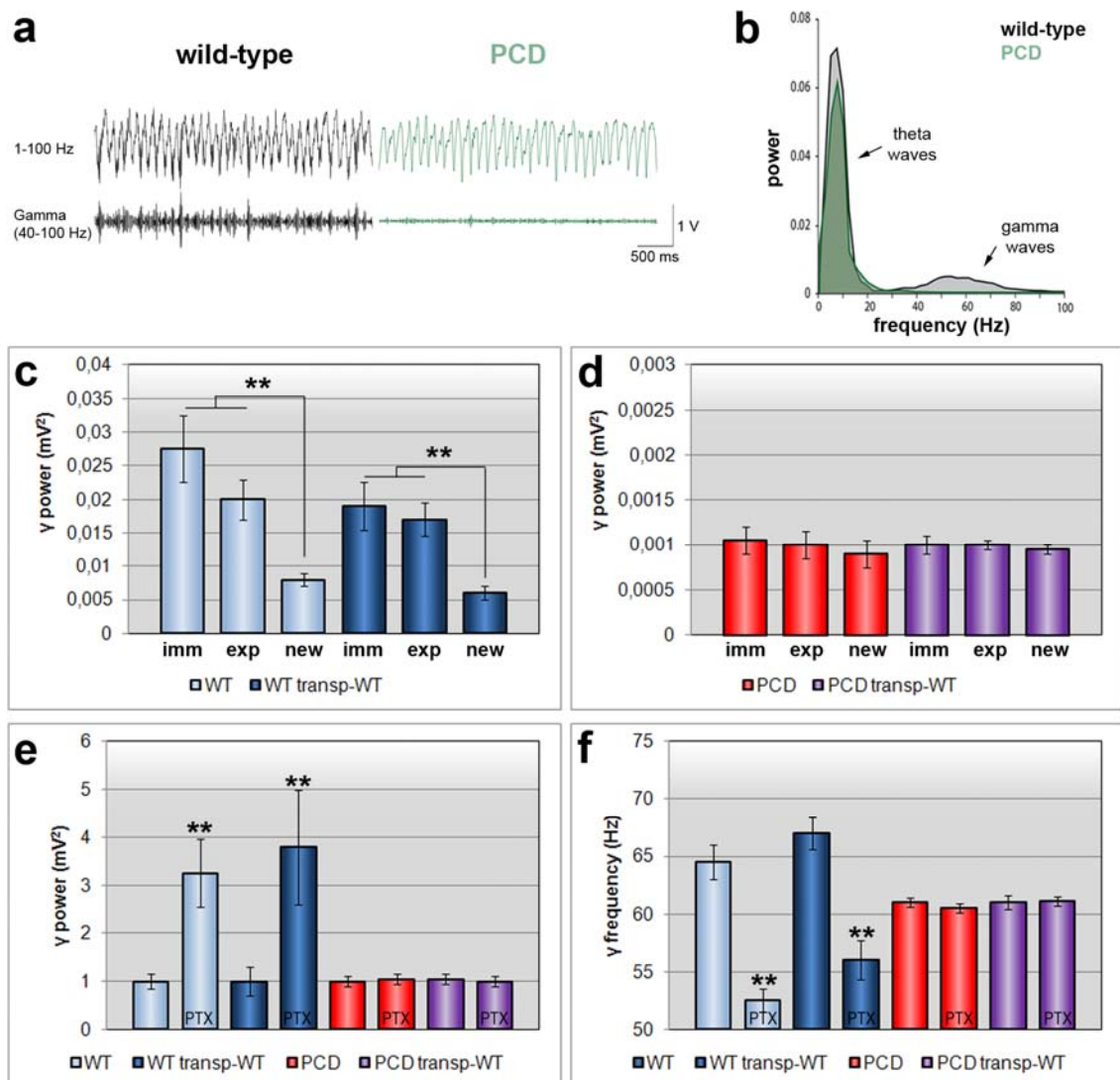
Concerning the odour detection level, the wild-type animals showed no statistical differences among one another, but a significantly better odour detection than the mutant mice. However, differences were also detected between the PCD groups, with an improvement in olfactory detection in the animals grafted with wild-type bone marrow (figure 8). These results were analogous to those regarding olfactory discrimination: the grafted PCD mice showed a higher capacity of discrimination in comparison with the non-grafted ones (figure 8). We also studied the reaction time of the “*correct rejections*” as an indication of the influence of the motor status of the animals: no significant differences were detected for this parameter, demonstrating the irrelevant influence of the ataxia of the PCD animals in the performance of the odour tests.



**Figure 8.** Olfactory behaviour. **a**, olfactory detection at different concentrations of the odorant (+)-carvone. **b**, olfactory discrimination with different mixtures of the odorants (+)-carvone as positive stimulus and (-)-carvone as negative stimulus. In both tests PCD grafted mice showed an improvement in their olfactory capacity in comparison with the PCD without transplant. Comparisons are referred to WT animals; \*\*  $p < 0.01$ ; in **b**, two sets of \*\* indicate differences among WT and both groups of PCD and also between mutant animals; # indicates differences only between the PCD and the control mice (both without transplant),  $p < 0.05$ .  $n = 10$  for each WT group, 8 for each PCD group.

## OB electrophysiology

The electrophysiology results revealed significant differences between the PCD and wild type animals regarding the amplitude and power of the gamma ( $\gamma$ ) waves, whereas the theta ( $\theta$ ) waves, related to sniffing, remained unchanged (figure 9). Upon studying the  $\gamma$  waves of the mice under different



**Figure 9.** Electrophysiological analysis of the OB. **a**, typical olfactory activity in the local field potentials recorded; the bursts of  $\gamma$  oscillations are superimposed over the  $\theta$  waves; note the differences in the  $\gamma$  range between groups. **b**, power spectrum of the local field potential signal; note the high power of both groups in the  $\theta$  range whereas the  $\gamma$  oscillations are absent in the PCD mice. **c** and **d**,  $\gamma$  oscillation power in different behavioural contexts of wild-type (**c**) and PCD (**d**) animals; the wild-type groups underwent changes in the  $\gamma$  power depending on these contexts, contrary to the PCD animals, which also had a lower  $\gamma$  power than the former. **e** and **f**,  $\gamma$  oscillation power (**e**) and frequency (**f**) after and before the infusion of PTX in anesthetized animals; the mean  $\gamma$  power was set at 1 before the infusion of PTX; note the change in both parameters in the wild-type groups whereas PCD the animals did not show any variation. \*\*  $p < 0.01$ . imm: immobility; exp: exploration of the cage; new: exploration of a new environment.  $n = 4$  for each group.

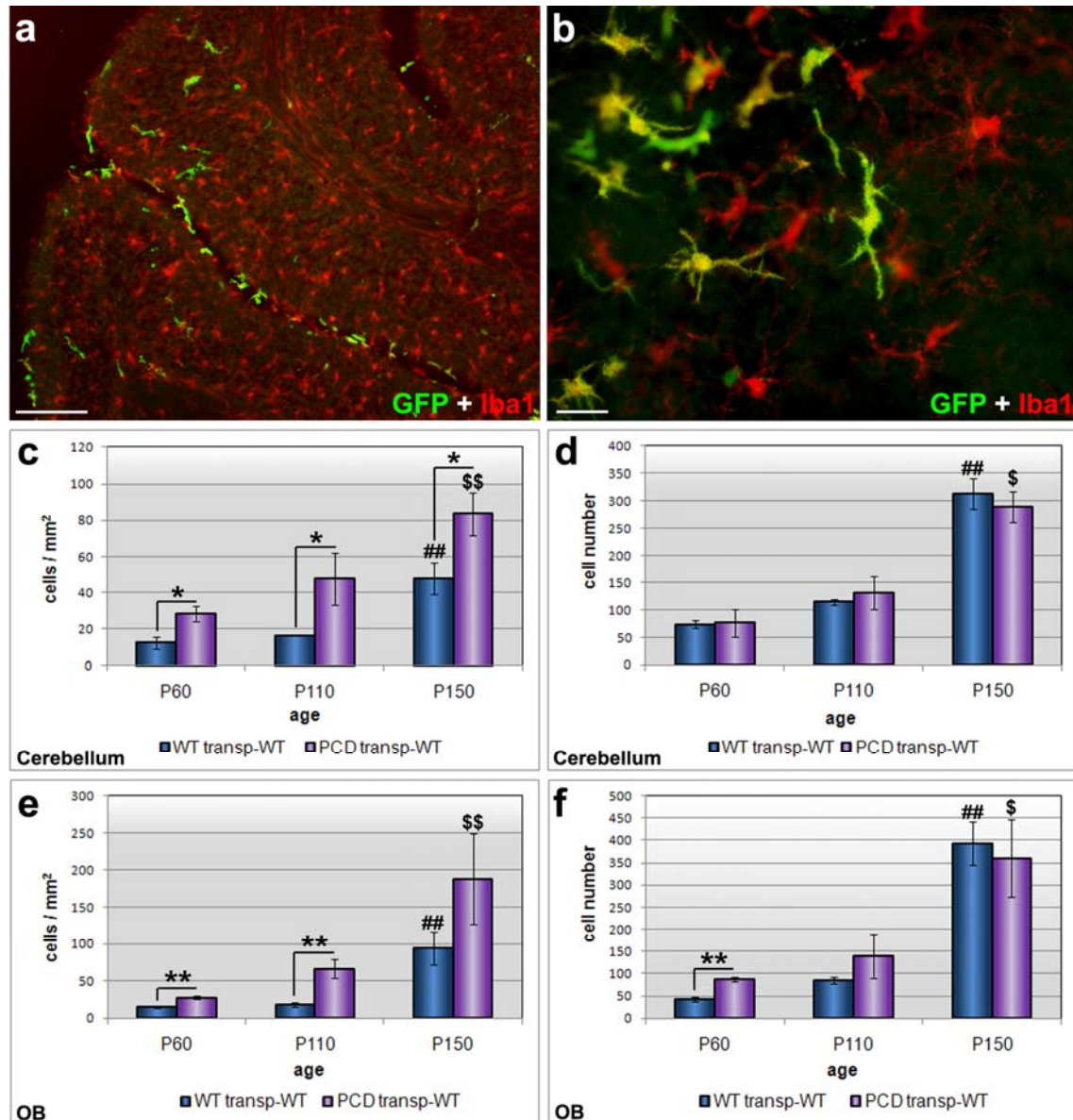
behavioural circumstances, both wild-type groups showed differences in the power of oscillations, whereas the PCD animals, with an oscillation power that was always lower than the wild-type, did not show any variation (figure 9). Finally, the infusion of PTX revealed a 4-fold increase in the  $\gamma$  power of the wild-type mice, accompanied by a decrease in the frequency of the oscillations (always in the range of 40-100 Hz). In contrast, the PCD mice did not show any variation in these parameters (figure 9).

### ***Arrival of BMDC in the encephalon. Effects of neurodegeneration and transplantation***

After sacrificing the experimental animals, we analyzed their encephala, looking for the donor bone marrow-derived cells in both the wild-type and PCD transplanted animals and the possible effects of the graft –both positive and negative - in the encephalic tissue of the recipients. The examination focused on the cerebellum and the OB, but we also checked the subventricular zone (SVZ) and its extent of migration, the rostral migratory stream (RMS). We compared the results from the wild-type and PCD transplanted animals in an attempt to discover the possible effect of the neurodegenerative environment on the arrival and contribution of the bone marrow-derived cells to these areas. The most abundant cell type derived from the transplanted bone marrow was the microglia in both wild-type and PCD animals transplanted at P20, and the only cell type detected in P0-transplanted animals (figure 10 a, b). In the case of P20-transplanted mice, we observed a progressive increase in the density of microglial cells in both experimental groups along the survival times (figure 10 c, e). Upon comparing PCD and wild-type mice, a significantly higher density of these cells was detected in the former group, in both the OB and cerebellum. However, taking into account the reduction in the volume of these structures in the mutant animals, the total number of bone marrow-derived microglial cells was similar in both experimental groups, with the exception of the OB at P60, where the differences were maintained (figure 10 d, f).

Concerning the P0 transplanted animals, the number of bone marrow-derived microglial cells was dramatically lower than in the P20 grafted mice. Indeed this number was so low that no differences were detected between the

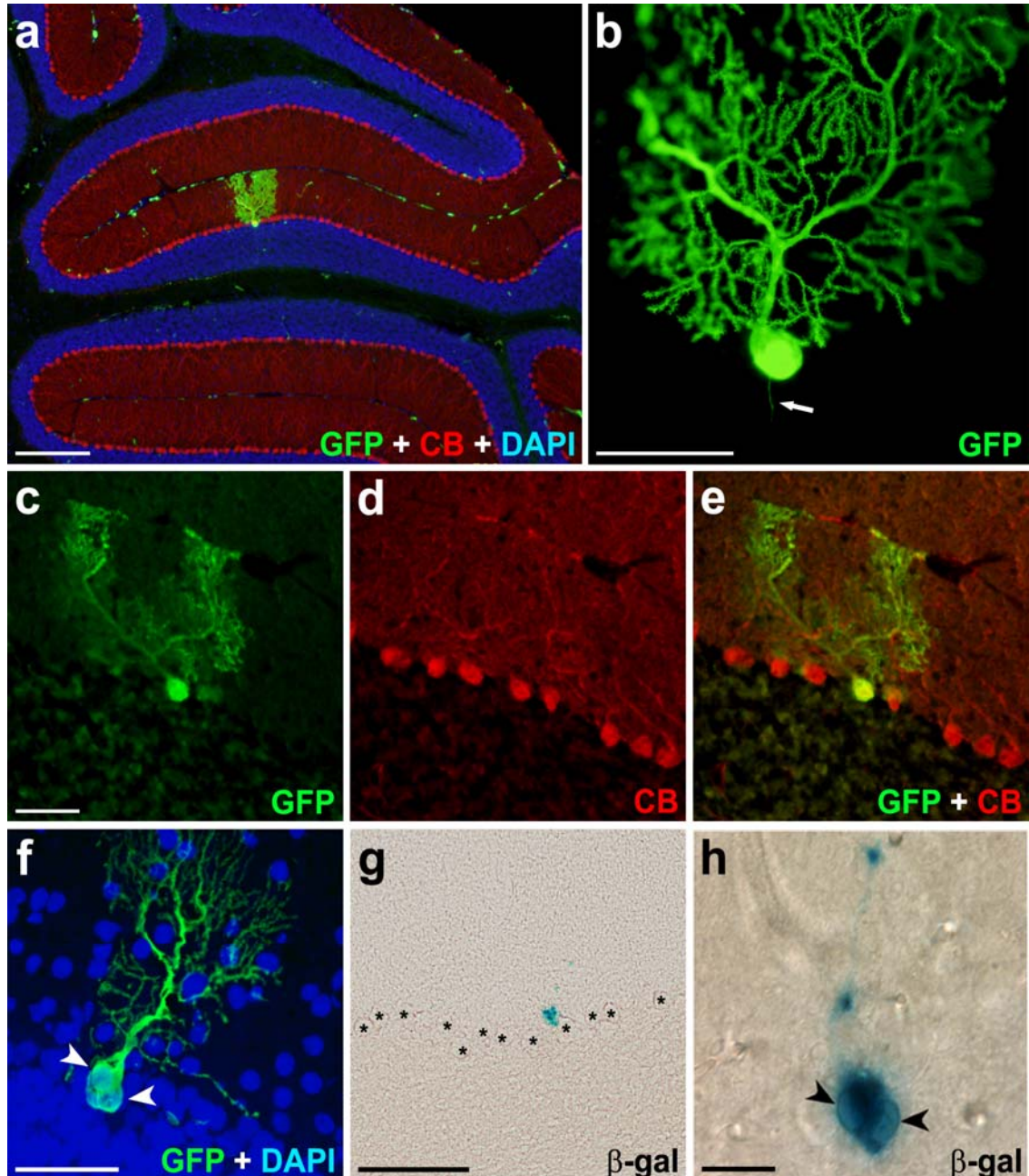
survival ages of the P20 and P30 animals. The mechanism of cell plasticity of bone marrow-derived microglia at both transplantation ages was transdifferentiation, since no X-Gal-positive or binucleated cells were detected in any of the mice. Finally, no bone marrow-derived astrocytes were detected in any of the animals studied.



**Figure 10.** Bone marrow-derived microglia (GFP, green) in the encephalon. **a** and **b**, examples of microglial cells (labelled with Iba1, red) in the brain regions analyzed. **c-f**, quantification of microglia in the cerebellum (**a, b**) and in the OB (**e, f**), comparison between transplanted wild-type and PCD mice. The charts shows microglia density (**c, e**) and total number of microglial cells (**d, f**). \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$  for differences between WT and PCD transplanted animals for each of the survival times studied; # indicates differences among the different ages of WT mice; \$ indicates differences among the different ages of the PCD mice. Scale bars: **a** = 100  $\mu\text{m}$ ; **b** = 20  $\mu\text{m}$ .



The results regarding the contribution of the bone marrow-derived cells to neuronal elements were different, depending on the genotype of the recipients, the region analyzed, and the age of survival. In the case of the cerebellum of wild-type transplanted animals, the only neuronal elements found were Pur-

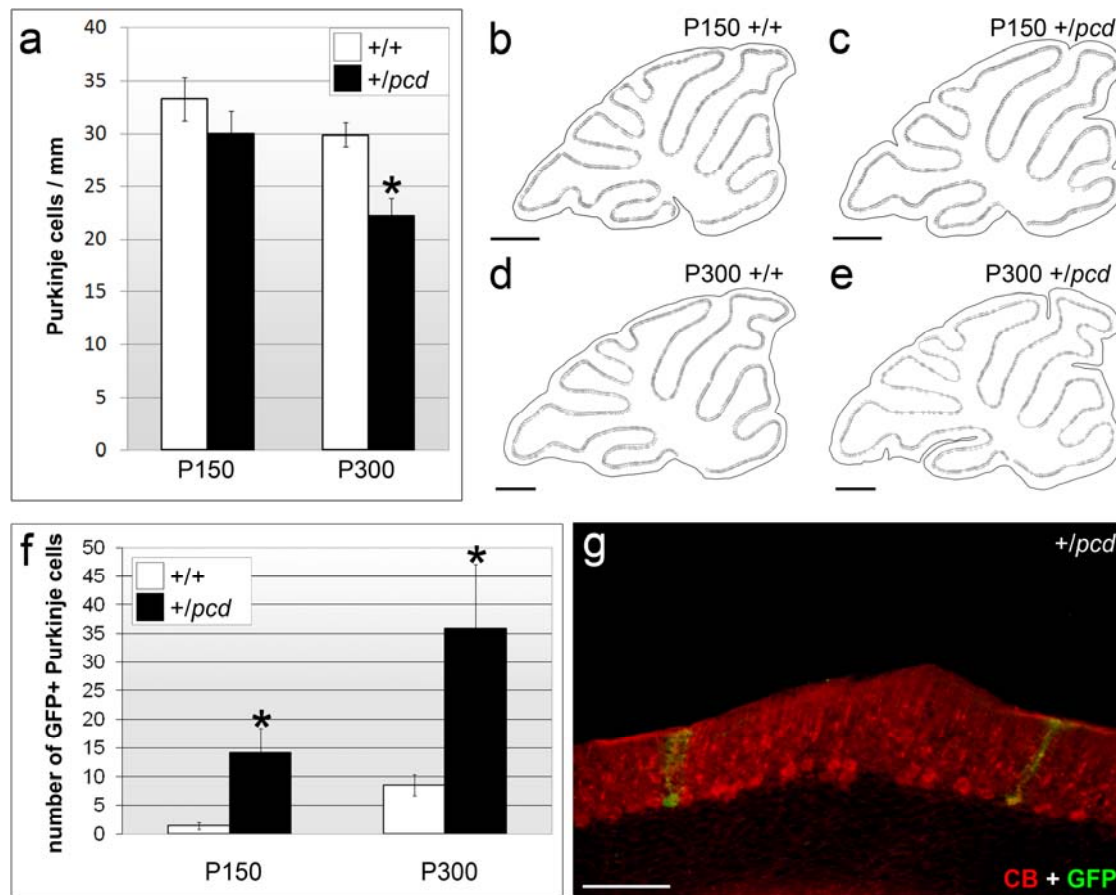


**Figure 11.** Bone marrow-derived Purkinje cells. **a**, panoramic view of a cerebellar folia; Purkinje cells are labeled with calbindin (CB, red), bone marrow-derived cells with GFP (green) and all the cell nuclei are counterstained with DAPI (blue). **b**, detail of a Purkinje cell derived from the transplanted bone marrow; note the axon (arrow) and the dendritic spines. **c-e**, GFP staining of bone marrow-derived Purkinje cell colocalize with CB staining of all Purkinje cells. **f**, bone marrow-derived Purkinje cells with two nuclei (arrowheads). **g**, **h**, histochemistry for X-gal reveals the cells that express  $\beta$ -galactosidase and were therefore produced by a fusion event; note in **g** the Purkinje cell layer (asterisks) and in **h** the two nuclei (arrowheads). Scale bars: **a** = 250  $\mu$ m; **b**, **c-e**, **f** = 50  $\mu$ m; **g** = 100  $\mu$ m; **h** = 20  $\mu$ m.

kinje cells (figure 11), with no preferential location throughout the cerebellum. They were only observed in animals sacrificed at P150 and at P300, with an increase in their numbers (figure 12 f). In all cases, there was no doubt that they were Purkinje cells, since they displayed their characteristic morphology and expressed calbindin (CB), a typical Purkinje cell marker (Celio, 1990; figure 11 a, c-e). In addition, we can affirm that the plasticity mechanism involved in their contribution to the cerebellum was cell fusion, since they displayed X-Gal staining and Purkinje cells expressing GFP were binucleated (figure 11 f-h). Surprisingly, in the wild-type animals transplanted with PCD bone marrow we detected Purkinje cells derived from this bone marrow also by fusion mechanisms. Their number was similar to that achieved by the wild-type transplanted with healthy bone marrow. To our knowledge, is the first time that the contribution of mutant BMDC to the cerebellum of a wild-type has been reported. Therefore, the *pcd* mutation does not interfere in the process of cell fusion, at least in BMDC.

In the case of the cerebellum of the PCD transplanted animals, no Purkinje cells derived from the bone marrow were found at any of the three different ages studied. This was surprising, taking into account the results obtained from the behavioural tests. Moreover, histological comparison of the cerebella from transplanted PCD and PCD mice without treatment did not show any differences. Probably, the neurodegeneration of the PCD mice was too fast to analyze the influence of the Purkinje cell loss in this mouse model in the process of cell fusion (see Discussion). Thus, to study this influence a milder neurodegenerative model was chosen. Based on previous findings (Doulazmi et al., 2002), the number of Purkinje cells of heterozygous mice for the *pcd* mutation was analyzed, observing a reduction in the number of these cells at least at P300 (figure 12). We also detected a higher number of fusion events at both ages, P150 and P300, in these heterozygous mice in comparison with the wild-type ones (figure 12). Therefore, the mild Purkinje cell loss seems to be related to an increase of cell fusion.

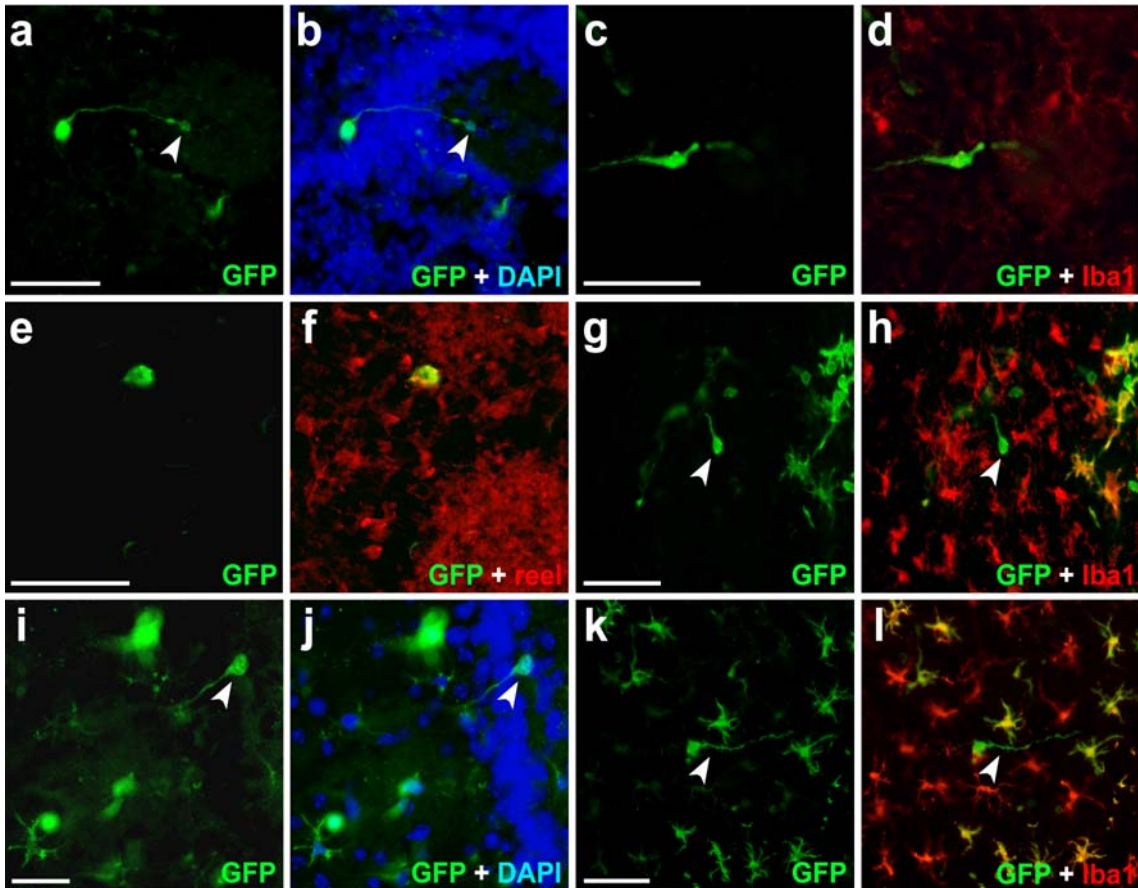
As previously mentioned, in the P0-grafted animals, no bone marrow-derived Purkinje cells were detected at either P20 or P30. As in the P20-grafted mice, no differences in the morphology of the cerebellum were detected between transplanted and non-transplanted PCD mice.



**Figure 12.** Comparison between control and *+/*pcd** mice. **a**, chart showing the density of Purkinje cells of both groups at P150 and at P300. **b-e**, Neurolucida drawings of the vermis of the experimental groups at P150 and at P300, each dot representing a Purkinje cell; there is a reduction in the density of these cells in *+/*pcd** mice at P300. **f**, chart showing the number of bone marrow-derived cells in control and *+/*pcd** mice. **g**, cerebellar cortex of a *+/*pcd** mouse; all Purkinje cells are labeled with calbindin (CB, red); bone marrow-derived cells are labeled with GFP (green). \*  $p < 0.05$ . Scale bars: b-e = 500  $\mu\text{m}$ ; g = 100  $\mu\text{m}$ .

Analysis of the OB revealed the presence of bone marrow-derived interneurons in both the wild-type and PCD mice in different layers of this structure (figure 13). In addition, the number of these cells, although low, increased over time, showing a progressive incorporation identical to the bone marrow-derived Purkinje cells. The mean ( $\pm$  SEM) of bone marrow-derived interneurons for each animal at the different survival times is given in table 1. No significant differences were detected between either group. None of the cells had two nuclei, and no X-Gal staining was detected on them. Accordingly, the plasticity mechanism of bone marrow-derived OB interneurons must have been trans-differentiation. As occurred in the cerebellum, no bone marrow-derived neurones were detected in P0-grafted animals.





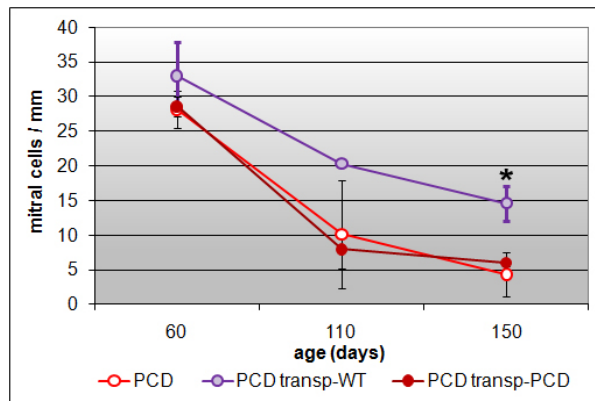
**Figure 13.** Examples of bone marrow-derived neurons (GFP, green) in the OB. Microphotographs of both wild-type and PCD mice. **a** and **b**, periglomerular cells whose somata are located inside a glomerulus (arrowhead); note its prolongation; all cell nuclei are labelled with DAPI (blue). **c** and **d**, juxtaglomerular cell at the edge of a glomerulus that does not colocalize with the microglial marker Iba1 (red). **e** and **f**, possible external tufted cells close to a glomerulus, positive for reelin (reel, red). **g** and **h**, an interneurons (arrowhead) in the external plexiform layer surrounded by microglia (Iba1, red); note their prolongation. **i** and **j**, interneurons in the internal plexiform or granule cell layer (arrowhead). Note their prolongation crossing the mitral cell layer, densely labelled with DAPI (blue). **k** and **l**, interneurons in the granule cell layer (arrowhead); as previously mentioned, they are also negative for the microglial marker Iba1 (red). Scale bars = 50  $\mu$ m.

**Table 1.** Mean number ( $\pm$  SEM) of bone marrow-derived OB interneurons for each animal at the different survival times.

	P60	P110	P150
Wild-type	0.25 $\pm$ 0.25	2.25 $\pm$ 0.63	4.25 $\pm$ 0.48
PCD	0.75 $\pm$ 0.25	1.25 $\pm$ 0.95	3.50 $\pm$ 0.87



The density of mitral cells in the PCD mice was also measured. Our results demonstrated slower mitral-cell degeneration in PCD animals grafted with

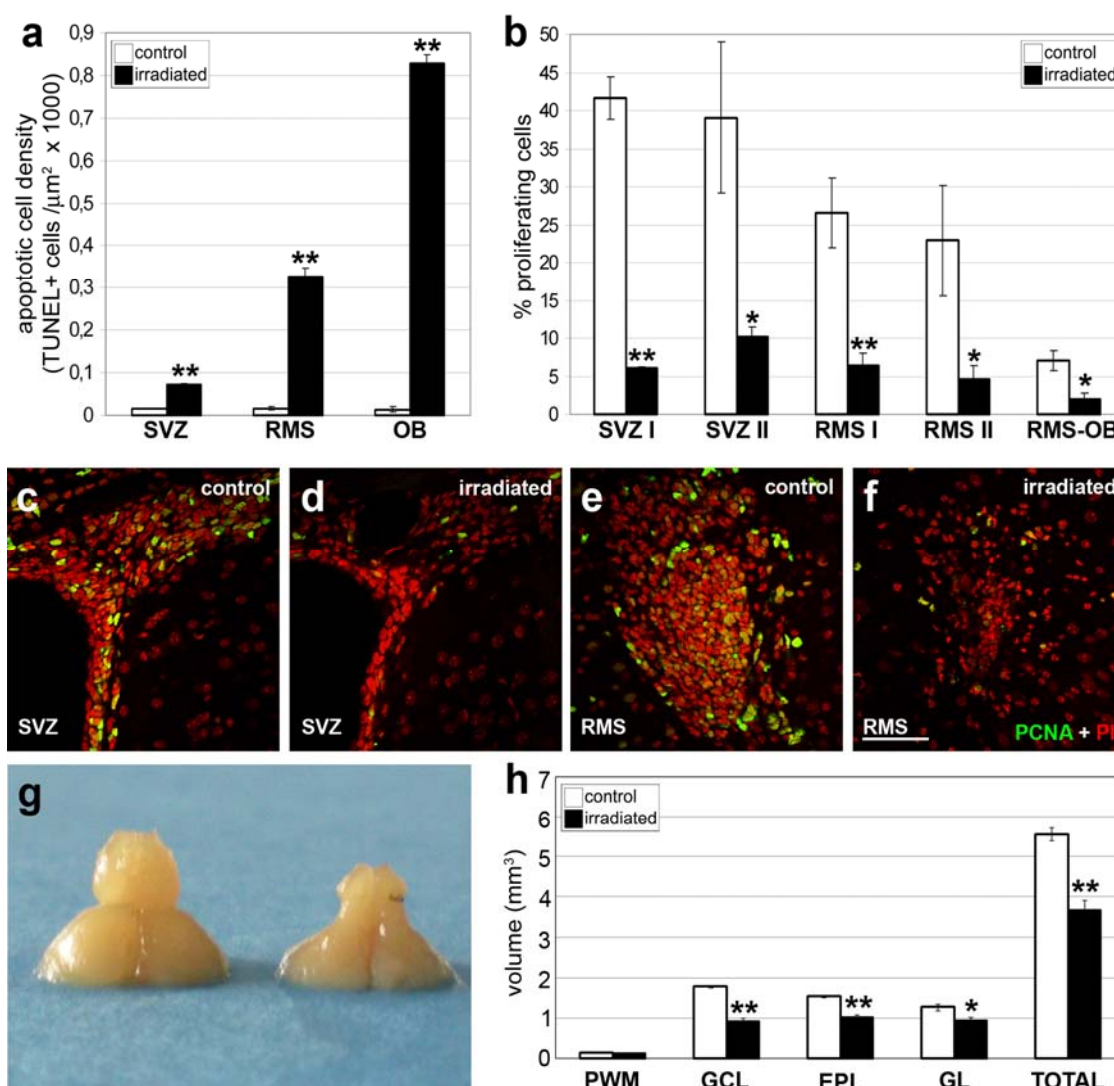


**Figure 14.** Mitral cell loss in PCD mice. Note the slowing down of the neurodegeneration in PCD animals transplanted with healthy, WT-derived bone marrow. \*  $p < 0.05$ .

healthy bone marrow in comparison with those not grafted or transplanted with PCD bone marrow. Significant differences were detected among these groups at P150 (figure 14). These results suggest a partial neuroprotection derived from the transplanted healthy bone marrow and are in agreement with the data derived from the olfactory tests.

## Cell proliferation in the SVZ and RMS

Study of the SVZ and the RMS revealed a higher density of apoptotic cells in the irradiated mice in comparison with the non-irradiated ones at P20 (24 hours after the irradiation). In addition, this density increased towards the rostralmost regions analyzed (figure 15 a), accompanied by a patent reactive gliosis. Moreover, the morphology and percentage of proliferating cells were also disturbed in the irradiated animals (figure 15 b-f). The animals did not recover their proliferation rates over time. Indeed, the percentage of cell proliferation in the irradiated animals at P60 and at P150 was similar to that at P20, and always lower than those observed in the non-irradiated animals. Supporting this issue, no bone marrow-derived cells were detected in the proliferating regions analyzed, except for microglia or some small cells with no neural features. Thus, bone marrow-derived cells were not related to the damage or the recovery of these zones. Finally, analysis of the experimental groups at P300 revealed a shrinkage of the OB volume (figure 15 g). This decrease mainly affected the glomerular layer (GL), the external plexiform layer (EPL), and the granule cell layer (GCL; figure 15 h).



**Figure 15.** Secondary effects of radiation in the rostral forebrain. **a**, density of apoptotic cells in the three study regions 24 h after irradiation. **b**, percentage of proliferating cells along five caudo-rostral levels 24 h after the radiation. **c-e**, morphology of the SVZ (**c**, **d**) and the RMS (**e-f**) of control and irradiated animals 24 h after the irradiation; proliferating cells are labeled with PCNA (green) and the cell nuclei are counterstained with propidium iodide (PI, red). **g**, macroscopic photograph of the forebrain of a control (left) and an irradiated (right) mouse of the same age; note the reduction of the OB in the latter. **h**, volume of the different layers of the OB; the total volume is also represented. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ . Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ . EPL, external plexiform layer; GCL, granule cell layer; GL, glomerular layer; PWM, periependymal white matter; RMS rostral migratory stream; RMS-OB, extension of the rostral migratory stream in the olfactory bulb; SVZ, subventricular zone.

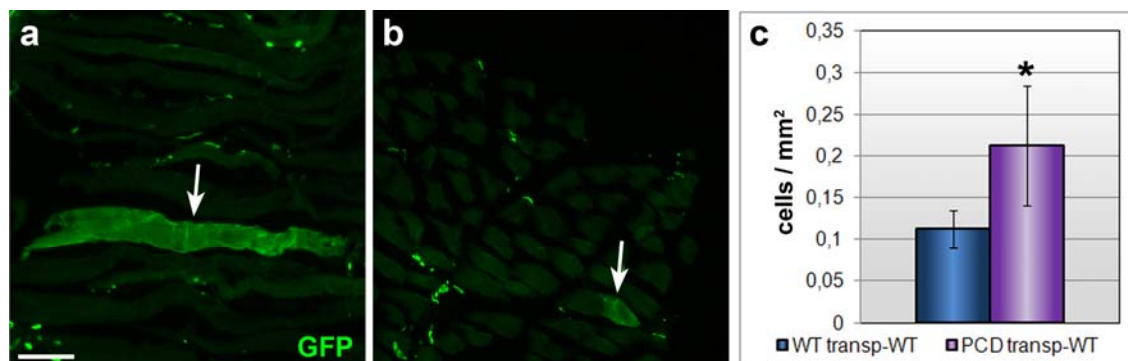
## Analysis outside the encephalon

The main aim of this Doctoral Thesis was to develop a cell therapy in PCD mice, placing special emphasis on the motor and olfactory behaviour. In addition, a histological analysis of the encephalon was performed to study the effects of BMDC in this structure. This analysis was focused on the principal

regions showing neurodegeneration of PCD mice: the cerebellum and the OB. However, we cannot exclude certain effects of such transplantation in other organs, especially since some behavioural improvements were not correlated with the results of the histological analysis: i.e. the Purkinje cell number in PCD transplanted mice. Accordingly, studies of the spinal cord, the skeletal muscle and the blood were performed to gain an approximation of the possible effects of the transplant outside the cerebellum.

For the study of the spinal cord, histological stainings –haematoxylin-eosin and Nissl- were performed to reveal its general morphology. In addition, an immunofluorescence assay was carried out to analyze the arrival of the BMDC at this structure. No differences were detected in the general morphology of the thoracic portion of the spinal cord among the experimental groups. The only bone marrow-derived cell type detected in this organ was microglia, with no noticeable difference between the experimental groups.

The analysis of the gastrocnemius muscle did not reveal any morphological difference among the animals, but did point to a higher density of bone marrow-derived muscular fibres in the PCD mice in comparison with the wild-type animals (figure 16).



**Figure 16.** Bone marrow-derived muscle fibres. **a**, muscle fibre in a longitudinal section (arrow) labelled with GFP (green). **b**, another fibre in transversal section (arrow). Scale bar = 100  $\mu$ m. **c**, density of GFP-positive cells. \*  $p < 0.05$ .

## Discussion

### ***Bone marrow transplantation is safe and effective***

As a consequence of the results obtained, the first idea to be discussed is the effectiveness of the transplantation. In the present work we employed two methods of ablation whose efficacy has been demonstrated previously: a radiation dose of 7.5 Gy (Recio, 2008; Díaz et al., 2011; Recio et al., 2011), and busulfan injected in a pregnant animal (Locatelli et al., 1994; Espejel et al., 2009). Almost all mice (with few exceptions) that underwent one of these methods of bone marrow ablation and that were subsequently transplanted with bone marrow stem cells, survived. In contrast, mice taken as ablation controls (i.e. mice that had been subjected to a similar ablation of their bone marrow but that had not received a transplant) died in a time-frame of 7-10 days. Moreover, the percentage of GFP-positive blood cells increased over time after both methodologies of ablation and transplantation, even reaching the level of the donors in the case of the P20-grafted animals. These findings reveal the progressive substitution of recipient blood cells by the new bone marrow-derived ones and hence the efficacy of the transplantation. Our results demonstrated a slower incorporation of the transplant in the P0-grafted mice since their percentages of GFP-positive blood cells were lower than those corresponding to the P20-grafted mice. Previous findings have shown that blood reconstitution with GFP-positive cells is higher in irradiated than in non-irradiated recipients (Nygren et al., 2008). We surmise that P0-grafted mice need more time to achieve a complete substitution of their blood cell population, owing to the different type of organ ablation (irradiation vs. busulfan treatment), or owing to the age at which transplantation is carried out (Recio, 2008).

### ***BMDC become integrated in the encephalon of recipients through different mechanisms***

Apart from the progressive incorporation of bone marrow-derived cells into the peripheral blood, our results also demonstrated a progressive integration in the encephalic regions analyzed. First, the most abundant bone marrow-derived cell type was the microglia. In fact, in the case of the P0-transplanted

mice, the microglia was the only cell type that we were able to detect (see below). In addition, this incorporation increased over time, supporting previous findings (Eglitis and Mezey, 1997; Hess et al., 2004; Massengale et al., 2005; Recio et al., 2011). Here we also observed that the neurodegenerative environment of PCD mice fosters this incorporation, in agreement with previous reports (Magrassi et al., 2007; Johansson et al., 2008; Nygren et al., 2008; Espejel et al., 2009). Our results point to a higher microglial cell density at the three survival ages (P60, P110 and P150), both in the cerebellum and in the OB of the PCD mice when compared to the wild-type animals. A volume reduction occurs in these structures in PCD mice due to their neurodegeneration (Mullen et al., 1976; Valero et al., 2007). Therefore, we also analyzed the total cell numbers in comparable, analogous sections. In this sense, our results failed to reveal significant differences between either group with the exception of the OB at P60. In fact, the volume of the OB of the PCD mice at this age shows no differences with the wild-type OB even though mitral cell loss has already started (Valero et al., 2007). At the other survival ages (P110 and P150) or in the case of the cerebellum, the neurodegeneration was already complete and it seems that a degenerative environment does not exist, at least to attract more BMDC. We also do not wish to discard other plasticity events, in which cell death and circuit reorganization might be involved, the homeostasis reached in the system affording similar values among the experimental groups.

No bone marrow-derived astrocytes were detected. Although there have been previous reports suggesting their presence (Eglitis and Mezey, 1997), our results are in close agreement with most previous studies, in which no astrocytes were observed (Brazelton et al., 2000; Nakano et al., 2001; Priller et al., 2001a; Wehner et al., 2003; Massengale et al., 2005; Recio et al., 2011).

Concerning the contribution of bone marrow to the neuronal elements in P20-transplanted mice, the most remarkable feature is that cells derived from the same transplanted bone marrow are converted into neurones by two different mechanisms of plasticity: cell fusion in the cerebellum and transdifferentiation in the OB (Recio et al., 2011), with no mixed results. In addition, this incorporation into the encephalon was also progressive.

In the case of Purkinje cells, although with certain discrepancies (Priller et al., 2001b), cell fusion is the most accepted mechanism of cell plasticity (Álvarez-Dolado et al., 2003; Weimann et al., 2003a, 2003b; Magrassi et al., 2007; Johansson et al., 2008; Recio et al., 2011). No bone marrow-derived Purkinje cells were identified at P60 and P110. However, at P150 and P300 an increasingly evident cell fusion process was detected in both the wild-type and heterozygous (*+/pcd*) mice, in accordance with previous findings (Weimann et al., 2003a, 2003b; Magrassi et al., 2007). Regarding the PCD animals, no bone marrow-derived Purkinje cells were detected and the cerebellar structure of transplanted PCD mice remained apparently unchanged. At the age of transplantation, P20, the neurodegenerative process in the cerebellum of PCD mice has already started (Mullen et al., 1976; Baltanás et al., 2010) and it is possible that BMDC might not be able to rescue Purkinje cells in this dramatic cell loss. In contrast, our results have shown that heterozygous mice undergo a mild Purkinje cell degeneration earlier than expected (Doulazmi et al., 2002). Therefore, this slow, retarded and long-lasting neurodegeneration increases the number of fusion events in heterozygous mice as compared to the wild-type animals.

Regarding the OB, our findings revealed the presence of bone marrow-derived interneurons in different layers of this structure. There are few studies addressing the arrival of bone marrow-derived cells in the OB (Brazelton et al., 2000; Priller et al., 2001b; Corti et al., 2002; Massengale et al., 2005), and their results are not conclusive. Our data show that this incorporation is progressive over time both in PCD and wild-type animals, similar to the cerebellum-related fusion process (Weimann et al., 2003a, 2003b; Magrassi et al., 2007).

Finally, concerning the P0-transplanted mice, the reason for performing transplants at this age was to do it as soon as possible. Taking into account the absence of bone marrow-derived Purkinje cells in the P20-grafted PCD mice, P0 animals were transplanted in an attempt to rescue such neurons by cell fusion before the start of neurodegeneration (see above). At P30, almost all Purkinje cells of the PCD mice had disappeared, excepting some of them in the lobule X (Landis and Mullen, 1978). Accordingly, P30 was chosen as the maximum survival age for P0-transplanted mice in order to analyze the possible rescue of Purkinje cells. GFP-positive microglia was the only bone marrow-derived



neural cell type detected in these mice, and it was scarce. This finding can be explained in terms of the short survival times, which would be insufficient to allow the detection of higher numbers of. In addition, these mice were not subjected to a radiation process that affects the blood-brain barrier, and hence perhaps the arrival of these cells would not be facilitated (Pachter et al., 2003; Yuan et al., 2006). Moreover, we have not identified bone marrow-derived neuronal elements in P0-transplanted mice. The shortest period in which bone marrow-derived neurones (i.e. Purkinje cells) appear in healthy irradiated and transplanted animals is two months after transplantation (Álvarez-Dolado et al., 2003). On the other hand, previous findings have demonstrated that a neurodegenerative environment can foster this phenomenon of cell plasticity (Magrassi et al., 2007; Johansson et al., 2008; Nygren et al., 2008; Espejel et al., 2009), and therefore we expected to detect events of cell fusion and rescue sooner (P20, P30). However, although our mutant mice underwent a process of cerebellar neurodegeneration prior to P30, it was too fast, and it did not seem to be sufficient to accelerate the arrival of bone marrow-derived cells to the encephalon. Moreover, the lack of radiation in these transplants can also account for the absence of bone marrow-derived neurones, since radiation can influence this process of integration (Nygren et al., 2008).

### ***Radiation induces changes in OB neurogenesis***

During the course of our experiments, we noted deleterious effects of the radiation employed in the OB and its related neurogenic regions. Taking into account the organization of the SVZ-RMS-OB axis, the highest mitotic activity should be located in the caudal-most part (Doetsch et al., 1997, 2002; García-Verdugo et al., 1998; Hellstrom et al., 2008), this region being the one most severely affected by the irradiation (Romanko et al., 2004a, 2004b; Hellstrom et al., 2008). However, our results point to a higher degree of apoptosis and gliosis in the rostral-most part of that axis. Differences in apoptosis between irradiated and non-irradiated animals can be detected 3 h after irradiation. These differences reach a maximum at 6 h after irradiation and then, at 24 h they decrease, although they are still detectable (Shinohara et al., 1997). In contrast, the reactive gliosis following neural injury is extremely fast (Garden and Moller, 2006;

Milligan and Watkins, 2009), indirectly revealing where neural cells have died recently. In agreement with this, a fraction of the apoptotic cells detected could correspond to cells that died not at the moment of the irradiation but later. Neuroblasts divide in their trajectory towards the OB throughout the RMS (Lois and Álvarez-Buylla, 1994; Lois et al., 1996; Doetsch et al., 1997, 2003; Peretto et al., 1999; Carleton et al., 2003), and they are affected by the radiation, although not as severely as the progenitors of the SVZ (Romanko et al., 2004a, 2004b; Hellstrom et al., 2008). Thus, at a subsequent stage when they cease dividing they could die because of the damage caused by radiation. Accordingly, radiation can induce not only acute but also delayed toxicity (Haydont et al., 2007). Neuroblasts could migrate towards the OB, being affected by the radiation, and die in a subsequent process of division.

Moreover, a reduction in cell proliferation in the irradiated mice was detected in comparison with the control group. This reduction was not recovered with time. Previous findings have demonstrated that such a recovery can exist (Hellstrom et al., 2008), and that radiation could even induce an increase in cell proliferation (Balentova et al., 2006, 2007). However, the radiation employed in these studies was lower than that administered in the present work (7.5 Gy). This minimal lethal dose was able to eliminate not only the bone marrow stem cells but also the “true” stem cells of the SVZ (Hellstrom et al., 2008; Díaz et al., 2011), thus preventing any recovery. In addition, BMDC from the transplant did not influence the SVZ-RMS-OB axis since no recovery was detected. In addition, only bone marrow microglia and hematopoietic-like cells (Massengale et al., 2005; Moore et al., 2005) were detected in these neurogenic zones, with no a special distribution. Finally, at P300, a dramatic reduction in the OB volume was detected, probably due to the lack of cell turnover after the damage to the proliferating regions. The most affected layers of the OB were the GL, EPL and the GCL, since these are the main destinations of the RMS-migrating neuroblasts (Lois and Álvarez-Buylla, 1994; Petreanu and Álvarez-Buylla, 2002; Carleton et al., 2003).



## ***The transplant of a healthy bone marrow improves motor behaviour in PCD mice***

Regarding the motor tests, our findings show that PCD mice transplanted with wild-type bone marrow (heterotransplanted) achieved intermediate improved scores between wild-type animals and the other PCD groups. No differences were detected between either wild-type group or between the PCD mice without transplants and the PCD mice transplanted with PCD-derived bone marrow (homotransplanted). These data suggest the absence of secondary deleterious effects of the ablation-engraftment process and the benefits of the “healthy” bone marrow transplantation to the detriment of the mutant one. In addition, no differences were detected in the number of defecations, suggesting a similar level of stress among the experimental groups.

Despite of these behavioural improvements, no rescue of Purkinje cells was detected in the heterotransplanted PCD mice. However, previous reports have speculated about the benefits of healthy mesenchymal cell transplantation in a model of cerebellar degeneration without the necessity of cell fusion (Jones et al., 2010). In addition, the bone marrow-derived cells that reach the encephalon can secrete different chemokines and cytokines, with diverse effects (Chen et al., 2003; Li et al., 2006; Spees et al., 2006; Prockop and Olson, 2007; Chopp et al., 2008; Jones et al., 2010). Accordingly, it is not possible to exclude other changes mediated by the transplantation, such as a reduction in other secondary cell loss, subsequent to the Purkinje cell degeneration, such as the granule cells of the cerebellum, oligodendrocytes or the deep cerebellar nuclei (Mullen et al., 1976; Triarhou et al., 1987; Fernández-González et al., 2002; Baltanás et al., submitted). In addition, there could also be some benefits in other encephalic motor regions, leading to an improvement in the capacity of movement of PCD grafted with healthy bone marrow.

Moreover, the motor improvement seen in these mice may also be related to effects of the transplant out of the encephalon, as suggested by analyses. In fact, those heterotransplanted PCD mice showed a higher density of bone marrow-derived muscle fibres than the wild-type animals. Previous findings have demonstrated that bone marrow derived cells can become muscle

fibres, even with therapeutic aims (Ferrari et al., 1998; Gussoni et al., 1999; LaBarge and Blau, 2002). In light of this, the integration of healthy BMDC into the muscle of PCD mice could also explain their ameliorated gait.

Finally, the improvements in the motor behaviour of the heterotransplanted PCD mice may also be influenced by their enhanced olfaction in comparison with the non-grafted mutants (see below). The olfactory capacity of heterotransplanted PCD mice could allow them to perform a better exploration of their surroundings than the non-grafted PCD animals and thus a better motor capacity. In addition, open-field tests are also related to the emotional reactivity of mice. Thus, the improved olfaction of the transplanted PCD mice leads to a lower level of depression than the other mutants and hence to improved mobility and exploration.

In the case of P0-grafted mice, there were no differences between the non-transplanted and the transplanted PCD animals and they also displayed a poorer performance than the wild-type groups in the rota-rod test. Both PCD groups also had no differences regarding the cerebellar morphology. Above, we mentioned that the survival of these mice was not sufficient to allow a significant number of GFP-positive blood cells or a noteworthy arrival of bone marrow-derived cells into the encephalon. Therefore it is not surprising that the mutant mice transplanted at P0 showed no changes in their behaviour.

### ***Bone marrow transplantation protects the mitral cells of PCD mice and improves their olfactory capacity***

The experiments performed demonstrated an improvement in both the odour detection and discrimination of the PCD mice transplanted with healthy bone marrow, at least for (+)-carvone and the (-)-carvone. Odour tests are complex and we cannot discard the exhibition of different types of behaviour with different odorants. Therefore, it would be necessary to analyze the olfactory capacity of PCD mice for a wide set of odorants, although this is out of the scope of the present work.

Our findings demonstrate that heterotransplanted PCD mice had a slower degeneration of mitral cells in comparison with the homotransplanted

and non-transplanted PCD mice. Therefore, it seems that the transplantation of healthy bone marrow exerts a neuroprotective effect, as suggested by several studies (Chen et al., 2003; Li et al., 2006; Spees et al., 2006; Prockop and Olson, 2007; Chopp et al., 2008; Jones et al., 2010). This higher mitral cell density of the heterotransplanted PCD mice could explain their improved olfactory capacity. However, the electrophysiological analysis revealed a lack of differences between the PCD groups, regarding the  $\gamma$  waves, which are typical of the synchronic firing of mitral cells (Laurent et al., 2001; Egger and Urban, 2006; Lagier et al., 2007). It is possible that the number of surviving mitral cells in the grafted PCD mice may have been too low to exert a response different to the non-grafted PCD animals. Moreover, since the OB of PCD mice changes its connections and synaptology (Greer and Halász, 1987; Recio et al., 2007), variations in the firing parameters of these cells could arise, being undetectable with the recording methodology employed. A deeper analysis showed certain deleterious effects in the  $\theta$  and  $\beta$  waves in all the transplanted animals. These oscillations are related to the inputs of the OB, either by sniffing or by information from higher olfactory areas. The radiation damage in the cell turnover that leads to a reduction of the OB of these animals modifies the fine tuning of olfactory processing, which may reflect the switch in such oscillation patterns. This process of neural plasticity probably occurs previously to the OB volume decrease, as previously described (Lazarini et al., 2009).

## Conclusions

In accordance with the objectives proposed in this Doctoral Thesis and as a consequence of the results achieved and the discussion developed, we have reached to the following conclusions:

- I. Bone marrow transplantation is safe and effective, and promotes the survival of the recipients after both physical and chemical bone marrow ablation.
- II. Bone marrow-derived cells reach and become integrated into the encephalon of the recipients, forming both glial and neuronal elements with a long enough survival time. This arrival was remarkably higher in the ir-

radiated animals in comparison with those that underwent chemical ablation.

- III. There are two possible mechanisms of cell plasticity involved in the integration of bone marrow-derived cells in the encephalon: fusion and transdifferentiation, both occurring simultaneously in the same animal, depending on the cell type and the region.
- IV. The neurodegenerative micro-environment due to the *pcd* mutation, both in homozygosis and in heterozygosis, increases the attraction and integration of bone marrow-derived cells into the encephalon of the recipient mice.
- V. The wild-type bone marrow transplantation increases the capacity of PCD mutant mice to move. However, such transplantation does not rescue the Purkinje cells of these animals. Thus, this improvement in behaviour is not directly related to Purkinje cell numbers. Such an amelioration may be due to other mechanisms of cell plasticity or survival in different encephalic or extra-encephalic areas, as well as to the improvements in their olfactory capacity.
- VI. The wild-type bone marrow transplantation at P20 affords a long-lasting neuroprotective effect in the mitral cells of the PCD mice, at least slowing down their loss and affording a higher olfactory capacity in comparison with the non-grafted mutants, at least for the odorants (+)-carvone and (-)-carvone. Nevertheless, the modification of the  $\gamma$  waves of the OB due to the *pcd* mutation is not affected by transplantation with wild-type bone marrow.
- VII. The dose of radiation employed to ablate the bone marrow of the recipients induces alterations in OB neurogenesis that finally lead to a dramatic reduction in the OB volume. However, the radiation and its subsequent effect do not affect either the olfactory capacity or the movement of the recipients.
- VIII. The bone marrow transplantation performed at P0 after chemical ablation is not fast enough to rescue the Purkinje cells of PCD mice before their

degeneration. Consequently, such transplantation has no effects on the capacity of the mutant mice to move around.

In sum, we can conclude that healthy bone marrow transplantation, despite having certain secondary effects, is an efficient tool for the palliative treatment of a specific neurodegenerative disease. This cell-based therapy requires more in-depth research if it is to be improved, especially in the sense of accelerating and optimizing the integration of the bone marrow-derived cells into the regions affected by the neurodegeneration.

## Acknowledgements

The author wishes to express his gratitude to Daniela Vogt-Weisenhorn and the members of the Institute of Developmental Genetics (Neuroanatomy Unit) of the Helmholtz Zentrum in Munich; to Pierre Marie Lledo and the members of the Unité de Perception et Mémoire of the Institut Pasteur in Paris, to the staff of the animal facilities and the irradiation service of the Universidad de Salamanca, and especially to his own lab colleagues and supervisors.

This work was supported by the Ministerio de Educación (AP2007-00269), Ministerio de Investigación y Ciencia (BFU2010-18284), the Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad (Plan Nacional Sobre Drogas), the Junta de Castilla y León, the Centre for Regenerative Medicine and Cell Therapy of Castilla y León, the Fundación Samuel Solórzano and the University of Salamanca. The author also expresses his gratitude to N. Skinner for revising the English version of the manuscript in the short time allotted him.

## Abbreviations

<b>BMDC</b>	bone marrow-derived cells
<b>GFAP</b>	glial fibrillary acidic protein
<b>GFP</b>	green fluorescent protein
<b>OB</b>	olfactory bulb
<b>PBS</b>	phosphate-buffered saline

<b>PCD</b>	Purkinje cell degeneration
<b>PCNA</b>	proliferating cell nuclear antigen
<b>PTX</b>	picrotoxin





# Apéndice I

**ABREVIATURAS, PRODUCTOS QUÍMICOS GENERALES, SUEROS INMUNOLÓGICOS, INSTRUMENTOS Y MATERIAL INFORMÁTICO.**



## Abreviaturas

**ABC:** complejo avidina-biotina-peroxidasa (del inglés *Avidin-Biotin-Complex*)

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**ARN:** ácido ribonucleico

**ARNm:** ácido ribonucleico mensajero

**BO:** bulbo olfativo

**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

**CM:** capa molecular

**CMA:** células madre adultas

**CME:** células madre embrionarias

**CMH:** células madre hematopoyéticas

**CMM:** células madre mesenquimales

**CDMO:** células derivadas de la médula ósea

**CMR:** corriente migratoria rostral

**CMR-BO:** extensión de la corriente migratoria rostral en el bulbo olfativo

**CNO:** capa del nervio olfativo

**CPE:** capa plexiforme externa

**CPI:** capa plexiforme interna

**DAB:** 3,3'-diaminobencidina

**DAPI:** 4', 6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato

**DMSO:** dimetilsulfóxido

**DNTB:** 5-5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico)

**ELISA:** ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)

**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético (del inglés *Ethylene Diamine Tetracetic Acid*)

**ESM:** error estándar de la media

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

**GFAP:** proteína ácida fibrilar glial (del inglés *Glial Fibrillary Acidic Protein*)

**g p.a.:** gramos por peso del animal

**GSH:** glutatión reducido

**GSSG:** glutatión oxidado

**GSx:** glutatión total

**Gy:** Gray (unidad de radiación)

**IGF-I:** factor de crecimiento insulínico de tipo 1 (del inglés *Insulin-like Growth Factor-1*)

**IP:** yoduro de propidio

**IPS:** células madre pluripotentes inducidas (del inglés *Induced Pluripotent Stem cells*)

**lacZ:** gen reportero que codifica la enzima  $\beta$ -galactosidasa

**NADP(H):** nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

**Nna1:** proteína 1 nuclear del sistema nervioso inducida por axotomía (del inglés *Nervous system Nuclear protein induced by Axotomy*)

**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

**PTX:** picrotoxina

**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*)

**TBE:** tampón Tris-Borato-EDTA

**TUNEL:** marcaje de roturas de ADN con dUTP biotinilado mediado por la desoxinucleotidil-transferasa terminal (del inglés *Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin Nick End-Labeling*)

**WT:** tipo silvestre (del inglés *Wild-Type*)

**ZSV:** zona subventricular

## Productos químicos generales

Se utilizaron los compuestos químicos que se detallan a continuación:

**Ácido acético.**  $\text{CH}_3\text{COOH}$  #58 Merck, Darmstadt, Alemania.

**5-5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico).**  $[\text{SC}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)\text{CO}_2\text{H}]_2$  #D8130 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU.

**Ácido pícrico.**  $(\text{NO}_2)_3\text{-C}_6\text{H}_2\text{-OH}$  #014220 Probus S.A., Badalona (Barcelona).

**Ácido sulfosalicílico**  $\text{HO}_3\text{SC}_6\text{H}_3\text{-2-(OH)CO}_2\text{H}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  #247006 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU.

**Aluminio potasio sulfato.**  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$  #211087 Panreac, Montplet & Esteban S.A., Barcelona.

- Azul Tripán**,  $C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$  #T8154 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU.
- Borohidruro sódico**.  $NaBH_4$ . Pureza aproximada del 98%. #S-9125. Sigma Chemical Co., St Luis, EEUU.
- Busulfán**.  $C_6H_{14}O_6S_7$  #B2635 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU.
- (+)-carvona**.  $C_{10}H_{14}O$  #22070 98,5%; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU.
- (-)-carvona**.  $C_{10}H_{14}O$  #22060 98%; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU.
- Citrato trisódico dihidrato**.  $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$  #1.06448 Merck, Darmstadt, Alemania.
- Cloroformo**.  $CHCl_3$  #046510 Probus S.A., Badalona (Barcelona).
- Cloruro de amonio**.  $NH_4Cl$  #A9434 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU.
- Cloruro de magnesio**.  $MgCl_2$  #449172 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU.
- Cloruro potásico**.  $KCl$  #141494 Panreac, Montplet & Esteban S.A., Barcelona.
- Cloruro sódico**.  $NaCl$  #27.800.291 Prolabo, Fontenay-St.-Bois, Francia.
- DAPI**.  $C_{16}H_{15}N_5$  # 32670 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU.
- Desoxiuridina-5'-trisfosfato-2'-16-biotinilada**.  $C_{32}H_{48}N_7O_{18}P_3SLi_4$  #11.093.070.910 Roche Applied Science Mannheim, Alemania.
- Eosina**. 251301.1611 Panreac Química S.A.U. Castellar del Vallès, Barcelona.
- Etanol absoluto**.  $CH_3CH_2OH$  #141086.1214 Panreac Química S.A.U. Castellar del Vallès, Barcelona.
- Etanol 96% v/v**.  $CH_3CH_2OH$  #141085.1214 Panreac Química S.A.U. Castellar del Vallès, Barcelona.
- Ferricianuro potásico**.  $K_3[Fe(CN)_6]$  #702587 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU.
- Ferrocianuro potásico**.  $K_4[Fe(CN)_6]$  #455989 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU.
- Formaldehído 35-40%**.  $HCHO$  #141328 Panreac, Montplet & Esteban S.A., Barcelona.
- Gelatina en polvo**. #24.350.262 Prolabo, Fontenay-St.-Bois, Francia.

- Glicerol 98%.**  $C_3H_8O_3$  #211339 Panreac Química S.A., Barcelona.
- Glutation reductasa.** #G3664 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU.
- H<sub>2</sub>O ELIX.** Obtenida de un purificador Integral 3, Millipore, Billerica, MA, EEUU.
- Hematoxilina.** 121344.1606 Panreac Química S.A.U. Castellar del Vallès, Barcelona.
- Heparina sódica.** #H-9399 Sigma Chemical, St. Louis, MO EEUU.
- Hidrato de cloral.**  $C_2HCl_3O \cdot H_2O$  #22.682.265 Prolabo, Fontenay-St.-Bois, Francia.
- Hidróxido sódico.** NaOH #28.245.298 Prolabo, Fontenay-St.-Bois, Francia.
- Ioduro de propidio.** 3,8-diamino-5-(3-dietilaminopropil)-6-fenilfenatridinio  $C_{27}H_{34}I_2N_4$  Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU.
- Ketamina.** Ketalar; Pfizer, Nueva York, NY, EEUU.
- Kit para la determinación de IGF-I.** Quantikine Mouse/Rat IGF-I MG100 R&D Systems Europe, Abingdon, RU
- Medio de cultivo IMDM,** Iscove's Modified Dulbecco's Medium; Invitrogen; Carlsbad, CA, EEUU.
- NADPH.**  $C_{21}H_{26}N_7Na_4O_{17}P_3$  #N0411 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU.
- Nitrógeno líquido.** N<sub>2</sub>. Sociedad Española de Carburos Metálicos S.A., Laguna de Duero, Valladolid.
- N-Propil galato.**  $C_{10}H_{12}O_5$  #P-3130 Sigma Chemical Co., St Louis, EEUU.
- Óxido de mercurio (II).** HgO #1.04465.0100 Merck, Darmstadt, Alemania
- Paraformaldehído.**  $(CH_2O)_n$  #28.794.295 Prolabo, Fontenay-St.-Bois, Francia.
- Paraplast.** #19216 Oxford, Labware, Division of Sherwood Medical, St Louis, EEUU.
- Polietilenglicol 400**  $HO(C_2H_4O)_n$  #162436.1611 Panreac, Montplet & Esteban S.A., Barcelona.
- Potasio dihidrógenofosfato.**  $KH_2PO_4$  #141513 Panreac Química S.A., Barcelona.

**D-(+)-Sacarosa.**  $C_{12}H_{22}O_{11}$  #27.478.365 Prolabo, Merck Eurolab, Braire-Le-Canal, Francia.

**Sodio dihidrógenofosfato, 2-hidrato.**  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$  #28.011.291 Prolabo, Fontenay-St-Bois, Francia.

**di-Sodio hidrógenofosfato.**  $Na_2HPO_4$  #1.06586.5000 Merk, Darmstadt. Alemania.

**Solución tampón pH 4.00** (Potasio di-hidrógenofosfato, di-sodio hidrógenofosfato) #23-111-01 Crison Instruments S.A., Alella, Barcelona.

**Solución tampón pH 7.00** (Potasio di-hidrógenofosfato, di-sodio hidrógenofosfato). #23-111-02 Crison Instruments S.A., Alella, Barcelona.

**Suero fetal bovino** #10106-151, Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU.

**Sulfato de cromo III y potasio, 12-hidrato.**  $CrK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$  #141284. Panreac, Montplet & Esteban S.A., Barcelona.

**Thimerosal** o sodio etilmercuriotiosalicilato.  $C_9H_9HgNaO_2S$  #T-8784, Sigma Chemical Co., St. Louis, EEUU.

**Tionina.** 3,7-Diamino-5-fenotiacinio acetato.  $C_{14}H_{13}N_3O_2S$  #227680 Probus, S.A., Badalona (Barcelona).

**Transferasa terminal.** #03.333.574.001 Roche Applied Science Mannheim, Alemania.

**Triton X-100.** #22.7810 Probus S.A., Badalona (Barcelona).

**Trizma base.** Tris-(hidroximetil) aminometano hidrocloreuro.  $C_4H_{11}NO_3$  #T6791, Sigma Chemical Co., St. Louis, EEUU.

**Trizma HCl.** Tris-(hidroximetil) aminometano hidrocloreuro.  $C_4H_{11}NO_3 \cdot HCl$  #T6666, Sigma Chemical Co., St. Louis, EEUU.

**Vinilpiridina.**  $C_7H_7N$  #132292 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU.

**X-Gal.**  $C_{14}H_{15}BrClNO_6$  #15520-018 Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU.

**Xilacina.** Rompun; Bayer, Lerverkusen, Alemania.

**Xileno** (mezcla de isómeros).  $C_6H_4-(CH_3)_2$  #28.973.363 Prolabo, Fontenay-St-Bois, Francia.



## ***Soluciones generales de uso común***

**Eosina.** Se prepara a partir de una solución madre comercial de eosina amarillenta al 1% en etanol al 80% (v/v). La solución de uso se compone 25% (v/v) de solución madre de eosina, 14,5% (v/v) de H<sub>2</sub>O, 0,5% (v/v) de ácido acético y 60% (v/v) de etanol absoluto.

**Fijador para perfusión Bouin 4%.** Está compuesto por 4% (p/v) de paraformaldehído despolimerizado, 75% (p/v) de ácido pícrico y 5% de ácido acético. Para obtener 1 litro de solución se mezclan 40 g de paraformaldehído con 150 ml de H<sub>2</sub>O destilada a 60°C añadiendo 1 ml de NaOH 1 M para favorecer la despolimerización. Cuando la mezcla se vuelve transparente (indicando que el paraformaldehído se ha despolimerizado) se enfría rápidamente y se filtra. Una vez filtrado, se le añaden 750 ml de una solución saturada a 20°C de ácido pícrico, previamente filtrada y 50 ml de ácido acético. Por último, se ajusta el volumen hasta 1 l.

**Fijador para perfusión de Zamboni.** Está compuesto por 4% (p/v) de paraformaldehído despolimerizado, y 15% (p/v) de ácido pícrico. Para obtener 1 litro de solución se mezclan 40 g de paraformaldehído con 300 ml de H<sub>2</sub>O destilada a 90°C añadiendo 1 ml de NaOH 1 M para favorecer la despolimerización. Cuando la mezcla se vuelve transparente (indicando que el paraformaldehído se ha despolimerizado) se enfría rápidamente y se filtra. Una vez filtrado, se le añaden 150 ml de una solución saturada a 20°C de ácido pícrico, previamente filtrada y 500 ml de tampón fosfato 0,2 M. Por último, se ajusta el volumen hasta 1 l.

**Formalina tamponada.** Compuesta por PB 0,1 M y formaldehído al 3,5-4% (v/v). Para preparar 1 l se mezclan 500 ml de PB 0,2 M pH 7,4 con 400 ml de H<sub>2</sub>O y 100 ml de formaldehído comercial (mezcla de formaldehídos al 35-40% estabilizados con metanol).

**Hematoxilina.** La solución madre se obtiene calentando ligeramente en el siguiente orden: cristales de hematoxilina 0,5% (p/v), etanol absoluto 5% (v/v), aluminio potasio sulfato 10% (p/v) y óxido de mercurio II 0,25% (p/v) en H<sub>2</sub>O destilada. La mezcla se deja madurar al menos 15 días, dando mejores resultados con el paso de los años. Para preparar la so-

lución de uso, se añaden 3 ml de ácido acético glacial por cada 100 ml de solución madre previamente filtrada.

**Medio de montaje para fluorescencia “antidesvanecimiento”:** Está formado por glicina 0,42% (p/v), NaOH 0,021% (p/v), NaCl 0,51% (p/v), N-propilgalato 5% (p/v), glicerol 70% (v/v) y Thimerosal 0,002% (p/v). Se obtiene disolviendo 0,42 g de glicina, 0,021 g de hidróxido sódico, 0,51 g de cloruro sódico y 5 g de N-propilgalato en 100 ml de glicerol al 70%. Por último se añade 1 ml de una predilución de Thimerosal al 2%. Ha de guardarse protegido de la luz y a 4 °C.

**Mezcla congeladora para secciones.** Está constituida por un 30% (v/v) de glicerol y un 30% (v/v) de polietilenglicol tamponados con tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4. Para preparar 1 litro se mezclan los siguientes componentes: 200 ml de tampón fosfato 0,5 M pH 7,4, 300 ml de glicerol al 99% y 300 ml de polietilenglicol. Se ajusta el volumen hasta 1 litro con H<sub>2</sub>O. Ha de guardarse a 4°C.

**Solución de borohidruro sódico 0,13 M.** Se disuelven 5 mg de borohidruro sódico por ml de tampón fosfato inmediatamente antes del uso. La solución produce liberación inmediata de H<sub>2</sub>, por lo que ha de prepararse bajo campana y usarse rápidamente.

**Solución para gelatinizar portaobjetos.** Mezclamos 4,5 g de gelatina en polvo con 900 ml de H<sub>2</sub>O y se disuelve calentando hasta 80°C. Se le añade 0,44 g de sulfato de cromo III y potasio. Los portaobjetos se introducen en la solución filtrada a 70°C durante 5 min y se dejan secar en una estufa toda la noche. Los portaobjetos se gelatinizan dos veces.

**Solución salina isotónica.** 0,9% (p/v) de NaCl disuelto en H<sub>2</sub>O destilada.

**Solución salina tamponada con fosfato (PBS, del inglés: *Phosphate Buffer Saline*).** Para obtener 1 l de PBS a pH 7.4 (25 °C): 8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 0,21 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Para preparar 1 l de PBS pH 7,4 (37° C): 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,8 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 0,1 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Se conserva a 4°C.

**Tampón fosfato 0.5 M, pH 7.4 (25 °C).** Se obtiene mezclando soluciones 0,5 M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Se disuelven 7,8 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> en 100 ml

de H<sub>2</sub>O y 14,2 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en 200 ml de H<sub>2</sub>O. Se vierte la segunda solución sobre la primera hasta alcanzar el pH deseado. Se conserva a temperatura ambiente y no a 4 °C porque cristaliza.

**Tampón fosfato 0,2 M, pH 7,4 (25 °C).** Se obtiene mezclando soluciones 0,2 M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> hasta alcanzar el pH deseado. Para conseguir aproximadamente 2 litros se disuelven 42,6 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> en 1,5 litros de H<sub>2</sub>O destilada y 15,6 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en 0,5 litros de H<sub>2</sub>O destilada. Se vierte la segunda solución sobre la primera hasta alcanzar el pH deseado. La solución puede conservarse a 4 °C.

**Tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4 (25 °C).** Se prepara diluyendo 1:1 la solución anterior en H<sub>2</sub>O 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<sub>2</sub>O destilada.

**Tampón TUNEL.** Formado por Tris-HCl 30 mM, cacodilato sódico 140 mM, cloruro de cobalto 1 mM y Triton X-100 al 0,3% (v/v). Para obtener 100 ml se mezclan 15 ml de una solución de Tris-HCl 0,2 M, 2,997 g de cacodilato de Na, 23,793 mg de cloruro de cobalto y 1.5 ml de triton X-100 al 20%. Por último se ajusta el volumen hasta 100 ml con H<sub>2</sub>O destilada.

**Tampón SSC (del inglés: *Saline Sodium Citrate*) pH 7,0 (20 x).** Contiene NaCl 3 M y citrato de sodio 0,3 M. Para preparar 50 ml se mezclan 8,77 g de NaCl con 4,41 g de citrato de sodio en 30 ml de H<sub>2</sub>O. Se ajusta el pH hasta 7,0 y se ajusta el volumen con más H<sub>2</sub>O hasta 50 ml.

**Tampón X-Gal.** Compuesto por 100 µl de una solución de MgCl<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 1 M se prepara disolviendo 0,9521 g de MgCl<sub>2</sub> en 10 ml de H<sub>2</sub>O 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 temperatura ambiente y en oscuridad. La solución de X-Gal (40 mg/ml) se

prepara disolviendo 40 mg de X-Gal en 1 ml de dimetilformamida, y se guarda en oscuridad a -20 °C.

**Solución de lisis de eritrocitos para médula ósea.** Compuesta por 140 mM de cloruro de amonio en Tris-base 17 mM. 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 NH<sub>4</sub>Cl, 1 g de KHCO<sub>3</sub> 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 H<sub>2</sub>O, 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.

**Solución de tionina (0,25%).** Para obtener 0,5 l se mezclan 18 ml de NaOH 1M, 100 ml de ácido acético 1 M y 382 ml de H<sub>2</sub>O. La mezcla se calienta hasta la ebullición y se le añaden 2,5 g de Tionina. Se deja enfriar y de nuevo se calienta sin llegar a la ebullición durante 45 min. Finalmente se filtra a una botella oscura.

## ***Sueros inmunológicos***

**Suero normal de burro.** #D9663, Sigma, MO, EEUU.

**Suero normal de cabra.** #S-1000, Vector, Burlingame, CA, EEUU.

**Suero normal de conejo.** #R9133, Sigma, MO, EEUU.

## ***Anticuerpos primarios***

**Anti calbindina.** IgG<sub>1</sub> policlonal anti-calbindina de conejo #(CB-38) Swant, Bellinzona (Suiza). El anticuerpo presenta un 10% de reacción cruzada con la calretinina.

**Anti calbindina D-28k.** IgG<sub>1</sub> monoclonal anti-calbindina de ratón #(CB-28k) Bellinzona (Suiza).

**Anti-proteína ácida fibrilar glial (Anti-GFAP).** IgG<sub>1</sub> policlonal anti-GFAP de conejo #G 3893 Sigma, MO, EEUU. El anticuerpo presenta reacción cruzada con la GFAP de humano, conejo y rata.

**Anti-proteína ácida fibrilar glial (Anti-GFAP).** IgG<sub>1</sub> monoclonal anti-GFAP de ratón #C 9205 Sigma, MO, EEUU. El anticuerpo presenta reacción cruzada con la GFAP de humano, cerdo y rata.

**Anti-proteína fluorescente verde (Anti-GFP).** IgG<sub>1</sub> policlonal anti-GFP de cabra #ab5450 Abcam, Cambridge, RU.

**Anti-proteína fluorescente verde (Anti-GFP).** IgG<sub>1</sub> policlonal anti-GFP de conejo #ab290 Abcam, Cambridge, RU.

**Anti Iba1.** IgG<sub>1</sub> policlonal anti-GFP de cabra #EB07174 Everest Biotech, Oxfordshire, RU. El anticuerpo presenta reacción cruzada con la GFAP de humano, ratón, rata y perro.

**Anti Iba1.** IgG<sub>1</sub> policlonal anti-GFP de conejo #019-19741 Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japón.

**Anti-antígeno nuclear de células proliferativas (Anti-PCNA).** IgG<sub>2α</sub> monoclonal de ratón anti-PCNA, #(PC10)sc-56, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EEUU. Presenta reacción cruzada con la proteína PCNA p36 expresada en ratones, ratas, humanos, insectos y levaduras.

**Anti-reelina.** IgG monoclonal de ratón anti-reelina (clon G10) #MAB5364 Millipore, Temecula, CA, EEUU.

### ***Anticuerpos secundarios***

**Cy2 anti-conejo de burro:** #711-225-152, Laboratorios Jackson, West Grove, PA, EEUU.

**Cy2 anti-ratón de burro:** # 715-225-020, Laboratorios Jackson, West Grove, PA, EEUU.

**Cy2 anti-ratón de cabra:** #115-225-003, Laboratorios Jackson, West Grove, PA, EEUU.

**Cy2 anti-cabra de burro:** #7055-225-147, Laboratorios Jackson, West Grove, PA, EEUU.

**Cy3 anti-conejo de burro:** #711-165-152, Laboratorios Jackson, West Grove, PA, EEUU.

**Cy3 anti-ratón de burro:** #715-165-151, Laboratorios Jackson, West Grove, PA, EEUU.

**Cy5 anti-cabra de burro:** #711-175-152, Laboratorios Jackson, West Grove, PA, EEUU.

**Cy5 anti-conejo de burro:** #711-175-152, Laboratorios Jackson, West Grove, PA, EEUU.

**Cy5 anti-conejo de cabra:** #111-175-003, Laboratorios Jackson, West Grove, PA, EEUU.

**Anticuerpo biotinilado anti-cabra de conejo:** #305-065-003, Laboratorios Jackson, West Grove, PA, EEUU.

**Anticuerpo biotinilado anti-conejo de cabra:** #111-065-003, Laboratorios Jackson, West Grove, PA, EEUU.

**Anticuerpo biotinilado anti-ratón de burro:** #715-065-150, Laboratorios Jackson, West Grove, PA, EEUU.

**Estreptavidina conjugada con Cy2.** Estreptavidina conjugada con el fluorocromo Cy2. #016-220-084, Laboratorios Jackson, West Grove, PA, EEUU.

## Instrumentos

**Arcón congelador,** Revco Ultima II, -80 °C. Ashewille, NC, EEUU. ( $\pm 0,5$  °C).

**Balanza,** Kern EG 600-2M. Kern & Sohn, Balingen, Alemania ( $\pm 0,01$  g).

**Balanza de precisión,** Sartorius CP 124 S, Sartorius, Göttingen, Alemania ( $\pm 10^{-4}$  g).

**Bomba peristáltica de perfusión,** Miniplus 3 M312, Gilson, Villiers-le-Bel, Francia ( $\pm 0,1$  ml·min<sup>-1</sup>).

**Centrífuga de tubos de 15-50 ml**, Hermle 7400, Hermle Labortechnik, Wehingen, Alemania.

**Centrífuga de tubos 1,5 ml**, 5415D, Eppendorf, Hamburgo, Alemania.

**Citómetro de flujo**, FACSCalibur, BD; NJ, EEUU.

**Criostato**, Micron HM 560, Thermo Fischer Scientific, MA, EEUU.

**Dispositivo de inmovilización para ratones**, LE5016, PanLab S.L.; Barcelona.

**Espectrofotómetro de placas**, Multiskan Ascent, Termo Electron Corp, Basingstoke, RU.

**Estereotáxico para pequeños animales**, modelo 900, Kopf Instruments, Tujunga, CA, EEUU.

**Estufa de incubación**, Incubat 2000205, Selecta, Barcelona.

**Fotomicroscopio**, Olympus Provis AX70 preparado para microscopía de campo claro, de campo oscuro, epifluorescencia y Normarski, con objetivos PlanApo 1,25x (N.A. 0.04) y Uplan F1 4x (N.A. 0.13), 10x (N.A. 0.30), 20x (N.A. 0.50), 40x (N.A. 0.75) y 100x (N.A. 0.6-1.3), Olympus Optical Co., LTD, Tokio, Japón. El microscopio tiene acoplada una cámara digital de 12 megapíxeles Olympus DP70, Olympus Optical Co., LTD, Tokio, Japón. La cámara digital tiene adaptado un filtro tricromático secuencial, Cambridge Research & Instrumentation Inc., Boston, EEUU.

**Fuente de calor**, InfraCare HP3621, Philips Ibérica; Madrid.

**Horno microondas**, MIG 2125, Orbegozo, Sonifer, Murcia.

**Lavador de placas de ELISA**, DROP, Radim Diagnostics, Pomezia, Italia.

**Matriz cerebral de ratón**, con planos coronales consecutivos de 1 mm. Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, EEUU.

**Medidor de pH**, pH 213 con sonda para temperatura. Hanna Instruments, EEUU.

**Microscopio confocal espectral**, Leica TCS SP2, acoplado a un microscopio invertido Leica DMIRE2 con objetivos PL Apo 20x (N.A. 0.70), 40x (N. A.

1.25-0.75), 63x (N.A. 1.32-0.6). Leica Instruments GmbH, Mannheim, Alemania.

**Microtomo de deslizamiento**, Jung SM 2000, cuchilla tipo C, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Alemania. Acoplado a una unidad de congelación, Frigomobil, Leica.

**Microtomo de rotación**, Leica 2065. Leica Instruments GmbH, Nussloch, Alemania.

**Olfatómetro**, aparato de medida de la capacidad olfativa de ratones. Construido en el Instituto Pasteur (París) según el diseño original de Bodyak y Slotnick (1999)

**Pipetas de precisión**, Nichipet EX Nichiryō, Chiyada-ku, Tokio, Japón (con capacidades de 0.5 µl a 10 ml).

**Rota-rod**, RS LSi, Letica Scientific Instruments, Panlab, Cornellà, Barcelona.

**Sistema de registro y amplificación para neuroelectrofisiología**, Tucker Davis Technologies, Alachua, FL, EEUU.

**Termociclador**, Veriti de 96 pocillos, Applied Biosystems, CA, EEUU

## Material informático

**Adobe Photoshop CS2 8.0.1** Programa para el procesamiento de imágenes digitales. Adobe Systems Incorporated. San José, California, EEUU.

**DP Controller 1.2.1.108**. Programa para captura de imágenes digitales. Olympus Optical Co., LTD.

**DP Manager 1.2.1.107**. Programa de procesamiento de imágenes digitales. Olympus Optical Co., LTD.

**Image J 1.37**. Programa para cuantificación y trabajo con imágenes digitales. Wayne Rasband, National Institutes of Health, EEUU.

**Leica Confocal Software 2.5**. Programa de captura de imágenes digitales. Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Alemania.

**Microsoft Excel 2007**. Hoja de cálculo para tabulación y procesamiento de datos. Microsoft Corporation, Madrid, España



**Microsoft Word 2007.** Programa de procesamiento de textos. Microsoft Corporation, Madrid, España

**Microsoft Power Point 2007.** Programa de elaboración de diapositivas e imágenes. Microsoft Corporation, Madrid, España

**Neurolucida.** Programa de análisis de imágenes de microscopía a tiempo real. V8.23, MicroBrightField, Colchester, VT, EEUU

**Neuroexplorer.** Programa de cuantificación y análisis de datos derivados del programa Neurolucida. V4.70.3, MicroBrightField, Colchester, VT, EEUU

**SPSS para Windows 17.0.** Programa de análisis estadístico. SPSS Chicago, Illinois, EEUU.



# Apéndice II

**ARTÍCULOS CIENTÍFICOS ELABORADOS HASTA LA FECHA, RELACIONADOS CON LA  
PRESENTE TESIS DOCTORAL**



## LONG-LASTING CHANGES IN THE ANATOMY OF THE OLFACTORY BULB AFTER IONIZING IRRADIATION AND BONE MARROW TRANSPLANTATION

D. DÍAZ,<sup>a</sup> J. S. RECIO,<sup>a</sup> F. C. BALTANÁS,<sup>a</sup> C. GÓMEZ,<sup>a</sup>  
E. WERUAGA<sup>a,\*1</sup> AND J. R. ALONSO<sup>a,b1</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Cell Plasticity and Neurorepair, Institute for Neuroscience of Castilla y León, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain

<sup>b</sup>Instituto de Alta Investigación, Universidad de Tarapacá, Arica, Chile

**Abstract**—The adult brain is considered to be a radioresistant organ since it is mainly composed of non-dividing cells. However, in adult animals there are a few neurogenic brain areas that are affected by ionizing radiation whose plasticity and capacity for recovery are still unclear. Here, mice were irradiated with a minimal lethal dose of radiation in order to determine its effects on the subventricular zone (SVZ), the rostral migratory stream (RMS), and the olfactory bulb (OB). These regions underwent a dramatic reduction in cell proliferation and ensuing morphological alterations, accompanied by a patent reactive gliosis. Bone marrow stem cell (BMSC) transplants were also performed after the radiation treatment to allow the mouse survival with a view to analyzing long-term effects. Normal proliferation rates were not recovered over time and although bone marrow-derived cells reached the brain, they were not incorporated into the SVZ-RMS-OB pathway in an attempt to rescue the damaged regions. Since neurogenesis produces new interneurons in the OB, thus feeding cell turnover, the volume and lamination of the OB were analyzed. The volume of the OB proved to be dramatically reduced at postnatal day 300 (P300), and this shrinkage affected the periependymal white matter, the granule cell layer, the external plexiform layer, and the glomerular layer. These results should be taken into account in cell therapies employing BMSC, since such cells reach the encephalon, although they cannot restore the damage produced in neurogenic areas. This study thus provides new insight into the long-term effects of ionizing radiation, widely employed in animal experimentation and even in clinical therapies for human beings. © 2011 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Key words:** cell transplantation, irradiation, olfactory bulb, rostral migratory stream, stem cells, subventricular zone.

<sup>1</sup> Both authors contributed equally to this work.

\*Correspondence to: E. Weruaga, Institute for Neuroscience of Castilla y León, C/Pintor Fernando Gallego 1, E-37007 Salamanca Spain. Tel: +34-923-294500 ext. 5324; fax: +34-923-294750. E-mail address: ewp@usal.es (E. Weruaga).

**Abbreviations:** BMSC, bone marrow stem cells; DAPI, 4'-6-diamidino-2-phenylindole; DG, dentate gyrus; EPL, external plexiform layer; GCL, granule cell layer; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GFP, green fluorescent protein; GL, glomerular layer; OB, olfactory bulb; PB, phosphate buffer; PBS, phosphate-buffered saline; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PI, propidium iodide; PWM, periependymal white matter; RMS, rostral migratory stream; SVZ, subventricular zone; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP-biotin nick-end labeling.

0306-4522/11 \$ - see front matter © 2011 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.neuroscience.2010.10.082

The olfactory bulb (OB) is a laminated structure with a well-organized distribution of known cell types and synaptic circuits. This structure is the first synaptic relay for the processing of olfactory signals (Petreanu and Álvarez-Buylla, 2002; Carleton et al., 2003; Baltanás et al., 2007). Olfactory information is refined and modulated by interneurons; mainly periglomerular cells and granule cells (Petreanu and Álvarez-Buylla, 2002; Carleton et al., 2003; Baltanás et al., 2007). New neuroblasts reach the OB to replace the interneurons that die along the lifespan of mammals (Carleton et al., 2003; Imayoshi et al., 2008) and this continuous cell turnover is necessary for the maintenance of cellular organization and the function of the OB (Imayoshi et al., 2008). Thus, this structure is one of the two main targets of adult neurogenesis in the mammalian brain (Altman, 1969; Carleton et al., 2003; González-Granero et al., 2006; Lois and Alvarez-Buylla, 1993), together with the dentate gyrus (DG) of the hippocampal formation (Altman and Das, 1965; Eriksson et al., 1998; van Praag et al., 2002).

The neurogenic process starts in the subventricular zone (SVZ) (Altman, 1969; Lois and Alvarez-Buylla, 1993; Carleton et al., 2003; González-Granero et al., 2006). Lining the lateral ventricles, the SVZ is a tissue layer formed by several types of cells; some of them are mitotically active throughout the lifespan of rodents, acting as stem cells (Lois and Alvarez-Buylla, 1993; Doetsch et al., 1997). The new neuroblasts generated in the SVZ migrate towards the OB through the pathway called the “rostral migratory stream” (RMS; Lois and Álvarez-Buylla, 1994; Lois et al., 1996; Carleton et al., 2003). This tangential migration is carried out through hollow structures named “glial tubes,” formed by astrocytes (Doetsch et al., 1997; Lois et al., 1996; Peretto et al., 1997). Along this corridor, migrating cells divide again (Lois and Álvarez-Buylla, 1994; Lois et al., 1996; Carleton et al., 2003). Once neuroblasts have reached their destination, they migrate radially from the extension of the RMS in the OB (RMS-OB) to outer layers. Finally, neuroblasts differentiate, mainly into either new granule cells or periglomerular cells, in a process of continuous turnover (Imayoshi et al., 2008; Mouret et al., 2009).

Previous experiments have demonstrated that brain injury, usually characterized by reactive gliosis (Garden and Moller, 2006; Milligan and Watkins, 2009), can modify the cell proliferation and migration patterns of neurogenic encephalic sites in an attempt to repair the damage suffered (Gould and Tanapat, 1997; Takagi et al., 1999; Jin et al., 2001; Goings et al., 2004; Sundholm-Peters et al., 2005). Under pathological conditions, new neurogenesis has also been detected in brain regions other than the SVZ

and DG, although such findings are controversial (Zhao et al., 2003; Frielingsdorf et al., 2004). Moreover, it has been demonstrated that bone marrow stem cells (BMSC) can be harboured by different organs, including skeletal muscle (Bittner et al., 1999; Gussoni et al., 1999), cardiac muscle (Orlic et al., 2001), the liver (Petersen et al., 1999; Theise et al., 2000a,b), vascular endothelium (Jackson et al., 2001), and the central nervous system (Brazelton et al., 2000; Mezey et al., 2000; Mezey, 2005). BMSC can reach the brain and fuse with pre-established neurons or else transdifferentiate into new nerve cells (Brazelton et al., 2000; Mezey et al., 2000; Blau et al., 2001; Álvarez-Dolado et al., 2003; Álvarez-Dolado, 2007). It has also been demonstrated that brain damage increases the number of BMSC reaching this organ (Bae et al., 2005; Johansson et al., 2008), especially when accompanied by inflammation (Johansson et al., 2008), in close relationship with glial processes (Garden and Moller, 2006; Milligan and Watkins, 2009). This suggests the use of BMSC as a possible therapeutic strategy.

Proliferating cells are highly susceptible to ionizing radiation, in contrast to mature, non-dividing neurons (Tada et al., 1999; Monje et al., 2002; Mizumatsu et al., 2003; Balentova et al., 2006; McGinn et al., 2008). Indeed, this is the basis of radiation therapy, widely used to treat several kinds of brain tumours (Strother et al., 2002; Hellström et al., 2009). Different studies have attempted to determine the true effects of ionizing radiation on proliferating areas of the encephalon. Most of them have focused on the damage undergone by the DG of the hippocampal formation, characterized by an impairment of hippocampal neurogenesis and cognitive deficits (Monje et al., 2002; Mizumatsu et al., 2003; Monje and Palmer, 2003; Rola et al., 2004; Manda et al., 2009). By contrast, fewer studies have analyzed the effect of ionizing radiation in the SVZ, and even fewer have studied the RMS or the OB (Hellström et al., 2009; Lazarini et al., 2009) with low (sublethal) doses of radiation (Balentova et al., 2006, 2007). In addition, those studies were performed with different doses of radiation (some of them very high), focused exclusively on the heads of the animals, and addressed a broad range of maximum survival times (from 30 to 180 days). The results of such studies regarding cell proliferation vary, reporting a lack of recovery, complete restoration, and even an increase in neurogenesis (Shinohara et al., 1997; Tada et al., 1999; Balentova et al., 2006; Hellström et al., 2009; Lazarini et al., 2009; Manda et al., 2009).

The purpose of the present study was to analyze the alterations occurring in the SVZ-RMS-OB pathway after a minimal lethal irradiation. We focused on (a) the immediate effects on cell proliferation, cell death, and the ensuing glial response, and (b) on the long-term effects of such radiation, determining whether that neurogenic pathway can be restored after the injury over time. Regarding the latter, BMSC transplants were performed to allow the survival of mice injured. Secondly, the incorporation of bone marrow-derived cells into this neurogenic region was also addressed to determine whether these cells reaching the brain might have an effect on the regions affected by the radiation. The results

provide new insight into our understanding of the extent of the effects of ionizing radiation -widely employed in research and even in clinical therapy- and the capacity of damaged neurogenic regions to recover.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Animals

Mice of the C57BL/DBA strain (*Mus musculus*, L. 1758) were used. The animals were housed at the Animal Facilities of the University of Salamanca at constant temperature and humidity, with a 12/12 h photoperiod, and were fed *ad libitum* with water and special rodent chow (Rodent toxicology diet, B&K Universal G.J., S.L. Molins de Rei, Barcelona). Nine groups of animals were employed. One of them was used to determine the correct dose of radiation (see below), and the other eight ( $n=5$  each one) were divided among irradiated or non-irradiated mice for four different survival ages: 20 days (P20), P60, P150 and P300. Only male mice were used to determine the effect of radiation on cell proliferation, since dimorphic hormonal stages can affect neurogenesis in the forebrain (Díaz et al., 2009). Mice analyzed at P20 were also employed to analyze apoptosis, cell proliferation, and gliosis. These P20 animals did not receive any transplantation since they were sacrificed 24 h after the irradiation to determine its direct effects, with no other extrinsic factor. Mice that were allowed to survive up to P60, P150 and P300 were employed to analyze the proliferation, tissue damage and possible recovery of neurogenic regions at mid- and long-term survival times.

Transgenic mice of the BALBc strain (Hadjantonakis et al., 1998) with constitutive green fluorescent protein (GFP) were also used as bone marrow donors to perform transplants into the irradiated mice. All donors were adult mice of about P60 age. These animals were also housed under the same conditions mentioned above.

All animals were housed, manipulated and sacrificed in accordance with current European (86/609/ECC and directive 2003/65/CE) and Spanish legislation (RD 1201/2005 and law 32/2007) and the experiments were approved by the Bioethical Committee of the University of Salamanca.

### Irradiation of mice

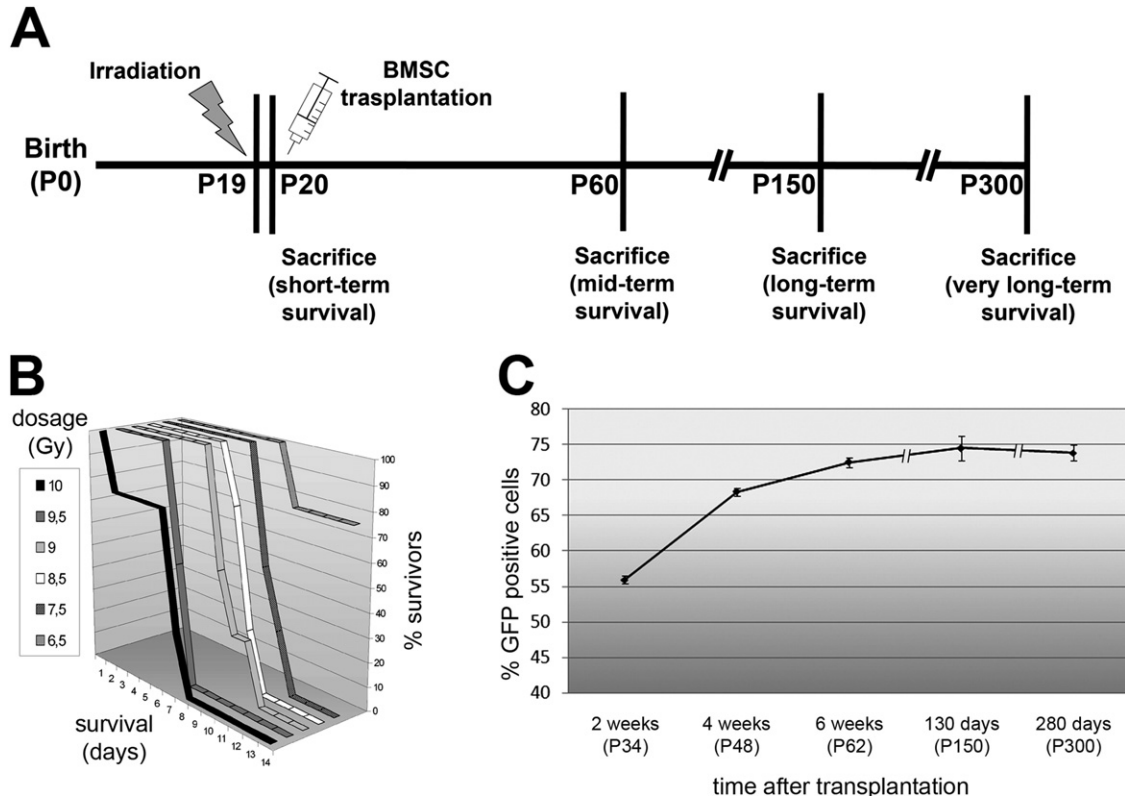
Whole animals were irradiated with a gamma irradiation device with a  $^{137}\text{Cs}$  source for mice, model Gammacell 1000 Elite (MDS Nordion, Ottawa, Canada). This device provides a radiation rate of 243 cGy/min, with energy of 0.662 MeV.

The most suitable dose of irradiation (minimal lethal irradiation) was established by irradiating six subgroups of P19 mice (four animals each) in the 6.5 and 10 Gy range. These mice did not receive any transplant and were kept in standard, ventilated individual cages to determine the direct effect of the irradiation on their survival.

Once the minimal lethal level of irradiation had been established, four groups of P19 mice (five animals each) were irradiated with 7.5 Gy (see "Results") and received a bone marrow transplant from a GFP animal donor 24 h later (Fig. 1A). After the irradiation, the mice were housed separately in an insulated rack specific for immunodepressed animals at the Animal Facilities of the University of Salamanca for 2 weeks and thereafter under standard conditions.

### Bone marrow transplantation

Three GFP transgenic BALBc mice were used as donors; one for each transplanted group. In these animals, GFP is expressed constitutively and the hence incorporation of the transplant could be determined using flow cytometry analysis of peripheral blood (see below) and the fate of its cells could be followed because of their distinctive green fluorescent labeling.



**Fig. 1.** (A) Time course schema of the whole experiment. (B) Diagram showing the survival times of the mouse groups treated with different doses of radiation. (C) Percentage of GFP-positive white blood cells vs. total white blood cells at 2, 4 and 6 wk after the transplant, and before sacrifice at P150 and P300.

Donors were sacrificed by cervical dislocation. Then, their hind paws were removed and the femurs and tibias dissected. Bone marrow extraction was performed by injection of IMDM medium (Iscove's Modified Dulbecco's Medium; Invitrogen; Carlsbad, CA, USA) with an insulin syringe at both ends of the bone. The bone marrow wash was filtered through a 70- $\mu$ m pore size filter (BD Falcon; Bedford, MA, USA) and centrifuged at 1500 rpm for 5 min. The supernatant was removed and the pellet was re-suspended in lysis buffer (140 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 17 mM Tris-base, pH 7.4) for 5 min to break up erythrocytes. Following this, the reaction was stopped by adding 45 ml of 0.1 M phosphate-buffered saline, pH 7.4 (PBS), to each collection tube, and an aliquot was collected to estimate the number of BMSC extracted using a Thoma chamber. The cell suspension was centrifuged again at 1500 rpm for 5 min and the pellet was resuspended in PBS.  $7.5 \times 10^6$  cells were transplanted in each animal in a maximum volume of 150  $\mu$ l. Thus, the volume of cell suspension injected into each mouse depended on the concentration of cells. The injection of BMSC was performed at P20 in the tail vein. The irradiated mice sacrificed at ages of P60, P150 and P300 received this transplant (Fig. 1A).

The BMSC remaining after the transplants were stained with Trypan Blue to determine their viability. These cells were subjected to the same manipulations as the injected ones and were therefore suitable for estimating the viability of the transplant. Since only a few cells incorporated this dye, it was concluded that the vast majority (more than 95%) of the transplanted cells were alive.

### Graft monitoring

The percentage of GFP-positive cells in peripheral blood was measured to check the correct assimilation of the transplant.

Blood was extracted by means of a small prick in the supraorbital plexus 2 weeks after transplantation, once the period of isolation of the immunodepressed animals in the rack had ended. Blood samples (approximately 50  $\mu$ l) were collected in 100  $\mu$ l of heparinized saline (1000 U/ml in 0.9% p/v NaCl). Erythrocytes were destroyed with 6 ml of a specific lysis buffer (0.83% w/v  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.1% w/v  $\text{KHCO}_3$ , 0.372% w/v EDTA, pH 7.3) for 20 min. Then, the cell suspension was centrifuged at 1500 rpm for 5 min and the supernatant was removed. The pellet was resuspended in PBS and centrifuged again at 1500 rpm for 5 min, and the resulting pellet was again resuspended in 1 ml of PBS. The percentage of GFP-positive cells was determined by flow cytometry (FACSCalibur, Becton Dickinson; NJ, USA). These procedures were repeated four and six weeks after transplantation and at the time of sacrifice.

### Tissue preparation

Animals were deeply anaesthetized with 1  $\mu$ l/g b.w. of a mixture containing ketamine hydrochloride (Ketolar; Parke-Davis, Barcelona, Spain) and xylazine hydrochloride (Rompun; Bayer, Leverkusen, Germany) at a proportion of 3:4. Then, the animals were perfused intracardially with PBS, followed by 5 ml/g b.w. of Zamboni's fixative (4% w/v of depolymerized paraformaldehyde and 15% v/v saturated picric acid in PBS). After perfusion, the brains were dissected and rinsed for 2 h with PBS.

Tissue blocks were cryoprotected by immersing them in 30% (w/v) sucrose in PBS. When the blocks had sunk, they were frozen with liquid nitrogen and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until sectioning. Forty- $\mu$ m thick slices were obtained using a freezing-sliding microtome (Jung SM 2000, Leica Instruments, Nussloch, Germany) attached



to a freezing unit (Frigomobil, Leica Instruments) and rinsed in PBS (3×10 min).

### Immunofluorescence

A double immunofluorescence technique was carried out in order to study gliosis in proliferative regions after the irradiation. Tissue slices were washed in PBS and incubated overnight at room temperature under continuous rotary shaking in a medium containing 0.2% (w/v) Triton X-100, 5% (v/v) normal goat serum, and the primary antibodies in PBS. An anti-gial fibrillary acidic protein (GFAP) polyclonal mouse IgG (1:1.000; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) was employed to label astrocytes, and an anti-Iba1 polyclonal rabbit IgG (1:1000; Wako, Osaka, Japan) was used to label microglia. Then, the sections were washed in PBS (3×10 min) and incubated in a second medium for 2 h at room temperature under continuous rotary shaking. This second medium contained 0.2% (w/v) Triton X-100, secondary Cy2-conjugated goat anti-mouse fluorescent antibody (1:500; Jackson, West Grove, PA, USA), and Cy3-conjugated goat anti-rabbit fluorescent antibody (1:500; Jackson) in PBS. Thirty min before the end of the incubation, 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) 1:2.000 (v/v) was added to the medium to counterstain the cell nuclei.

To determine the localization of bone marrow-derived cells in the encephalon, a single immunofluorescence technique was developed. In this case, the first incubation medium contained 0.2% (w/v) Triton X-100, 5% (v/v) normal donkey serum, and the primary anti-GFP polyclonal goat antibody (1:2.000; Abcam, Cambridge, UK) in PBS. The second medium contained 0.2% (w/v) Triton X-100 and the secondary Cy2-conjugated donkey anti-goat fluorescent antibody, (1:500; Jackson) in PBS. Thirty min before the end of the incubation DAPI, 1:2.000 v/v, was added to the medium to counterstain the cell nuclei.

Finally, and in both techniques, sections were rinsed in the darkness in PBS and mounted with coverslips using a freshly prepared anti-fade medium made of 0.42% (w/v) glycine, 0.021% (w/v) sodium hydroxide, 0.51% (w/v) sodium chloride, 5% (w/v) *N*-propyl-gallate, 70% (v/v) glycerol, and 0.002% (w/v) thymersal in distilled water. Specificity controls were carried out in parallel with the immunofluorescence technique, using the same procedures without the first or the second antibodies. No labeling was detected in these controls.

### PCNA immunofluorescence

The immunolabeling technique against proliferating cell nuclear antigen (PCNA) was employed to detect dividing cells. The tissues required a special treatment to obtain an adequate PCNA staining (Valero et al., 2005). Tissue slices were incubated in Bouin-4% fixative (4% w/v of depolymerized paraformaldehyde, 75% v/v saturated picric acid and 5% v/v acetic acid in distilled water) for 1 h and then washed thoroughly in PBS (Valero et al., 2005). Following this, the sections were subjected to an antigen recovery procedure, as previously described (Shi et al., 1991; Dover and Patel, 1994). First, they were boiled twice in citrate buffer (0.1 M citric acid and 0.1 M sodium citrate in distilled water) for 4 min. Then, the tissue slices were rinsed in PBS (1×10 min) and incubated for 24 h at room temperature under continuous shaking in a medium containing 0.2% (w/v) Triton X-100, 5% (v/v) normal goat serum, and the primary anti-PCNA antibody (1:3000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) in PBS. Following this, the sections were washed in PBS (3×10 min) to remove unbound antibody and were then incubated in a second medium for 2 h at room temperature under continuous rotary shaking. This second medium contained the secondary Cy2-conjugated goat anti-mouse fluorescent antibody, 1:500 (Jackson) and 0.2% (w/v) Triton X-100 in PBS. Thirty min before the end of the incubation, propidium iodide (PI; Sigma) at 1:2000 (v/v) was added to the

medium in order to provide a nuclear counterstain. Finally, sections were rinsed in the darkness in PBS and coverslipped, applying anti-fade medium. The specificity controls were the same as above, with identical results.

### TUNEL technique

The TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling) technique was employed to detect apoptotic cells the sections obtained from P20 mice. Tissue slices were washed with PBS (3×10 min) and incubated for 20 min in 0.5% sodium borohydride solution (w/v) in PBS to prevent the fluorescent staining background (Weruaga-Prieto et al., 1996). They were then washed with PBS (3×10 min) and treated for 15 min with 0.2% (v/v) Triton X-100 and 0.1% (p/v) sodium citrate in distilled water. Following this, they were washed again with PBS (2×10 min) and incubated with TUNEL buffer for 30 min. This buffer comprised 30 mM Tris-HCl, 140 mM sodium cacodylate, 1 mM CoCl and 0.3% Triton X-100 (v/v). Then, the tissue slices were incubated in a medium with terminal transferase (800 U/ml; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and biotinylated dUTP (1 μM; Roche Diagnostics) in TUNEL buffer for 2 h. The reaction was terminated by the addition of saline sodium citrate buffer (0.15 M sodium chloride and 0.015 M sodium citrate). Finally, the slices were washed again with PBS (3×10 min) and developed with a medium containing Cy2-conjugated streptavidin (1:200) in PBS. Both PI staining and slide mounting were performed similarly to the procedures used in the PCNA immunofluorescence technique.

In some sections, the TUNEL technique was developed with immunoperoxidase. Once the reaction of the terminal transferase had ended and the sections had been washed, they were incubated with the avidin-biotin-peroxidase complex (1:200 v/v) in PBS for 2 h. The sections were then rinsed in PBS (3×10 min), and the immunoreaction was revealed with 0.05% 3,3'-diaminobenzidine (DAB) and 0.03% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS. The reaction was controlled under the microscope and stopped with cold PBS. Sections were dehydrated in increasing ethanol series and xylene, after which they were mounted with Entellan (Merck, Darmstadt, Germany) and coverslipped. Specificity controls for the TUNEL technique were performed without the addition of terminal transferase, dUTP, streptavidin or the avidin-biotin-peroxidase complex. No labeling was detected in these control tests.

### Analyses

Three large proliferating regions were analyzed: the SVZ, the RMS and the RMS-OB. For a better comparison of the experimental groups, five equidistant and comparative rostro-caudal levels were selected, as previously described (Weruaga et al., 1999; Murias et al., 2007; Díaz et al., 2009). These were designated SVZ I (bregma: 0.5 mm, according to the atlas of Hof et al., 2000), SVZ II (bregma: 1.3 mm), RMS I (bregma: 2.1 mm), RMS II (bregma: 2.9 mm) and RMS-OB (bregma: 3.7 mm). The regions of interest in each level were those showing proliferation: the SVZ with its dorsal horn, the RMS itself, and the rostralmost extension of the RMS in the OB. To determine neural proliferation, the PCNA-positive cells in the areas of interest of each level were counted unilaterally on focal planes obtained with a confocal microscope (Leica TCS SP2, Leica Instruments). As expected, no differences were observed between either brain hemispheres. Accordingly, the side of each section was chosen at random. The percentages of PCNA-positive cells in each area were calculated and referred to the total number of cells of these areas (labeled with PI). Animals with ages of P20, P60 and P150 were analyzed for proliferation studies.

P20-irradiated mice were used to determine the extent of cell death caused directly by radiation at the time of transplant in comparison with P20 control animals. Apoptotic cells were scarce in the non-irradiated animals. Thus, all TUNEL-stained cells were



counted not only at the five representative levels, but also throughout the three regions analyzed, as previously described (Díaz et al., 2009). Each brain was sectioned in six consecutive series and one of them was used to perform this quantitative analysis. Thus, a one-in-six series was studied in each animal. Photographs of the areas of interest in each slice were taken with an Olympus DP70 digital camera (Olympus Optical, Tokyo, Japan) attached to an Olympus Provis AX70 photomicroscope (Olympus Optical) and measured using the Image J program (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Estimation of the cell death rate was referred to as the number of apoptotic cells per  $\mu\text{m}^2$  of the area analyzed. Thus, the density of apoptotic cells in the three regions of the proliferation pathway -SVZ, RMS and RMS-OB- was obtained as a whole. All counts were performed by the same person (D.D.), following the same criteria and in a double blind study (F.C.B. and J. S. R.).

Once homoscedasticity (quality of samples with normal distribution and equal variances) had been checked with the Kolmogorov–Smirnov test, Student's *t*-test was employed to analyze possible differences between the irradiated and non-irradiated animals in each level at the different survival ages (SPSS 17.0 for Windows, SPSS, Chicago, IL, USA).

Nissl staining with thionine was performed in P300 OB sections to measure the areas of the OB layers. As mentioned above, a one-in-six series was studied in each animal. Photographs of complete OB sections were taken with an Olympus DP70 digital camera (Olympus Optical, Tokyo, Japan) attached to an Olympus Provis AX70 photomicroscope (Olympus Optical). The areas of the different OB layers and the total area of each section were measured using the ImageJ program (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). With knowledge of the number of sections of the series employed and the areas of each section, estimation of the volume of these OB and their layers was performed using the TableCurve 2D program, version 5.01 (SYSTAT Software, Chicago, IL, USA).

## RESULTS

### Determination of minimum lethal dose of radiation

All animals treated with radiation higher than 6.5 Gy died at different time-points, their survival time being inversely correlated with the dose used (Fig. 1B). Regarding the group irradiated with 6.5 Gy, only one mouse died 10 days after the irradiation. Four weeks later, the remaining animals of the same group were sacrificed and their bone marrow extracted (as with donor mice; see Experimental procedures), obtaining a similar number of cells as in the non-irradiated mice. Thus, a 6.5 Gy dose was not considered insufficient to ablate the bone marrow in these mice. In a control experiment, mice irradiated with 7.5 and 8.5 Gy were transplanted with healthy bone marrow from a donor. In both groups, all animals survived for a long time (more than 5 months). Therefore, the death of the mice irradiated with 7.5 and 8.5 Gy was mainly due to ablation of the bone marrow. In light of the foregoing, a dose of 7.5 Gy was chosen as the minimal lethal dose of radiation.

### Graft monitoring

The analysis of peripheral blood performed with flow cytometry revealed an increase in the percentage of GFP-positive blood cells in all transplanted animals from 2 weeks post-transplantation to 6 weeks (Fig. 1C). These results point to a progressive replacement of the original

blood cells by those derived from the new GFP bone marrow. In addition, the percentages of GFP-positive blood cells in the transplanted animals at the time of sacrifice (P150) were not statistically different from the percentages of GFP-positive blood cells of the donors (donors:  $77.25 \pm 1.74\%$  SEM; transplanted:  $74.51 \pm 1.69\%$  SEM;  $P > 0.05$ ). Thus, the replacement of host bone marrow by grafted BMSC and restoration of the hematopoietic system were complete, allowing the survival of the transplanted animals.

### Increase in cell death after irradiation

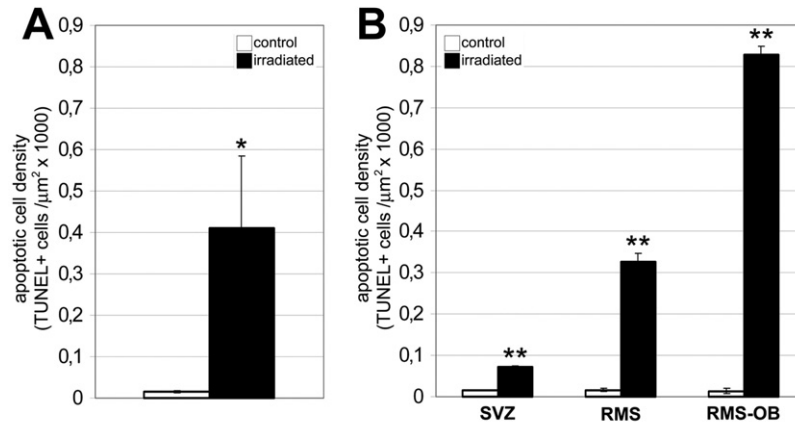
TUNEL-labeled apoptotic cells were observed in the three regions (SVZ, RMS and RMS-OB) of the P20 animals studied. This technique counterstained with PI allowed us to visualize the typical chromatin condensation, as previously described (Gavrieli et al., 1992; Charriaut-Marlangue et al., 1996; Sairanen et al., 2006). The number of apoptotic cells in the control mice was very scarce in all regions studied. Indeed, analysis with Student's *t*-test revealed significant global differences between the irradiated and control animals (Fig. 2A;  $P < 0.05$ ), with a higher density of apoptotic cells in the former, as expected. These differences were also found separately in all three zones of study: the SVZ (Fig. 2B;  $P < 0.01$ ), RMS (Fig. 2B and Fig. 3;  $P < 0.01$ ) and OB (Fig. 2B;  $P < 0.01$ ). In addition, the density of apoptotic cells increased towards the rostralmost regions (Fig. 2B). No differences in cell death were observed in adjacent regions between the irradiated animals and the control mice.

In light of these results, it may be concluded that irradiation increases apoptotic cell death in the neurogenic sites analyzed. The direction of neuroblast migration and the higher density of apoptotic cells in the rostralmost region point to a displacement of these apoptotic cells towards the OB.

### Reactive gliosis in the proliferating regions

Microglial cells were detected throughout the brain, with no special distribution in the control mice (Fig. 4A, E, I). By contrast, an extremely dense staining for microglia appeared in the RMS and RMS-OB levels of the irradiated mice (Fig. 4B, F, J). Astrocytes were also detected in different regions of the brain, with a clear concentration in the proliferating zones in both control and irradiated mice (Fig. 4C, D, G, H, K, L), since astrocytes carry out specific support functions for the proliferation and migration of neuroblasts in neurogenic brain sites (Lois and Alvarez-Buylla, 1993; Lois et al., 1996; Doetsch et al., 1997; Peretto et al., 1997, 1999; Doetsch, 2003). Moreover, the staining for astrocytes in the RMS and the RMS-OB was much more widespread and denser in the irradiated than in the control mice (Fig. 4G, H, K, L). However, only a very slight increase in these glial markers was observed in the SVZ levels of the irradiated mice in comparison with the controls (Fig. 4A–D).

In sum, an evident reactive gliosis appeared in the irradiated mice at P20 in the rostral regions of the SVZ-RMS-OB pathway, where the density of apoptotic cells



**Fig. 2.** Density of apoptotic cells visualized with the TUNEL technique. (A) global results; (B) results sorted by rostrocaudal levels. Bars represent means  $\pm$  SEM. One asterisk indicates  $P < 0.05$ ; two indicate  $P < 0.01$  for statistically significant differences (Student's *t*-test). SVZ, subventricular zone; RMS, rostral migratory stream; RMS-OB, extent of the rostral migratory stream in the olfactory bulb.

was higher. Thus, dying cells and activated glial cells had concordant distributions. No differences in the distribution of glial cells were observed at P60, P150 or P300 (data not shown), suggesting that the reactive gliosis had appeared soon after irradiation, when apoptotic events were taking place.

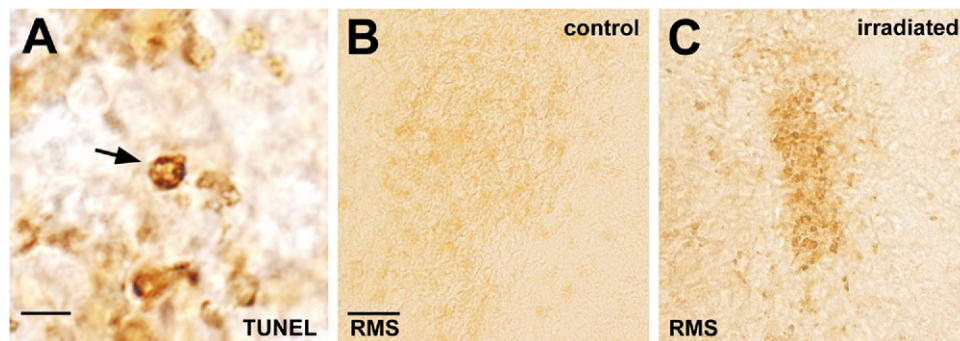
#### Decreases in cell proliferation

Most of the PCNA-positive cells were restricted to the areas of proliferation and migration (SVZ, RMS, RMS-OB; Fig. 5). In P20 animals, some PCNA-positive nuclei were also detected in neighboring areas of the SVZ and RMS, as previously described (Martoncikova et al., 2006). This presence of dividing cells outside the proliferating regions could be due to the migration of neuroblasts towards the accessory olfactory bulb (Bonfanti et al., 1997), and/or because forebrain development in these young mice had not yet been completed (He and Crews, 2007) and because their proliferation rate is higher than in older animals (Tropepe et al., 1997). In P60 and P150 animals, some of these “uncommon” PCNA-positive nuclei were also detected, but only near the RMS, because of neuroblast migration to the accessory olfactory bulb. In agreement

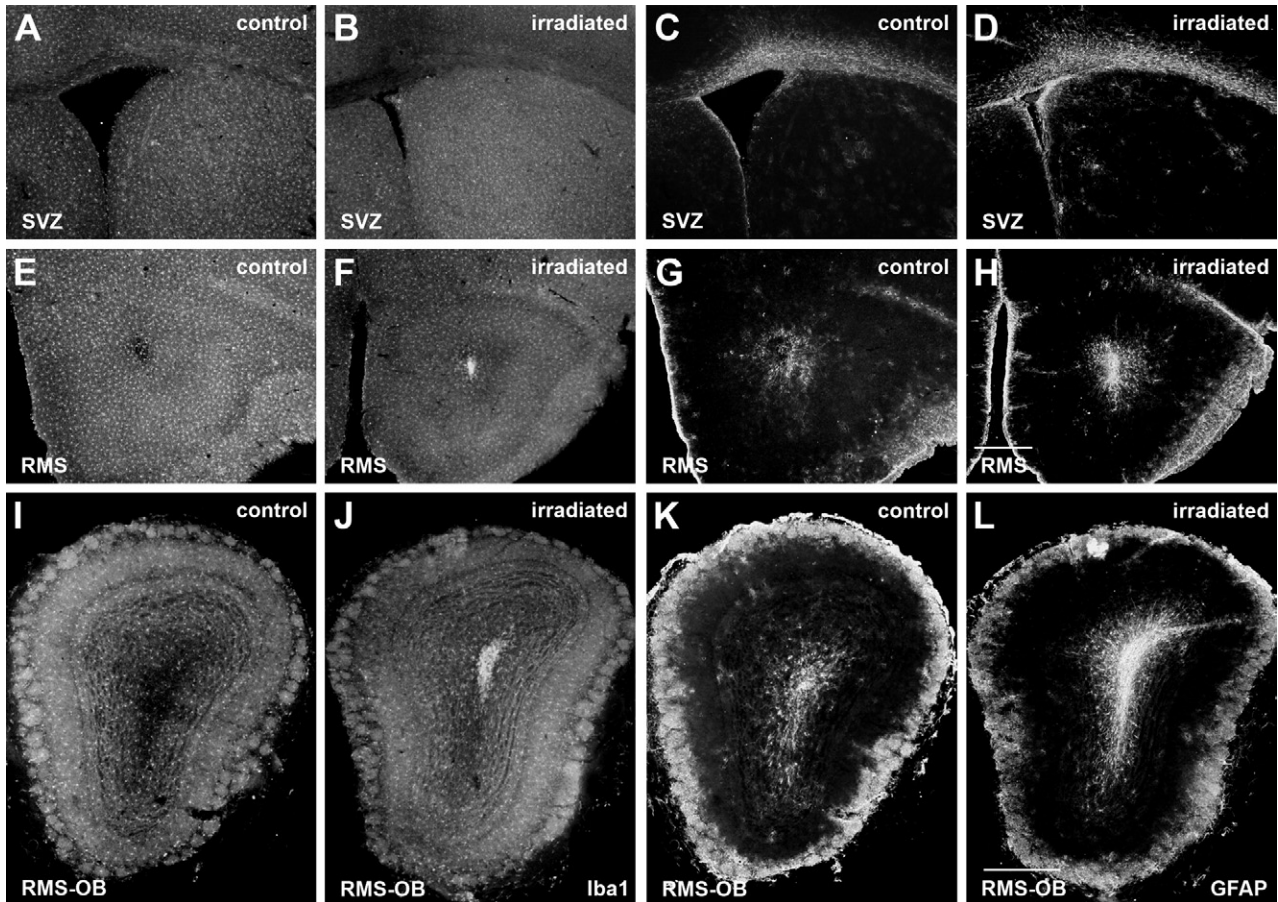
with previous findings, the percentage of proliferating cells along the RMS was not uniform, and it tended to be higher towards the caudal-most part (Martoncikova et al., 2006).

On P20, that is 24 h after irradiation, Student's *t*-test revealed significant differences between the irradiated and control mice as regards the global percentage of proliferating cells (control:  $27.45 \pm 3.801\%$  SEM; irradiated:  $5.81 \pm 0.83\%$  SEM;  $P < 0.01$ ; Fig. 6A), with fewer proliferating cells in the irradiated animals. Sorted rostrocaudally, significant differences persisted in the five levels: SVZ I (Figs. 5A, B and 6B;  $P < 0.01$ ), SVZ II (Fig. 6B;  $P < 0.05$ ), RMS I (Figs. 5C, D and 6B;  $P < 0.01$ ), RMS II (Fig. 6B;  $P < 0.05$ ) and RMS-OB (Fig. 6B;  $P < 0.05$ ). In addition, morphological alterations were observed in the SVZ region (Fig. 5B) and in the RMS (Fig. 5D), especially in the size and cell density of these regions. Thus, an irradiation with 7.5 Gy dramatically decreases cell proliferation in the SVZ-RMS-OB pathway, also affecting the structure of rostral proliferating regions.

A similar study was performed at P60 and P150 in order to determine both the mid- and long-term effects of ionizing irradiation and the possible recovery of cell proliferation. An initial qualitative analysis revealed that the



**Fig. 3.** Microphotographs obtained using the TUNEL technique in the RMS; a representative region of the global results. (A) Magnification of an apoptotic nucleus (arrow) showing the typical TUNEL staining. A higher density of apoptotic cells in irradiated (C) than in control mice (B) was found. Scale bar for (A) = 5  $\mu\text{m}$ ; for (B, C) = 25  $\mu\text{m}$ . For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.



**Fig. 4.** Images of the SVZ I (A–D), RMS I (E–H) and RMS-OB (I–L) levels of P20 mice. Microglial cells were labelled with Iba1 (A, B, E, F, I, J) and astrocytes with GFAP (C, D, G, H, K, L). Note the dramatic reactive gliosis in the RMS and OB regions of the irradiated mice in comparison with the controls (E–L). Scale bar for (A–H)=400  $\mu\text{m}$ ; for (I–L)=400  $\mu\text{m}$ . SVZ, subventricular zone; RMS, rostral migratory stream; RMS-OB, extent of the rostral migratory stream in the olfactory bulb.

morphological alterations of the regions studied not only persisted, but were increased at the P60 and P150 survival ages (Fig. 5). The density of cells in the RMS was especially affected, with very few surviving cells (Fig. 5H, L). In fact, the identification of the RMS I regions was not easy owing to the scarce cell population in comparison with the normal, easily distinguishable morphology of this structure. The quantitative study revealed differences in global proliferation at both survival ages: the irradiated animals had a lower percentage of proliferating cells than the control groups (P60 control:  $18.21 \pm 2.39\%$  SEM; P60 irradiated:  $5.37 \pm 0.94\%$  SEM; P150 control:  $14.17 \pm 1.94\%$  SEM; P150 irradiated:  $4.55 \pm 0.92\%$  SEM;  $P < 0.01$ ; Fig. 6C, E). However, the differences in each separate level of study did not always match the global result. At P60, significant differences were observed in the SVZ I (Figs. 5E, F and 6D;  $P < 0.01$ ), SVZ II (Fig. 6D;  $P < 0.01$ ), RMS I (Figs. 5G, H and 6D;  $P < 0.01$ ), and RMS-OB (Fig. 6D;  $P < 0.01$ ) levels, but not at the RMS II level (Fig. 6D;  $P > 0.05$ ), between the irradiated and control animals. At P150 the differences appeared at the SVZ I (Figs. 5I, J and 6F;  $P < 0.05$ ), SVZ II (Fig. 6F;  $P < 0.01$ ), RMS I (Figs. 5K, L and 6F;  $P < 0.01$ ) and RMS II (Fig. 6F;  $P < 0.01$ ) levels, but not in the RMS-OB (Fig. 6F;

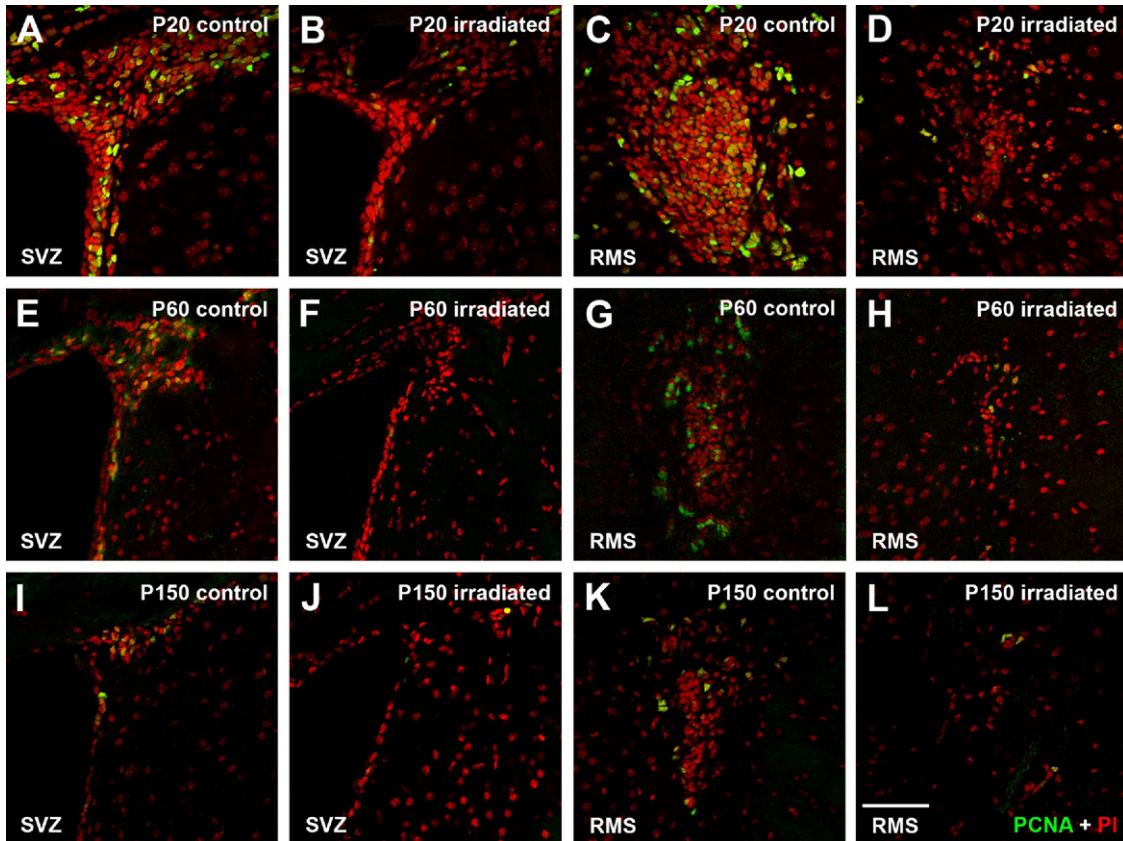
$P > 0.05$ ). These differences can be explained in terms of the decrease in proliferation with age (Tropepe et al., 1997) or the morphological changes in these regions due to irradiation (see Discussion). Regarding the irradiated mice, no statistically significant differences were detected in the global percentages of proliferating cells of the P20, P60 and P150 animals ( $P > 0.05$ ). Therefore, no recovery in cell proliferation occurred along these survival times.

In conclusion, a dose of 7.5 Gy (minimal lethal dose) significantly diminishes the proliferation rate in the forebrain and alters the morphology of the neurogenic areas of the olfactory system 24 h after exposure. Our results demonstrate that the normal morphology and proliferation rate are not recovered by 40 and 130 days after transplantation (P60 and P150, respectively), either by endogenous repopulation or by cells derived from a bone marrow transplant.

#### Long-term survival studies

Mice allowed to survive up to P300 were used to determine the effects of cell radiation over a very long-term survival period. An initial macroscopic study revealed a dramatic decrease in OB size in the irradiated mice (Fig.





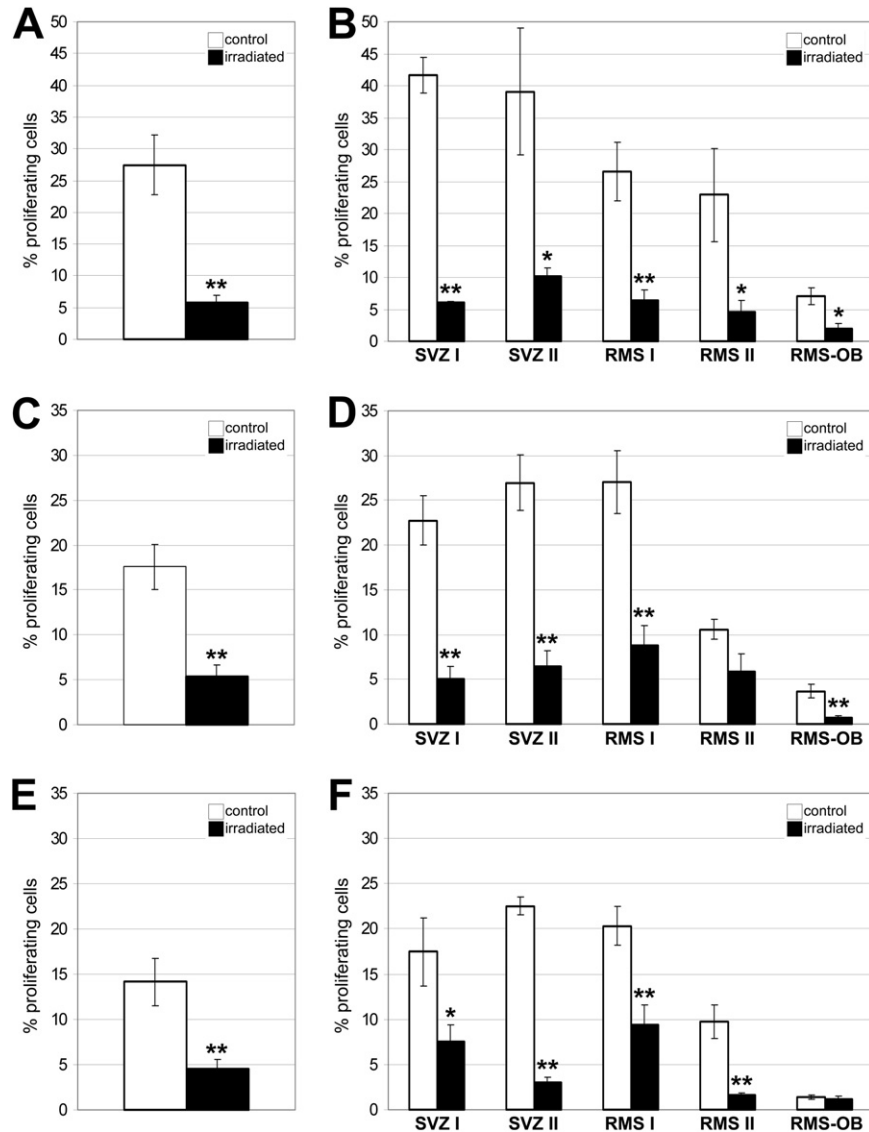
**Fig. 5.** Confocal images of SVZ I (A, B, E, F, I, J) and RMS I (C, D, G, H, K, L) levels. Proliferating cell nuclei are labelled with PCNA (green) and all cell nuclei are counterstained with PI (red). These regions are representative of the global percentage of proliferation at different survival times. At P20, the control animals (A, C) show a higher percentage of proliferating cells than the irradiated ones (B, D). This difference persists at P60 (E–H) and P150 (I–L). Comparison of irradiated (B, D, F, H, J, L) and control mice (A, C, E, G, I, K) reveals morphological alterations of the proliferating sites caused by radiation: mainly shrinkage and loss of borders. Scale bar=50  $\mu$ m. SVZ, subventricular zone; RMS, rostral migratory stream. For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.

7A–C). The brains of these mice were sectioned and Nissl staining with thionine was performed to compare them with the brains of control animals of the same age. The morphology of the SVZ was still altered, with the observation of a smaller size and a lower cell density than the control animals, as at P20, P60 and P150. The RMS was almost completely absent, whereas in the age-matched control animals it was always readily distinguishable (Fig. 8A, B, arrows). The total volume of the OB was reduced in the irradiated animals (Fig. 7D; reduction to 66.14%;  $P < 0.01$ ). The volume of the different layers of the olfactory bulb was also altered, with a decrease in the thickness of the granule cell layer (GCL; Figs. 7D and 8C–F, arrows), the external plexiform layer (EPL; Figs. 7D and 8C–F, arrowheads) and, to a lesser extent, the glomerular layer (GL; Fig. 7D). By contrast, the volume of the periepandymal white matter (PWM) did not change (Fig. 8C–F), probably due to the reduction in GCL cell numbers (see Discussion).

The above results demonstrated that the structural and functional damage to the SVZ–RMS–OB pathway still persists at P300, including severe alterations in the structure of the OB.

#### Arrival of GFP cells in the brain

To determine whether bone marrow-derived cells had arrived at the encephalon, the cerebella of transplanted mice were also examined to look for fusion events between such cells and Purkinje cells (Álvarez-Dolado et al., 2003; Weimann et al., 2003; Johansson et al., 2008; Recio et al., in press). Scarce GFP-positive Purkinje cells were observed in the cerebella of the P150 animals (Fig. 9A) but not in the P60 mice, indicating the slowness of the fusion process. All of them had two nuclei, suggesting fusion phenomena. Bone marrow-derived cells also reached other brain regions of the transplanted mice. The most common cell type was microglial, characterized by a double labeling for Iba1 and GFP (Fig. 9B, C). Both activated and latent microglial cells were observed. These cells were identified throughout the brains of all the host animals, mainly located at the periphery of the OB or in the cortex, in close contact with the meninges. In the SVZ–RMS–OB pathway, some small, round GFP-positive and Iba-1-negative cells were detected (Fig. 9B–E). They were also identified in other brain locations, with no special distribution (Fig. 9B, C)



**Fig. 6.** Cell proliferation at different ages (P20, P60 and P150). (A), (C) and (E) show the global percentage of proliferating cells (as the rate of PCNA-positive cells of total cells), whereas (B), (D) and (F) show the percentage of proliferating cells sorted by levels. Bars represent means  $\pm$  SEM. One asterisk indicates  $P < 0.05$ ; two indicate  $P < 0.01$  for statistically significant differences (Student's *t*-test). SVZ, subventricular zone; RMS, rostral migratory stream; RMS-OB, extension of the rostral migratory stream in the olfactory bulb.

and they did not exhibit bipolar processes, characteristic of migrating neuroblasts (Nam et al., 2007). In addition, no differences in the number of these GFP-positive cells were observed between the P60 and P150 transplanted mice.

According to these observations, bone marrow-derived cells reached the brain but they did not integrate in neurogenic regions.

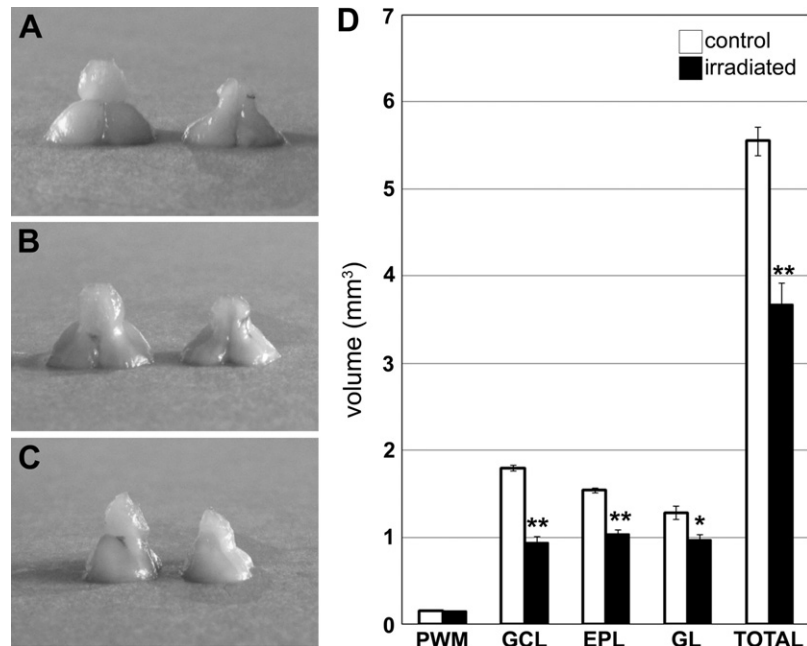
## DISCUSSION

In light of our results, it may be concluded that ionizing radiation can severely affect well-defined brain structures such as the OB by means of an impairment of its cell turnover mechanism. This turnover of interneurons was disrupted, and hence these cells died without being

replaced. The loss of neural elements generated a decrease in the volume of the OB and alterations in its layering. A minimum lethal irradiation was strong enough to induce a dramatic increase in cell death—mainly of proliferating cells—accompanied by a reactive gliosis in all the proliferating regions of the rostral neurogenic pathway. The subsequent marked decrease in cell proliferation was not recovered over time either by endogenous cell proliferation or by repopulation derived from the grafted BMSC.

### Irradiation with 7.5 Gy is the minimal lethal irradiation for mice

Several studies have demonstrated a dose-dependent effect of the damage due to ionizing radiation in the



**Fig. 7.** Macroscopic images of the rostral region of P300 mouse brains. On the left, control mice; on the right, irradiated mice in dorsal (A), ventral (B) and lateral (C) views. (D) Chart showing the estimation of the volume of the OB and its layers in control and irradiated animals. PWM, peripendymal white matter; GCL, granule cell layer; EPL, external plexiform layer; GL, glomerular layer. Bars represent mean  $\pm$  SEM. One asterisk indicates  $P < 0.05$ ; two indicate  $P < 0.01$  for statistically significant differences (Student's *t*-test).

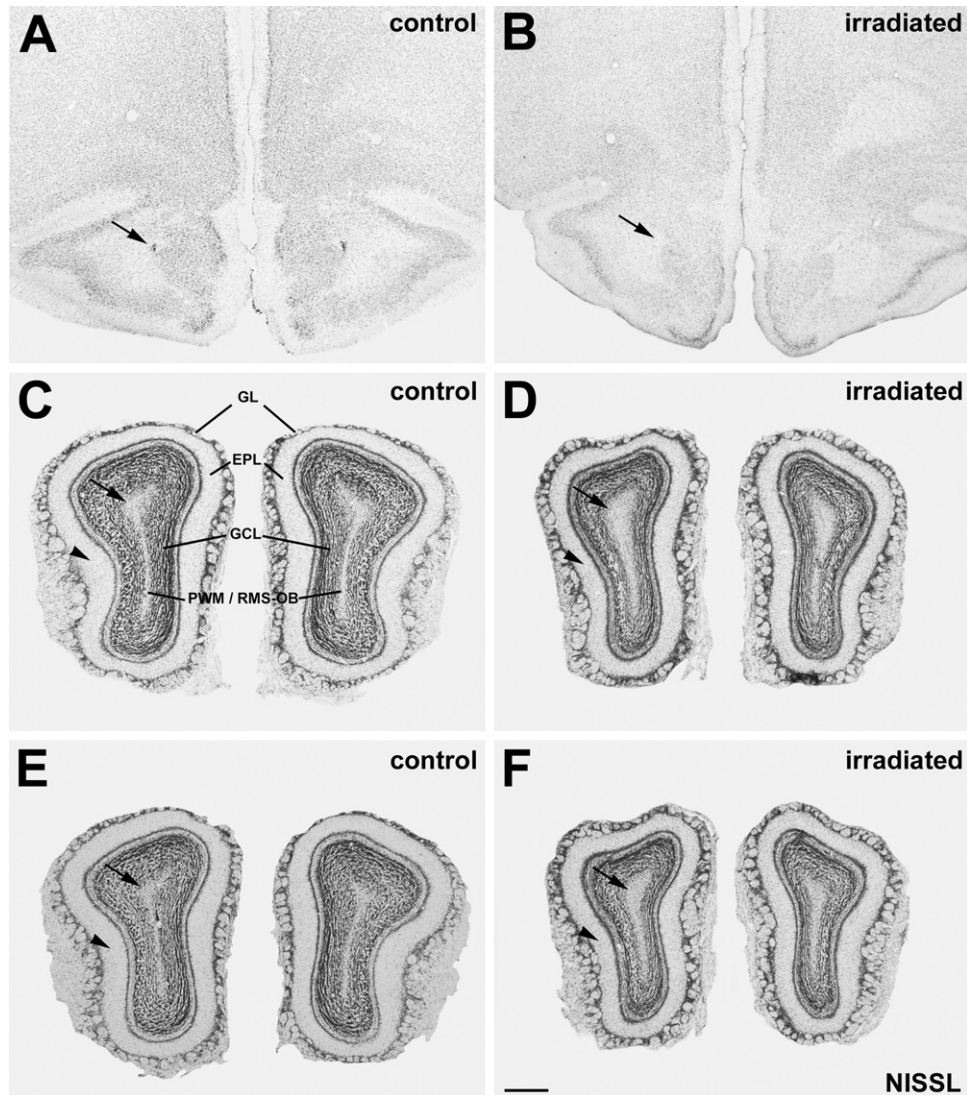
brain (Shinohara et al., 1997; Tada et al., 1999; Mizumatsu et al., 2003; Rola et al., 2004; McGinn et al., 2008). However, in those works very broad radiation ranges were studied: 2–10 Gy (Rola et al., 2004), 5–15 Gy (McGinn et al., 2008), 2–15 Gy (Tada et al., 1999) or even 3–30 Gy (Shinohara et al., 1997) and, in addition, no specific criteria were described to justify the choice of those radiation ranges. In the present work a range of radiation between 6.5 and 10 Gy was tested, with values lying within those previously described in cell transplant studies (Stewart and Przyborski, 2002; Álvarez-Dolado et al., 2003; Weimann et al., 2003; Massengale et al., 2005; Moore et al., 2005; Magrassi et al., 2007), to find the minimal lethal dose of radiation that would allow BMSC transplantation. Doses lower than 6.5 were considered too weak to ablate the bone marrow and injure the SVZ-RMS-OB pathway, even causing increases in cell proliferation (Tada et al., 1999; Balentova et al., 2006, 2007). Our results demonstrated that a dose of 6.5 Gy was insufficient to ablate the bone marrow of the host animals, allowing their survival and the recovery of a normal number of BMSC. All the animals irradiated with doses between 7.5 and 10 Gy died if they were not transplanted with new BMSC. Thus, the dose of 7.5 Gy was chosen as the minimal lethal dose.

The transplants guaranteed the survival of irradiated mice, with a progressive enrichment of peripheral blood in GFP-positive cells, signaling complete substitution of the host hematopoietic system by a new GFP-positive one, due to the “homing effect” (Whetton and Graham, 1999; Fuchs et al., 2004).

#### Apoptotic cell death is increased by irradiation and is displaced towards the OB

The damage produced by radiation in proliferating cells is dependent on their proliferation rate (Romanko et al., 2004a,b; Hellström et al., 2009), cells that divide faster being more susceptible. Therefore, the transit-amplifying neurogenic precursors (type C cells) would be those most severely affected by radiation since their proliferation rate is the highest, followed by neuroblasts (type A cells) and the stem cells of the SVZ (type B2 cells; Doetsch et al., 1997, 2002; García-Verdugo et al., 1998; Hellström et al., 2009). Therefore, the highest apoptotic cell density should be found in the SVZ, diminishing towards the OB. However, the results obtained with the TUNEL technique revealed that irradiation caused apoptotic cell death in the regions of study, with a progressive increase in the number of apoptotic cells from the SVZ to the OB. Our experiments also revealed a patent reactive gliosis throughout the RMS and RMS-OB regions, whereas it was almost absent in the SVZ. Thus, this gliosis appeared displaced to the rostralmost regions, as did the apoptotic events. There is a close relationship between apoptosis and glial activation since damaged neuronal cells may induce a rapid reactive gliosis (Garden and Moller, 2006; Milligan and Watkins, 2009). Following irradiation, differences in apoptosis can be detected 3 h after exposure and these differences reach a maximum at 6 h (Shinohara et al., 1997). 24 hours after irradiation, the rate of apoptosis decreases but is still detectable (Shinohara et al., 1997). By contrast, the response of glial cells to neural injury is





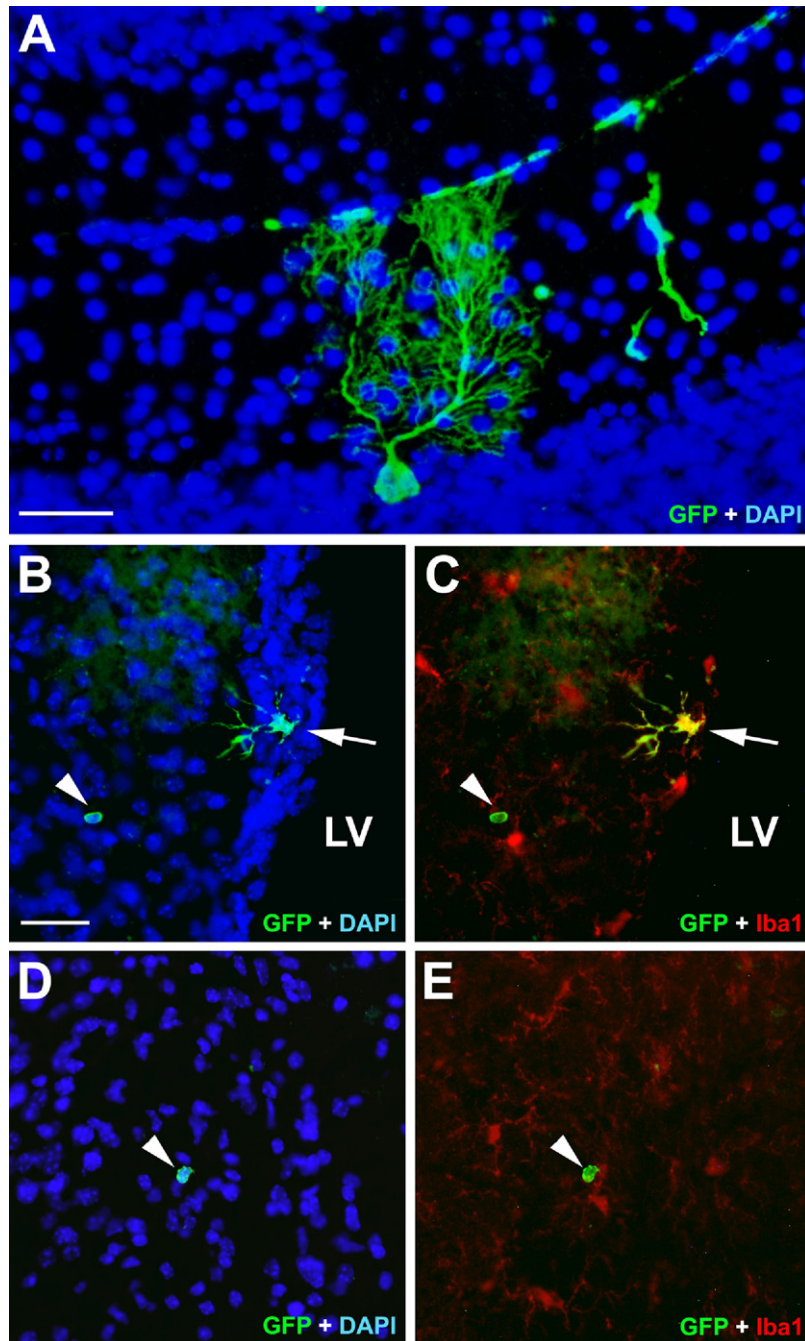
**Fig. 8.** Sections from P300 mice stained with thionine (Nissl). Images of the RMS and OB levels. Note the disappearance of the RMS in the irradiated mice in comparison with the controls (A, B arrows). An expansion of the PWM (C–F arrows) to the detriment of the granule cell layer can be seen. A decrease in the volume of the EPL (arrowheads) can also be observed. EPL, external plexiform layer; GCL, granule cell layer; RMS-OB, extent of the rostral migratory stream into the olfactory bulb; PWM, periepndymal white matter. Scale bar=200  $\mu\text{m}$ .

extremely fast (Garden and Moller, 2006; Milligan and Watkins, 2009), indirectly indicating where neural cells have died recently. Accordingly, a substantial fraction of the apoptotic cells detected could correspond to cells that died not at the moment of irradiation but later. Neuroblasts are migrating cells that continue to divide in their trajectory towards the OB (Lois and Álvarez-Buylla, 1994; Lois et al., 1996; Carleton et al., 2003), and therefore they may be affected by radiation, although not as severely as type C cells (Romanko et al., 2004a,b; Hellström et al., 2009). Thus, these injured cells could continue their migration along the RMS, but in a subsequent phase in which they stop to divide (Lois and Álvarez-Buylla, 1994; Peretto et al., 1999) they die as a consequence of the damage they have undergone owing to the radiation treatment, since radiation can induce not only acute but also delayed cell toxicity and death

(Haydout et al., 2007). Therefore, an accumulation of apoptotic cells in the rostral-most regions would exist, coinciding with the distribution of the reactive glia.

#### **Irradiation with 7.5 Gy affects the morphology and proliferation of neurogenic regions, with no recovery over time**

Regarding the direct effects of radiation, our studies demonstrate the existence of morphological changes in the regions analyzed. The changes observed in the SVZ are in agreement with previous data (McGinn et al., 2008), but we also detected damage throughout the RMS at 24 h after irradiation, and especially at longer survival times. This region, characterized by densely packed cells (Lois and Álvarez-Buylla, 1994; Lois et al., 1996; Doetsch et al., 1997; Peretto et al., 1997; Carleton et al., 2003), is readily



**Fig. 9.** Microphotographs of bone marrow-derived GFP cells in the brain of transplanted mice (green). Purkinje cells in the cerebellum derived from the BMSC transplant were detected as a control of the engraftment efficacy (A). GFP-positive microglial cells, also positive for Iba1 immunostaining (red), were the predominant cell type (B, C arrows). Some GFP-positive but Iba1-negative cells (arrowheads) were detected in different regions, including the RMS (D, E). Cell nuclei are counterstained with DAPI (blue). LV, lateral ventricle. For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.

distinguishable in tissue sections. However, in the irradiated mice it was difficult to identify the boundaries of the RMS, especially at the ages of P150 and P300, owing to the reduction in neuroblast density.

Our results reveal a marked decrease in cell proliferation 24 h after exposure to radiation throughout the complete SVZ-RMS-OB pathway. They also demonstrated that

the reduction in the percentage of proliferating cells observed at P20 was still present in the animals sacrificed at P60 and P150, with no statistical differences among the three ages; therefore, the SVZ-RMS-OB pathway remains injured and no recovery occurs over time. Previous studies have reported an initial decrease in cell proliferation in the SVZ after irradiation followed by an increase, suggesting



an attempt to restore the proliferating regions (Shinohara et al., 1997; Tada et al., 1999). Nevertheless, this increase was delayed (depending on the dose applied) and temporary, the proliferation rate thereafter falling again (Tada et al., 1999). In the same study, no variations in the morphology of the RMS or the OB were described either. However, that work only addressed the study of the SVZ, and the RMS pathway was not analyzed in detail. In fact, the authors did not specify the doses chosen in the RMS analysis and hence, their results would match the use of a low dose. Hellström et al. (2009) reported a partial recovery of cell proliferation in the SVZ but not in the DG of the hippocampal formation. The authors explained this difference in terms of the cellular composition of both structures: the SVZ has more “true” stem cells than the DG, and since stem cells are less vulnerable than neural progenitor cells to different injuries, including radiation (Romanko et al., 2004a,b), the SVZ would have a better ability to recover after a moderate degree of injury. The animals of that study were irradiated with a dose of 6 Gy (Hellström et al., 2009). Our results show that a dose of 6.5 Gy is not enough to ablate the bone marrow and then destroy the BMSC and possibly other stem cells such as neural cells. A dose of 7.5 Gy would damage the “true” stem cell population of the SVZ severely and would be strong enough to prevent the recovery of the SVZ-RMS-OB pathway. Other studies focused on the RMS have reported an increase in cell proliferation in this region after irradiation (Balentova et al., 2006, 2007). Nevertheless, this difference could be explained in terms of the low doses of radiation employed in those studies (3 Gy), which was insufficient to induce permanent damage.

Finally, only in two of the five rostrocaudal levels were no differences detected between the experimental groups (RMS II at P60 and the RMS-OB at P150; Fig. 6D, F). The changes in morphology and cell density observed in the regions of the irradiated mice analyzed could explain this particular lack of differences. The proliferation rate was calculated by referring the number of proliferating cells to the total number of cells. Their irradiation decreased both the number of proliferating cells and the total number of cells in the regions of study and, therefore, the ratio of proliferating cells in fewer total cells could afford similar percentage values to those found for the control animals. In addition, previous studies have demonstrated a progressive age-related physiological decrease in cell proliferation (Tropepe et al., 1997). Thus, both phenomena could blur the differences in proliferation between the irradiated and control animals and, in some regions where the variations between the experimental groups were not so dramatic, the general differences were not apparent.

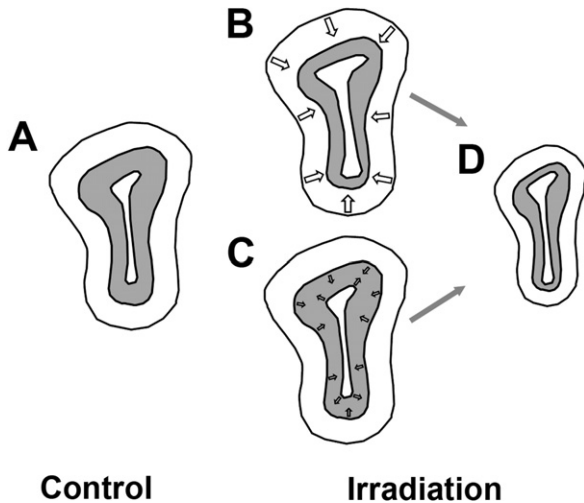
#### **Bone marrow-derived cells reach the brain but have no effects on the damaged regions**

GFP-positive cells (hence derived from the new bone marrow) reached the encephalon of the transplanted mice, in agreement with previous results (Priller et al., 2001; Corti et al., 2002; Álvarez-Dolado et al., 2003; Weimann et al., 2003; Johansson et al., 2008; Recio et al., in press). How-

ever, no GFP-positive cells with the features of astrocytes or neuroblasts were found in the damaged neurogenic regions, microglia and small, round GFP-positive and Iba-1-negative cells being the only cell types detected there. The latter were possibly non-neuronal hematopoietic-like cells (Massengale et al., 2005; Moore et al., 2005). In addition, no clear differences in the number of these cells were found in the neurogenic regions along the different survival times, and neither did the damaged proliferating regions recover. Taking these data into account, bone marrow-derived cells did not help towards a recovery of the neurogenic regions analyzed.

#### **Irradiation with 7.5 Gy severely reduces the OB volume**

The dramatic shrinkage of the OB and the morphological changes in its lamination observed at P300 demonstrated the final consequence of the damage produced by irradiation: the pathway of proliferation and migration remained injured and hence too few neuroblasts were able to reach the different layers of the OB to replace the interneurons, with the subsequent decrease in the volume of this structure. A recent study has demonstrated that a radiation dose of 15 Gy significantly reduces the rostral neurogenesis affecting OB layers (Lazarini et al., 2009). In agreement with our results, no recovery in neurogenesis over time was detected in that study, but no variation in the volume of the OB layers was observed, probably because the maximum survival time employed (131 days) was not long enough (Lazarini et al., 2009). Our results demonstrate changes in the GCL, the EPL and the GL, the final fate of the migrating neuroblasts (Lois and Álvarez-Buylla, 1994; Petreanu and Álvarez-Buylla, 2002; Carleton et al., 2003), but not in the PWM. New neuroblasts are mainly incorporated into the GCL (Valero et al., 2007), this being the most severely affected layer of the OB. The EPL is characterized by a low cell density and a large amount of neuropil, the dendrites of the granule cells being its main component (Shepherd, 1972; Kratskin and Belluzzi, 2003). Thus, the volume reduction of the EPL could be induced not only by the decrease in cell turnover in this layer (Lazarini et al., 2009) but also by the loss of granule cells, and consequently their dendrites. The PWM is the most internal layer of the OB reached by the RMS-OB (Lois and Álvarez-Buylla, 1994; Lois et al., 1996; Carleton et al., 2003). Afferent and efferent OB fibers travel through this layer, connecting the OB with the brain (Price and Sprich, 1975; Willey et al., 1983). The cell loss and shrinkage of the GCL could expose more of these fibers, increasing the extent of the white matter. Nevertheless, the general decrease of the OB led to volume compensation in this layer, which finally appeared without alterations (Fig. 10). In addition, granule cells do not send any neurites to the PWM, since they have no axon (Shepherd, 1972; Kratskin and Belluzzi, 2003). Thus, the loss of these would not further reduce the volume of the PWM. Moreover, it has been demonstrated that the loss of OB neurons with dendrites and an axon—such as mitral cells—affects the more external OB layers but not the internal ones, because axon



**Fig. 10.** Scheme of the decrease in OB layers. (A) is the OB of a control animal. Irradiation causes shrinkage of the GCL (B) that unveils fibres of the PWM, increasing its area (C). By contrast, the general decrease in the OB (D) compensates the enlargement of the PWM, which shows no differences with the PWM of a non-irradiated OB (A, D).

size is not significant in comparison with that of the soma or the dendritic tree (Valero et al., 2007). Finally, it has been described that radiation can also affect the cell replacement of the GL (Lazarini et al., 2009). Our results revealed a volume decrease in this layer, but to a lesser extent than in the GCL or the EPL. Fewer neuroblasts reach the GL than the GCL (Valero et al., 2007), and therefore the volume of this layer is less affected by the impairment of cell turnover (Lazarini et al., 2009).

## CONCLUSION

Interneuron turnover in the OB is necessary for the appropriate volume and structure to be maintained. Ionizing radiation seems to affect this turnover to a considerable extent and thus has more extensive and long-lasting effects in neurogenic brain regions than previously reported. Interestingly, the minimal lethal irradiation dose of 7.5 Gy affected not only proliferating cell populations but also other established neural systems, and the radiation doses employed in different lines of investigation are usually far above that dose. Taking these data into account, in future research the dose of radiation should be chosen carefully in order to avoid unexpected injuries that could lead to artificial results. This issue is especially important when radiation is employed to perform BMSC transplants, since bone marrow-derived cells do not repair injuries in neurogenic regions. Future research will clarify whether radiation should be substituted by other ablative procedures and whether the use of adjuvant strategies might complement BMSC engraftments to develop a more functional cell therapy.

**Acknowledgments**—The authors express their gratitude to A. Prieto for technical assistance with the flow cytometry, and the staff of the irradiation service from the Animal Facilities of the Univer-

sity of Salamanca. Our work has been supported by the Ministerio de Ciencia y Tecnología (BFU2010-18284), the Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad (Plan Nacional Sobre Drogas), the Junta de Castilla y León, the Centre for Regenerative Medicine and Cell Therapy of Castilla y León and Fundación “Samuel Solórzano Barruso”.

## REFERENCES

- 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.
- Altman J, Das GD (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124:319–335.
- 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 JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, Lois C, Morrison SJ, Álvarez-Buylla A (2003) Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 425:968–973.
- Bae JS, Furuya S, Shinoda Y, Endo S, Schuchman EH, Hirabayashi Y, Jin HK (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.
- Balentova S, Racekova E, Martoncikova M, Misurova E (2006) Cell proliferation in the adult rat rostral migratory stream following exposure to gamma irradiation. *Cell Mol Neurobiol* 26:1131–1139.
- Balentova S, Racekova E, Misurova E (2007) Effect of low-dose irradiation on proliferation dynamics in the rostral migratory stream of adult rats. *Folia Biol (Praha)* 53:74–78.
- Baltanás FC, Weruaga E, Airado C, Valero J, Recio JS, Díaz D, Alonso JR (2007) Chemical heterogeneity of the periglomerular neurons in the olfactory bulb. A review. *Eur J Anat* 11:123–147.
- Bittner RE, Schofer C, Weipoltshammer K, Ivanova S, Streubel B, Hauser E, Freiling M, Hoger H, Elbe-Burger A, 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.
- Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM (2001) The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell* 105:829–841.
- Bonfanti L, Peretto P, Merighi A, Fasolo A (1997) Newly-generated cells from the rostral migratory stream in the accessory olfactory bulb of the adult rat. *Neuroscience* 81:489–502.
- Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM (2000) From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 290:1775–1779.
- Carleton A, Petreanu LT, Lansford R, Álvarez-Buylla A, Lledo PM (2003) Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nat Neurosci* 6:507–518.
- Charriaut-Marlangue C, Margail I, Represa A, Popovici T, Plotkine M, Ben Ari Y (1996) Apoptosis and necrosis after reversible focal ischemia: an *in situ* DNA fragmentation analysis. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:186–194.
- Corti S, Locatelli F, Strazzer S, Salani S, Del Bo R, Soligo D, Bossolasco P, Bresolin N, Scarlato G, Comi GP (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.
- Díaz D, Valero J, Airado C, Baltanás FC, Weruaga E, Alonso JR (2009) Sexual dimorphic stages affect both proliferation and serotonergic innervation in the adult rostral migratory stream. *Exp Neurol* 216:357–364.
- Doetsch F (2003) A niche for adult neural stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 13(5):543–550.

- Doetsch F, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A (1997) Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17: 5046–5061.
- Doetsch F, Petreanu L, Caille I, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A (2002) EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* 36:1021–1034.
- Dover R, Patel K (1994) Improved methodology for detecting bromodeoxyuridine in cultured cells and tissue sections by immunocytochemistry. *Histochemistry* 102:383–387.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Björk E, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4:1313–1317.
- Frielingdorf H, Schwarz K, Brundin P, Mohapel P (2004) No evidence for new dopaminergic neurons in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10177–10182.
- Fuchs E, Tumber T, Guasch G (2004) Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 116:769–778.
- García-Verdugo JM, Doetsch F, Wichterle H, Lim DA, Álvarez-Buylla A (1998) Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells. *J Neurobiol* 36:234–248.
- Garden GA, Moller T (2006) Microglia biology in health and disease. *J Neuroimmune Pharmacol* 1:127–137.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben Sasson SA (1992) Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119:493–501.
- Goings GE, Sahni V, Szele FG (2004) Migration patterns of subventricular zone cells in adult mice change after cerebral cortex injury. *Brain Res* 996:213–226.
- González-Granero S, Capilla V, Lezameta M, García-Verdugo JM (2006) Aspectos comparados de la neurogénesis y migración tangencial al bulbo olfatorio. In: *La olfacción en España* (Alonso JR, de Castro F, López-Mascaraque L, eds), pp 155–170. Salamanca, Spain: SBI.
- Gould E, Tanapat P (1997) Lesion-induced proliferation of neuronal progenitors in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 80:427–436.
- Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, Kunkel LM, Mulligan RC (1999) Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401:390–439.
- Hadjantonakis AK, Gertsenstein M, Ikawa M, Okabe M, Nagy A (1998) Generating green fluorescent mice by germline transmission of green fluorescent ES cells. *Mech Dev* 76:79–90.
- Haydont V, Gilliot O, Rivera S, Bourcier C, Francois A, Aigueperse J, Bourhis J, Vozenin-Brotos MC (2007) Successful mitigation of delayed intestinal radiation injury using pravastatin is not associated with acute injury improvement or tumor protection. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 68:1471–1482.
- He J, Crews FT (2007) Neurogenesis decreases during brain maturation from adolescence to adulthood. *Pharmacol Biochem Behav* 86:327–333.
- Hellström NA, Björk-Eriksson T, Blomgren K, Kuhn HG (2009) Differential recovery of neural stem cells in the subventricular zone and dentate gyrus after ionizing radiation. *Stem Cells* 27:634–641.
- Hof PR, Young WG, Bloom FE, Belichenko PV, Celio MR (2000) Comparative cytoarchitectonic atlas of the C57BL/6 and 129/Sv mouse brains. Amsterdam: Elsevier.
- Imayoshi I, Sakamoto M, Ohtsuka T, Takao K, Miyakawa T, Yamaguchi M, Mori K, Ikeda T, Itohara S, Kageyama R (2008) Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nat Neurosci* 11:1153–1161.
- Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA (2001) Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 107:1395–1402.
- Jin K, Minami M, Lan JQ, Mao XO, Betteur S, Simon RP, Greenberg DA (2001) Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:4710–4715.
- Johansson CB, Youssef S, Koleckar K, Holbrook C, Doyonnas R, Corbel SY, Steinman L, Rossi FM, Blau HM (2008) Extensive fusion of haematopoietic cells with Purkinje neurons in response to chronic inflammation. *Nat Cell Biol* 10:575–583.
- Kratskin IL, Belluzzi O (2003) Anatomy and neurochemistry of the olfactory bulb. In: *Handbook of olfaction and gustation* (Doty RL, ed), pp 139–164. New York, NY: Marcel Dekker.
- Lazarini F, Mouthon MA, Gheusi G, de Chaumont F, Olivo-Marin JC, Lamarque S, Abrous DN, Boussin FD, Lledo PM (2009) Cellular and behavioral effects of cranial irradiation of the subventricular zone in adult mice. *PLoS One* 4:e7017.
- Lois C, Alvarez-Buylla A (1993) Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2074–2077.
- Lois C, Álvarez-Buylla A (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264:1145–1148.
- Lois C, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A (1996) Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271:978–981.
- Magrassi L, Grimaldi P, Ibatci A, Corselli M, Ciardelli L, Castello S, Podesta M, Frassoni F, Rossi F (2007) Induction and survival of binucleated Purkinje neurons by selective damage and aging. *J Neurosci* 27:9885–9892.
- Manda K, Ueno M, Anzai K (2009) Cranial irradiation-induced inhibition of neurogenesis in hippocampal dentate gyrus of adult mice: attenuation by melatonin pretreatment. *J Pineal Res* 46:71–78.
- Martonicikova M, Racekova E, Orendacova J (2006) The number of proliferating cells in the rostral migratory stream of rat during the first postnatal month. *Cell Mol Neurobiol* 26:1451–1459.
- Massengale M, Wagers AJ, Vogel H, Weissman IL (2005) Hematopoietic cells maintain hematopoietic fates upon entering the brain. *J Exp Med* 201:1579–1589.
- McGinn MJ, Sun D, Colello RJ (2008) Utilizing X-irradiation to selectively eliminate neural stem/progenitor cells from neurogenic regions of the mammalian brain. *J Neurosci Methods* 170:9–15.
- Mezey E (2005) Bone marrow and brain: unexpected allies or accidental acquaintances? *Stem Cell Rev* 1:15–19.
- Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKeircher SR (2000) Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated *in vivo* from bone marrow. *Science* 290:1779–1782.
- Milligan ED, Watkins LR (2009) Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 10:23–36.
- Mizumatsu S, Monje ML, Morhardt DR, Rola R, Palmer TD, Fike JR (2003) Extreme sensitivity of adult neurogenesis to low doses of X-irradiation. *Cancer Res* 63:4021–4027.
- Monje ML, Mizumatsu S, Fike JR, Palmer TD (2002) Irradiation induces neural precursor-cell dysfunction. *Nat Med* 8:955–962.
- Monje ML, Palmer T (2003) Radiation injury and neurogenesis. *Curr Opin Neurol* 16:129–134.
- Moore BE, Colvin GA, Dooner MS, Quesenberry PJ (2005) Lineage-negative bone marrow cells travel bidirectionally in the olfactory migratory stream but maintain hematopoietic phenotype. *J Cell Physiol* 202:147–152.
- Mouret A, Lepousez G, Gras J, Gabellec MM, Lledo PM (2009) Turnover of newborn olfactory bulb neurons optimizes olfaction. *J Neurosci* 29:12302–12314.
- Murias AR, Weruaga E, Recio JS, Airado C, Díaz D, Alonso JR (2007) Distribution of neurocalcin-containing neurons reveals sexual dimorphism in the mouse olfactory bulb. *Chem Senses* 32:673–680.
- Nam SC, Kim Y, Dryanovski D, Walker A, Goings G, Woolfrey K, Kang SS, Chu C, Chenn A, Erdelyi F, Szabo G, Hockberger P, Szele FG (2007) Dynamic features of postnatal subventricular zone cell motility: a two-photon time-lapse study. *J Comp Neurol* 505: 190–208.
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P (2001) Mobilized



- bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10344–10349.
- Peretto P, Merighi A, Fasolo A, Bonfanti L (1997) Glial tubes in the rostral migratory stream of the adult rat. *Brain Res Bull* 42:9–21.
- Peretto P, Merighi A, Fasolo A, Bonfanti L (1999) The subependymal layer in rodents: a site of structural plasticity and cell migration in the adult mammalian brain. *Brain Res Bull* 49:221–243.
- Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP (1999) Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284:1168–1170.
- Petreanu L, Álvarez-Buylla A (2002) Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *J Neurosci* 22:6106–6113.
- Price JL, Sprich WW (1975) Observations on the lateral olfactory tract of the rat. *J Comp Neurol* 162:321–336.
- Priller J, Flugel A, Wehner T, Boentert M, Haas CA, Prinz M, Fernandez-Klett F, Prass K, Bechmann I, de Boer BA, Frotscher M, Kreutzberg GW, Persons DA, Dirnagl U (2001) Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nat Med* 7:1356–1361.
- Recio JS, Álvarez-Dolado M, Díaz D, Baltanás FC, Piquer M, Alonso JR, Weruaga E (in press) Bone marrow contributes simultaneously to different neural types in the central nervous system by different mechanisms of plasticity. *Cell Transplant*, in press.
- Rola R, Raber J, Rizk A, Otsuka S, Vandenberg SR, Morhardt DR, Fike JR (2004) Radiation-induced impairment of hippocampal neurogenesis is associated with cognitive deficits in young mice. *Exp Neurol* 188:316–330.
- Romanko MJ, Rola R, Fike JR, Szele FG, Dizon ML, Felling RJ, Brazel CY, Levison SW (2004a) Roles of the mammalian subventricular zone in cell replacement after brain injury. *Prog Neurobiol* 74:77–99.
- Romanko MJ, Rothstein RP, Levison SW (2004b) Neural stem cells in the subventricular zone are resilient to hypoxia/ischemia whereas progenitors are vulnerable. *J Cereb Blood Flow Metab* 24:814–825.
- Sairanen T, Karjalainen-Lindsberg ML, Paetau A, Ijas P, Lindsberg PJ (2006) Apoptosis dominant in the periinfarct area of human ischaemic stroke—a possible target of antiapoptotic treatments. *Brain* 129:189–199.
- Shepherd GM (1972) Synaptic organization of the mammalian olfactory bulb. *Physiol Rev* 52:864–917.
- Shi SR, Key ME, Kalra KL (1991) Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 39:741–748.
- Shinohara C, Gobbel GT, Lamborn KR, Tada E, Fike JR (1997) Apoptosis in the subependyma of young adult rats after single and fractionated doses of X-rays. *Cancer Res* 57:2694–2702.
- Stewart R, Przyborski S (2002) Non-neural adult stem cells: tools for brain repair? *Bioessays* 24:708–713.
- Strother DR, Pollack IF, Gisher PG, Hunter JV, Woo SY, Pomeroy SL, Rorke LB (2002) Tumors of the central nervous system. In: Principles and practice of pediatric oncology, 4th ed. (Pizzo PA, Poplack DG, eds), pp 751–824. Philadelphia, PA: Lipincott Williams and Wilkins.
- Sundholm-Peters NL, Yang HK, Goings GE, Walker AS, Szele FG (2005) Subventricular zone neuroblasts emigrate toward cortical lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:1089–1100.
- Tada E, Yang C, Gobbel GT, Lamborn KR, Fike JR (1999) Long-term impairment of subependymal repopulation following damage by ionizing irradiation. *Exp Neurol* 160:66–77.
- Takagi Y, Nozaki K, Takahashi J, Yodoi J, Ishikawa M, Hashimoto N (1999) Proliferation of neuronal precursor cells in the dentate gyrus is accelerated after transient forebrain ischemia in mice. *Brain Res* 831:283–287.
- Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, Krause DS (2000a) Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 31:235–240.
- Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS (2000b) Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 32:11–16.
- Tropepe V, Craig CG, Morshead CM, van der Kooy D (1997) Transforming growth factor-alpha null and senescent mice show decreased neural progenitor cell proliferation in the forebrain subependyma. *J Neurosci* 17:7850–7859.
- Valero J, Weruaga E, Murias AR, Recio JS, Alonso JR (2005) Proliferation markers in the adult rodent brain: bromodeoxyuridine and proliferating cell nuclear antigen. *Brain Res Brain Res Protoc* 15:127–134.
- Valero J, Weruaga E, Murias AR, Recio JS, Curto GG, Gómez C, Alonso JR (2007) Changes in cell migration and survival in the olfactory bulb of the pcd/pcd mouse. *Dev Neurobiol* 67:839–859.
- van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH (2002) Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415:1030–1034.
- Weimann JM, Johansson CB, Trejo A, Blau HM (2003) Stable reprogrammed heterokaryons form spontaneously in Purkinje neurons after bone marrow transplant. *Nat Cell Biol* 5:959–966.
- Weruaga E, Briñón JG, Barbado V, Aijón J, Alonso JR (1999) A standardized model for the anatomical division of the rodent olfactory bulb. *Eur J Anat* 3:27–34.
- Weruaga-Prieto E, Egli P, Celio MR (1996) Rat brain oligodendrocytes do not interact selectively with axons expressing different calcium-binding proteins. *Glia* 16:117–128.
- Whetton AD, Graham GJ (1999) Homing and mobilization in the stem cell niche. *Trends Cell Biol* 9:233–238.
- Wiley TJ, Maeda G, Schultz RL, Seibly WS, Horowitz JM (1983) The principal projection pathway between the olfactory bulb and the prepyriform cortex in the cat. *J Neurosci Res* 9:253–277.
- Zhao M, Momma S, Delfani K, Carlen M, Cassidy RM, Johansson CB, Brismar H, Shupliakov O, Frisen J, Janson AM (2003) Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7925–7930.

CT-0066 Accepted 11/22/2010 for publication in "Cell Transplantation"

**Bone marrow contributes simultaneously to different neural types in the central nervous system through different mechanisms of plasticity**

**Authors and affiliations:**

\*Javier S. Recio<sup>1</sup>, \*Manuel Álvarez-Dolado<sup>2</sup>, David Díaz<sup>1</sup>, Fernando C. Baltanás<sup>1</sup>, Marina Piquer-Gil<sup>2</sup>, José R. Alonso<sup>1,3</sup>, Eduardo Weruaga<sup>1</sup>

\*(J.S. Recio and M. Álvarez-Dolado have contributed equally to this article)

<sup>1</sup> Laboratory of Neuronal Plasticity and Neurorepair. Institute for Neuroscience of Castilla y León. University of Salamanca. Salamanca. E-37007. Spain.

<sup>2</sup> Laboratory of Cell Therapy for Neuropathologies. Andalucian Center for Molecular Biology and Regenerative Medicine. CABIMER, Seville. E-41092. Spain.

<sup>3</sup> Universidad de Tarapacá en Arica. Arica. Chile.

**Corresponding author:**

Eduardo Weruaga, Ph.D., Ph.D.

Laboratorio de Plasticidad Neuronal y Neuroreparación. Instituto de Neurociencias de Castilla y León. Universidad de Salamanca. C/ Pintor Fernando Gallego, nº 1. E-37007. Salamanca. Spain.

E-mail: [ewp@usal.es](mailto:ewp@usal.es);

Phone: +34-923-294500; ext. 5324; Fax: +34-923294549

**Running head:**

Different ways of bone marrow contribution to the CNS

## ABSTRACT

Many studies have reported the contribution of bone marrow-derived cells (BMDC) to the CNS, raising the possibility of using them as a new source to repair damaged brain tissue or restore neuronal function. This process has mainly been investigated in the cerebellum, in which a degenerative microenvironment has been suggested to be responsible for its modulation. The present study further analyzes the contribution of BMDC to different neural types in other adult brain areas, under both physiological and neurodegenerative conditions, together with the mechanisms of plasticity involved.

We grafted genetically marked *Green Fluorescent Protein/Cre* bone marrow in irradiated recipients: a) The PCD (*Purkinje Cell Degeneration*) mutant mice, suffering a degeneration of specific neuronal populations at different ages, and b) their corresponding healthy controls. These mice carried the conditional *lacZ* reporter gene to allow the identification of cell fusion events.

Our results demonstrate that BMDC mainly generate microglial cells, although to a lesser extent a clear formation of neuronal types also exists. This neuronal recruitment was not increased by the neurodegenerative processes occurring in PCD mice, where BMDC did not contribute to rescuing the degenerated neuronal populations either. However, an increase in the number of bone marrow-derived microglia was found along lifespan in both experimental groups. Six weeks after transplantation more bone marrow-derived microglial cells were observed in the olfactory bulb of the PCD mice as compared to the control animals, where the degeneration of mitral cells was in process. In contrast, this difference was not observed in the cerebellum, where Purkinje cell degeneration had been completed.

These findings demonstrated that the degree of neurodegenerative environment can foster the recruitment of neural elements derived from bone marrow, but also provide the first evidence that BMDC can contribute simultaneously to different encephalic

areas through different mechanisms of plasticity: cell fusion for Purkinje cells and differentiation for olfactory bulb interneurons.

**KEY WORDS:**

Bone marrow transplantation, cell fusion, neural repair, neurodegeneration, neural differentiation.

**INTRODUCTION**

In recent years, it has been shown that bone marrow-derived cells (BMDC) owe their plasticity to changes in their fate, which allows their contribution to different cell populations in diverse organs (7,19,22,26,40,41,48), including the central nervous system (CNS; 2,8,9,34,54). This surprising capacity has been considered a potential tool for the development of innovative therapeutic strategies to treat degenerative, post-traumatic, and hereditary diseases (3,9). Thus, the contribution of BMDC to diverse tissues has been described under normal and pathological conditions. The contribution rate was always very scarce (2,42), but this low “basal” frequency, described under physiological conditions, was significantly increased when the target organs underwent injury (2,27,34,56), especially when accompanied by inflammation (23,38).

In the CNS, the arrival of BMDC at the brain has mainly been studied in the cerebellum, where they contribute to the Purkinje cell population in animal models (2,43,50,54), and humans (35,53). Similar to other organs, this contribution of BMDC seems to be increased by a neurodegenerative or injured microenvironment (3,30). The underlying mechanism responsible for this process has long been a very controversial issue, and two main possible plasticity mechanisms have been proposed: differentiation (24,40,42) and cell fusion (2,39,47,51,54). They are not mutually exclusive. However, despite this, the lack of studies in which both processes are analyzed together and discerned under exactly the same conditions has reinforced the



controversy. Recent evidence supports the cell-fusion mechanism for the generation of Purkinje cells (23,30,38). However, very little is known about the possible plasticity mechanisms for other neuronal types. Thus, encephalic regions other than the cerebellum require a more extensive review. This is the case of the olfactory bulb (OB), where previous works studying the contribution of BMDC are scarce and have provided confusing or inconsistent data (8,11,32,43). This region is characterized by a continuous recruitment of new neurons along adulthood, which also may influence the behavior, differentiation, and arrival of BMDC. Moreover, no previous studies have been performed in animals suffering from neurodegeneration in the OB, and hence an exhaustive study of the behavior of BMDC after their arrival at this highly plastic encephalic region, in comparison with others, under both healthy and diseased conditions should help us to better understand the contribution of BMDC to the brain.

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

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

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

## **MATERIALS AND METHODS**

**Animals.** Recipients were obtained from the PCD-R26R mouse colony. This colony was established at the Animal Research Facility of the University of Salamanca in two steps. First, in order to be able to genotype the *pcd*<sup>1J</sup> mutation, heterozygous C57BL/6J mice (+/*pcd*) from a colony originally obtained from Jackson Laboratories were mated with wild-type DBA/2J females, establishing the PCD colony. Thus, the *pcd*<sup>1J</sup> allele was associated with the genetic background of the C57BL/6J strain, and the wild type one with the genetic background of the DBA/2J strain. Mice were genotyped by PCR amplification of specific microsatellite sequences that show intraspecific divergences.

Second, in order to obtain wild-type and *pcd/pcd* animals carrying the CRE reporter *lacZ* gene (2,31), *+/pcd* animals (from the PCD colony) were crossed with R26R mice (JAX 003474).

Donors were obtained from the PCD-(CRE-GFP) mouse colony. Homozygous mice expressing CRE recombinase under the control of a hybrid regulatory element of the cytomegalovirus enhancer- $\beta$ -actin promoter (28), and homozygous mice expressing GFP under the same promoter (20) were bred to generate  $\beta$ -actin CRE-GFP mice. Furthermore, to prevent allograft rejection, the mice were crossed with *+/pcd* animals (from the PCD colony), increasing the consanguinity between donors and recipients (Fig. 1). The experiments were carried out in accordance with the guidelines of the European Community Council (86/609/EEC) and current Spanish legislation for the use and care of laboratory animals (RD 1201/2005). The protocols for animal care and manipulation used were approved by the Bioethics Committee of the University of Salamanca.

**Bone marrow transplantation.** Wild-type bone marrow cells were collected from 4-8 week-old donor mice by flushing tibias and femurs with Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM; Invitrogen). Red blood cells were subsequently lysed by 5 min of incubation in ice-cold ammonium chloride (140 mM in Tris 17mM). After a double wash and mild centrifugation,  $7.5 \times 10^6$  bone marrow cells were injected intravenously into the tail vein in both the wild-type and *pcd/pcd* R26R mice. Animals undergoing bone marrow transplantation (BMT) were lethally irradiated to remove their own bone marrow 24 hours before grafting. Owing to their particular characteristics (fairly young – P19– and some of them PCD mutant animals), we previously tested different doses of irradiation (unpublished data) in order to select the minimum lethal dose for these P19 animals (7.5 Gy). Moreover, to ensure the survival of the transplanted PCD mutant mice, we performed whole BMT, without sorting its populations.

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

**Tissue collection.** At P60, P110 and P150, groups of experimental animals were deeply anaesthetized intraperitoneally with a solution composed of ketamine (120 µg/ g body weight [b.w.]) and xylazine (10 µg/ g b.w.) and were perfused through the ascending aorta, first with 0.9% saline for 1 min and then with 50 ml of fixative containing 4% paraformaldehyde (for general immunofluorescence) or 2% paraformaldehyde + 0.25% glutaraldehyde (for X-gal histochemistry) in 0.1 M phosphate buffer (PB). Encephala were dissected out, cut into blocks (rostral – including the OB–, medial and caudal –including the cerebellum–) and immersed in the same fixative solution for 20 min at room temperature (RT). Then, the blocks were rinsed in PB and cryoprotected with 30% sucrose in PB overnight at 4°C. Rostral and caudal blocks were cut in 40-µm coronal or sagittal sections respectively; serial sections were obtained with a freezing microtome and were collected in alternating series. Representative sections were stained with X-gal staining or immunohistochemistry. Medial blocks were frozen and stored at –80 °C for future experiments.

**X-gal staining and immunohistochemistry.** To identify cell-fusion events, sections were processed with X-gal staining by placing them in PB containing 10 mM  $K_3Fe(CN)_6$  and 10 mM  $K_4Fe(CN)_6$  together with the β-gal substrate, 5-bromo-4-chloro-

3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-gal; 1 mg/ml; Molecular Probes), at 37 °C overnight. Then, to characterize the X-gal positive cells, selected sections were processed immunohistochemically with anti-Iba1 antibody (goat [1:500], from Everest Biotech, or rabbit [1:750], from Dako, or anti-GFAP (rabbit [1:2,000], from Sigma), or anti-calbindin (CB; mouse [1:2,000] or rabbit [1:7,000], from Swant), or anti-Reelin (mouse [1:1,000], from Chemicon) in a medium containing 0.2% Triton X-100 (Probus) and 5% normal donkey serum (Vector) in PBS overnight at RT. Biotinylated donkey anti- goat-, rabbit- or mouse-IgG secondary antibodies (1:200) were from Jackson ImmunoResearch, and avidin-biotin-peroxidase complex (Kit Elite ABC; 1:200) was from Vector. The reaction product was visualized by incubating sections in 0.02% 3,3'-diaminobenzidine (DAB) and 0.003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0.1 M Tris-HCl buffer.

**Immunofluorescence.** Double or triple immunofluorescence was used to identify GFP<sup>+</sup> cells, along with other cellular antigens for both neurons (CB and Reelin) and glial cells (GFAP and Iba1). Sections were incubated with 0.2% Triton X-100 and 5% normal serum and were co-stained with anti-GFP antibody (goat [1:2,000] or rabbit [1:4,000], from AbCam) and the above described primary antibodies. Secondary antibodies (Cy-2, Cy-3, Cy-5 conjugated) were used at a dilution 1:500 (from Jackson Immunoresearch). Nuclei were counterstained with DAPI (Gibco-BRL) or PI (Sigma).

**Microscopy analysis.** Processed sections were analyzed for the co-expression of the indicated markers under an Olympus Provis AX70 microscope (UPlanSApo lens up to 60x (N.A. 1.35)) equipped with an Olympus DP70 digital camera. Selected sections were also examined with a confocal microscope (Leica TCS SP spectral confocal microscope; pinhole opening up to 1.5 Airy; Ar/ArKr and He/Ne laser excitation and Planapochromatic objectives up to 63x N.A. 1.4). Digital images were processed with Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems) to adjust contrast slightly and assemble the final plates.

**Cell counting and statistical comparison.** The same animals were used for analyzing both the olfactory bulb and cerebellum. All GFP<sup>+</sup> Purkinje cells and OB interneurons were counted immediately after the observation of all sections, since their numbers were low. However, to compare the quantities of GFP<sup>+</sup> microglial cells anatomically comparable sections were selected. Both the OB and cerebella of PCD mice undergo a dramatic shrinkage (4,14,25,33), which would make the comparison of cell density values unfounded for analyses. Thus, we chose the number of cells per section as the morphometric value for comparisons between experimental groups. For the cerebellum, two purely sagittal sections were chosen (where the 10 cerebellar lobules were clearly seen). Regarding the OB, a central coronal section was chosen for comparisons, as previously described (14,55). Four animals from each experimental group were analyzed. Therefore, these values represent an estimation of the arrival of BMDC to specific regions, without the influence of their shrinkage due to the *pcd*<sup>1J</sup> mutation. GFP<sup>+</sup> cells were counted with the Neurolucida and Neuroexplorer programs (MicroBrightField, Magdeburg, Germany).

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

## RESULTS

In order to analyze the effect of different neurodegenerative stages on the contribution of BMDC to the cerebellum and olfactory bulb, we performed BMT in 20-day-old normal and PCD mice (see Material and Methods section and Fig. 1). At this

age, Purkinje cell degeneration in PCD animals has just started (36), while OB mitral cells are still alive (4,17). After transplantation, the animals were sacrificed at 3 different ages: P60, P110 and P150. At P60 (40 days post-transplantation), Purkinje cells are mostly lost in PCD mutants, whereas mitral cell degeneration has not yet begun. At P110 (90 days post-transplantation), Purkinje cell death had already finished and the neurodegenerative process in the OB was taking place. Finally, at the last age (130 days post-transplantation), both degenerative processes had been already completed.

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

#### **Generation of glial elements from transplanted bone marrow under physiological and neurodegenerative conditions.**

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



and PCD animals along the ages studied, this increase being significantly different at P150 (Table II; Fig. 3). Most of these cells were located peripherally, close to the meninges, but also in perivascular locations of the cerebellum and the OB (Fig. 4). Furthermore, in the transplanted PCD mice, the neurodegenerative environment of the OB at P60, and to a lesser extent at P110, led to significant differences in the contribution of BMDC to the generation of microglial cells in comparison with age-matched transplanted wild-type animals ( $p < 0.01$  at P60; Fig. 3), coinciding with the time window of mitral cells degeneration (18,49).

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

Finally, the possible formation of astrocytes from the BMDC was also analyzed. No GFP<sup>+</sup> cells co-expressing GFAP (considered as a specific marker for astrocyte lineage) were observed in any region studied (including the subventricular zone, SVZ) under any of the experimental conditions tested (data not shown).

### **Contribution of BMDC to neuronal elements under normal conditions**

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

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

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

Finally, contrary to what was seen for the Purkinje cells, none of these newly generated OB cells had two nuclei, strongly suggesting a differentiation mechanism as their possible underlying origin. To check this assumption, we looked for the expression of the *lacZ* reporter gene in the OB of transplanted mice. We did not find any cell fusion event in this region. Moreover, we carefully looked into the SVZ or along the rostral

migratory stream, since these structures support the arrival of new interneurons to the adult OB (14): no positive GFP<sup>+</sup> elements were found neither in wild-type animals nor in the PCD mice. Therefore, all the evidence points to differentiation as the plasticity mechanism involved in the generation of new OB interneurons from BMDC.

### **Contribution of BMDC to neuronal elements under neurodegenerative conditions**

Analysis of the cerebellum and OB regions in transplanted PCD mice allowed the discrimination of: a) the effect of a neurodegenerative environment on the contribution of BMDC to these regions; and b) the effect of the transplantation of healthy BM in the damaged brain. The markers and criteria used to examine these processes were identical to those employed for physiological conditions. No Purkinje cells with markers from donor BMDC were observed in the cerebellum of the transplanted PCD mice, even in the cerebellar vermal lobule X, where the neurodegenerative process starts later (25; our own observation). This result was similar for the three different neurodegenerative stages studied and indicates that the PCD neurodegenerative process did not modify the arrival or plasticity of the BMDC. These data contrast with findings published previously (3,23,30), in which the ability of BMDC to fuse with this neuronal population was reported to be increased after the Purkinje cells had been damaged, suggesting that differences in the nature of the injury may affect the fusion process. Moreover, histological comparison of the cerebellum from transplanted PCD animals and PCD mice not receiving treatment did not reveal any difference or improvement in the degenerative process (unpublished data). This was confirmed by the absence of Purkinje cells (CB positive) in all the mutant mice analyzed, with or without BMDC transplantation.

Additionally, analysis of the OB of transplanted PCD mice (Fig. 6) suggested that the sparse formation of neurons from BMDC was not influenced by mitral cell degeneration either, since the results were similar to those obtained in wild-type

transplanted mice (Table III): in normal mice mature olfactory interneurons expressing GFP were also observed in the OB of some transplanted PCD mice at similar ages (Fig. 6C, F). However, none of these newly-generated cells expressed Reelin or displayed the typical mitral cell morphology. Therefore, despite the mitral cell degeneration in the OB of the PCD mice, BMDC did not contribute to this neuronal population under either normal or degenerative conditions.

Similar to the results observed in wild-type grafted animals, none of the newly generated GFP<sup>+</sup> OB cells had two nuclei nor expressed the *lacZ* reporter gene, supporting their origin through a differentiation mechanism. Finally, histological comparison of the OB of transplanted PCD mice and PCD mice not receiving treatment revealed no difference in the remaining mitral cell population at the different ages analyzed. This suggested that the transplantation of wild-type BM had no effect on the degenerative process of the OB, as in the cerebellum.

## **DISCUSSION**

### **The formation of microglial cells from the bone marrow is influenced by selective postnatal neurodegeneration**

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

suggesting that donor-derived bone marrow generates permanent new microglial cells for the encephalon throughout the lifespan of the animals, according to previous findings (6,15,21,32).

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

Regarding the plasticity mechanism(s) involved in the formation of microglial cells, the absence of X-gal staining in this cell type clearly showed that this phenomenon occurred through differentiation. Nonetheless, we cannot discard a silencing or an uncompleted CRE recombination process of the conditional reporter gene in some cell types, which would mask some of the fusion events (10,29).

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

## **BMDC contribute to different neuronal types through two different plasticity mechanisms**

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

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

Finally, we show for the first time how BMDC contribute to the CNS in different ways in the same animal, depending on the region and cell-specific factors: cell fusion for Purkinje cells and differentiation for olfactory interneurons. Future studies should clarify whether the plasticity mechanism involved depends on a) the type of

participating BMDC or the resulting cellular type; b) different plasticity properties of the BMDC or fusing partner; and/or c) the niche where the phenomenon occurs.

**Despite their neurodegeneration, wild-type BMDC do not contribute to the cellular populations affected by the *pcd<sup>fj</sup>* mutation**

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



animals, where BMDC did not contribute to the mitral cell population despite their degeneration, show that there must be region-specific factors that modulate the plasticity properties of BMDC.

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

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

In light of our observations, we conclude that BMDC do not only contribute to the cerebellar Purkinje cell population, but also to the OB interneurons. Both contributions are limited but take place under physiological conditions. The former occurs through cell fusion and hence depends on the existence of the cellular type generated and its fusogenic capability (39). The latter takes place by differentiation and is not affected by the neurodegeneration of surrounding cells. Future experiments should be performed to discern the physiological importance of both processes in normal homeostasis and in cell replacement therapies for the adult CNS.

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

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación (BFU2010-18284), the Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad (Plan Nacional Sobre Drogas), the Junta de Castilla y León, “MMA”, “Samuel Solórzano Barruso” and the “Alicia Koplowitz” Foundations, and Centre for Regenerative Medicine and Cell Therapy of Castilla y León. The authors have no conflicting financial interests.

## REFERENCES

1. Ajami, B.; Bennett, J. L.; Krieger, C.; Tetzlaff, W.; Rossi, F. M. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat. Neurosci.* 10:1538-1543; 2007.
2. Álvarez-Dolado, M.; Pardal, R.; García-Verdugo, J. M.; Fike, J. R.; Lee, H. O.; Pfeffer, K.; Lois, C.; Morrison, S. J.; Álvarez-Buylla, A. Fusion of bone marrow derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 425:968-973; 2003.
3. Bae, J. S.; Furuya, S.; Shinoda, Y.; Endo, S.; Schuchman, E. H.; Hirabayashi, Y.; Jin, H. K. Neurodegeneration augments the ability of bone marrow derived mesenchymal stem cells to fuse with Purkinje neurons in Niemann Pick type C mice. *Hum. Gene Ther.* 16:1006-1011; 2005.
4. Baker, H.; Greer, C. A. Region specific consequences of *pcd* gene expression in the olfactory system. *J. Comp. Neurol.* 293:125-133; 1990.
5. Baltanás, F. C.; Weruaga, E.; Airado, C.; Valero, J.; Recio, J. S.; Díaz, D.; Alonso, J. R. Chemical heterogeneity of the periglomerular neurons in the olfactory bulb. A review. *Eur. J. Anat.* 11:123-147; 2007.

6. Biffi, A.; De Palma, M.; Quattrini, A.; Del Carro, U.; Amadio, S.; Visigalli, I.; Sessa, M.; Fasano, S.; Brambilla, R.; Marchesini, S.; Bordignon, C.; Naldini, L. Correction of metachromatic leukodystrophy in the mouse model by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *J. Clin. Invest.* 113:1118-1129; 2004.
7. Bittner, R. E.; Schofer, C.; Weipoltshammer, K.; Ivanova, S.; Streubel, B.; Hauser, E.; Freilinger, M.; Hoger, H.; Elbe-Burger, A.; Wachtler, F. Recruitment of bone marrow derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anat. Embryol.* 199:391-396; 1999.
8. Brazelton, T. R.; Rossi, F. M.; Keshet, G. I.; Blau, H. M. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 290:1775-1779; 2000.
9. Cho, S. R.; Kim, Y. R.; Kang, H. S.; Yim, S. H.; Park, C. I.; Min, Y. H.; Lee, B. H.; Shin, J. C.; Lim, J. B. Functional recovery after the transplantation of neurally differentiated mesenchymal stem cells derived from bone marrow in a rat model of spinal cord injury. *Cell Transplant.* 18:1359-1368; 2009.
10. Cohen-Tannoudji, M; Babinet, C; Morello, D. *LacZ* and ubiquitously expressed genes: should divorce be pronounced? *Transgenic Res.* 9:233–235; 2000.
11. Corti, S.; Locatelli, F.; Donadoni, C.; Guglieri, M.; Papadimitriou, D.; Strazzer, S.; Del Bo, R.; Comi, G. P. Wild type bone marrow cells ameliorate the phenotype of SOD1-G93A ALS mice and contribute to CNS, heart and skeletal muscle tissues. *Brain* 127:2518-2532; 2004.
12. Corti, S.; Locatelli, F.; Strazzer, S.; Salani, S.; Del Bo, R.; Soligo, D.; Bossolasco, P.; Bresolin, N.; Scarlato, G.; Comi, G. P. Modulated generation of neuronal cells from bone marrow by expansion and mobilization of circulating stem cells with in vivo cytokine treatment. *Exp. Neurol.* 177:443-452; 2002.

13. Crespo, C.; Alonso, J. R.; Briñón, J. G.; Weruaga, E.; Porteros, A.; Arévalo, R.; Aijón, J. Calcium-binding proteins in the periglomerular region of typical and atypical olfactory glomeruli. *Brain Res.* 745:293-302; 1997.
14. Díaz, D.; Valero, J.; Airado, C.; Baltanás, F.C.; Weruaga, E.; Alonso, J.R. Sexual dimorphic stages affect both proliferation and serotonergic innervation in the adult rostral migratory stream. *Exp. Neurol.* 216:357-364; 2009.
15. Eglitis, M. A.; Mezey, E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4080-4085; 1997.
16. Fernández-González, A.; La Spada, A. R.; Treadaway, J.; Higdon, J. C.; Harris, B. S.; Sidman, R. L.; Morgan, J. I.; Zuo, J. *Purkinje cell degeneration (pcd)* phenotypes caused by mutations in the axotomy induced gene, *Nna1*. *Science* 295:1904-1906; 2002.
17. Greer, C. A.; Halász, N. Plasticity of dendrodendritic microcircuits following mitral cell loss in the olfactory bulb of the murine mutant *Purkinje cell degeneration*. *J. Comp. Neurol.* 256:284-298; 1987.
18. Greer, C. A.; Shepherd, G. M. Mitral cell degeneration and sensory function in the neurological mutant mouse *Purkinje cell degeneration (pcd)*. *Brain Res.* 235:156-161; 1982.
19. Gussoni, E.; Soneoka, Y.; Strickland, C. D.; Buzney, E. A.; Khan, M. K.; Flint, A. F.; Kunkel, L. M.; Mulligan, R. C. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401:390-394; 1999.
20. Hadjantonakis, A. K.; Gertsenstein, M.; Ikawa, M.; Okabe, M.; Nagy, A. Generating green fluorescent mice by germline transmission of green fluorescent ES cells. *Mech. Dev.* 76:79-90; 1998.

21. Hess, D. C.; Abe, T.; Hill, W. D.; Studdard, A. M.; Carothers, J.; Masuya, M.; Fleming, P. A.; Drake, C. J.; Ogawa, M. Hematopoietic origin of microglial and perivascular cells in brain. *Exp. Neurol.* 186:134-144; 2004.
22. Jackson, K. A.; Majka, S. M.; Wang, H.; Pocius, J.; Hartley, C. J.; Majesky, M. W.; Entman, M. L.; Michael, L. H.; Hirschi, K. K.; Goodell, M. A. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J. Clin. Invest.* 107:1395-1402; 2001.
23. Johansson, C. B.; Youssef, S.; Koleckar, K.; Holbrook, C.; Doyonnas, R.; Corbel, S. Y.; Steinman, L.; Rossi, F. M.; Blau, H. M. Extensive fusion of haematopoietic cells with Purkinje neurons in response to chronic inflammation. *Nat. Cell Biol.* 10:575-583; 2008.
24. Krause, D. S.; Theise, N. D.; Collector, M. I.; Henegariu, O.; Hwang, S.; Gardner, R.; Neutzel, S.; Sharkis, S. J. Multi organ, multi lineage engraftment by a single bone marrow derived stem cell. *Cell* 105:369-377; 2001.
25. Kyuhou, S.; Kato, N.; Gemba, H. Emergence of endoplasmic reticulum stress and activated microglia in Purkinje cell degeneration mice. *Neurosci. Lett.* 396:91-96; 2006.
26. Lagasse, E.; Connors, H.; Al Dhalimy, M.; Reitsma, M.; Dohse, M.; Osborne, L.; Wang, X.; Finegold, M.; Weissman, I. L.; Grompe, M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat. Med.* 6:1229-1234; 2000.
27. Landis, S. C.; Mullen, R. J. The development and degeneration of Purkinje cells in *pcd* mutant mice. *J. Comp. Neurol.* 177:125-143; 1978.
28. Lewandoski, M.; Meyers, E. N.; Martin, G. R. Analysis of Fgf8 gene function in vertebrate development. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 62:159-168; 1997.
29. Long, M. A.; Rossi, F. M. Silencing inhibits Cre-mediated recombination of the *Z/AP* and *Z/EG* reporters in adult cells. *PLoS One* 4:e5435; 2009.

30. Magrassi, L.; Grimaldi, P.; Ibatci, A.; Corselli, M.; Ciardelli, L.; Castello, S.; Podesta, M.; Frassoni, F.; Rossi, F. Induction and survival of binucleated Purkinje neurons by selective damage and aging. *J. Neurosci.* 27:9885-9892; 2007.
31. Mao, X.; Fujiwara, Y.; Orkin, S. H. Improved reporter strain for monitoring Cre recombinase mediated DNA excisions in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:5037-5042; 1999.
32. Massengale, M.; Wagers, A. J.; Vogel, H.; Weissman, I. L. Hematopoietic cells maintain hematopoietic fates upon entering the brain. *J. Exp. Med.* 201:1579-1589; 2005.
33. Matsuda, R.; Yoshikawa, M.; Kimura, H.; Ouji, Y.; Nakase, H.; Nishimura, F.; Nonaka, J.; Toriumi, H.; Yamada, S.; Nishiofuku, M.; Moriya, K.; Ishizaka, S.; Nakamura, M.; Sakaki, T. Cotransplantation of mouse embryonic stem cells and bone marrow stromal cells following spinal cord injury suppresses tumor development. *Cell Transplant.* 18:39–54; 2009.
34. Mezey, E.; Chandross, K. J.; Harta, G.; Maki, R. A.; McKercher, S. R. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated *in vivo* from bone marrow. *Science* 290:1779-1782; 2000.
35. Mezey, E.; Key, S.; Vogelsang, G.; Szalayova, I.; Lange, G. D.; Crain, B. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:1364-1369; 2003.
36. Mullen, R. J.; Eicher, E. M.; Sidman, R. L. *Purkinje cell degeneration*, a new neurological mutation in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:208-212; 1976.
37. Nakano, K.; Migita, M.; Mochizuki, H.; Shimada, T. Differentiation of transplanted bone marrow cells in the adult mouse brain. *Transplantation* 71:1735-1740; 2001.
38. Nygren, J. M.; Liuba, K.; Breitbach, M.; Stott, S.; Thoren, L.; Roell, W.; Geisen, C.; Sasse, P.; Kirik, D.; Björklund, A.; Nerlov, C.; Fleischmann, B. K.; Jovinge, S.;

- Jacobsen, S. E. Myeloid and lymphoid contribution to non haematopoietic lineages through irradiation induced heterotypic cell fusion. *Nat. Cell Biol.* 10:584-592; 2008.
39. Ogle, B. M.; Cascalho, M.; Platt, J. L. Biological implications of cell fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6:567-575; 2005.
40. Orlic, D.; Kajstura, J.; Chimenti, S.; Jakoniuk, I.; Anderson, S. M.; Li, B.; Pickel, J.; McKay, R.; Nadal-Ginard, B.; Bodine, D. M.; Leri, A.; Anversa, P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410:701-705; 2001.
41. Petersen, B. E.; Bowen, W. C.; Patrene, K. D.; Mars, W. M.; Sullivan, A. K.; Murase, N.; Boggs, S. S.; Greenberger, J. S.; Goff, J. P. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284:1168-1170; 1999.
42. Priller, J.; Flugel, A.; Wehner, T.; Boentert, M.; Haas, C. A.; Prinz, M.; Fernández-Klett, F.; Prass, K.; Bechmann, I.; de Boer, B. A.; Frotscher, M.; Kreutzberg, G. W.; Persons, D. A.; Dirnagl, U. Targeting gene modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nat. Med.* 7:1356-1361; 2001.
43. Priller, J.; Persons, D. A.; Klett, F. F.; Kempermann, G.; Kreutzberg, G. W.; Dirnagl, U. Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene marked bone marrow cells in vivo. *J. Cell Biol.* 155:733-738; 2001.
44. Recio, J. S.; Weruaga, E.; Gómez, C.; Valero, J.; Briñón, J. G.; Alonso, J. R. Changes in the connections of the main olfactory bulb after mitral cell selective neurodegeneration. *J. Neurosci. Res.* 85:2407-2421; 2007
45. Simard, A. R.; Rivest, S. Bone marrow stem cells have the ability to populate the entire central nervous system into fully differentiated parenchymal microglia. *FASEB J.* 18:998-1000; 2004.



46. Solomon, J. N.; Lewis, C. A.; Ajami, B.; Corbel, S. Y.; Rossi, F. M.; Krieger, C. Origin and distribution of bone marrow derived cells in the central nervous system in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Glia* 53:744-753; 2006.
47. Terada, N.; Hamazaki, T.; Oka, M.; Hoki, M.; Mastalerz, D. M.; Nakano, Y.; Meyer, E. M.; Morel, L.; Petersen, B. E.; Scott, E. W. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416:542-545; 2002.
48. Theise, N. D.; Badve, S.; Saxena, R.; Henegariu, O.; Sell, S.; Crawford, J. M.; Krause, D. S. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation induced myeloablation. *Hepatology* 31:235-240; 2000.
49. Valero, J.; Weruaga, E.; Murias, A. R.; Recio, J. S.; Curto, G. G.; Gómez, C.; Alonso, J. R. Changes in cell migration and survival in the olfactory bulb of the *pcd/pcd* mouse. *Dev. Neurobiol.* 67:839-859; 2007.
50. Wagers, A. J.; Sherwood, R. I.; Christensen, J. L.; Weissman, I. L. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 297:2256-2259; 2002.
51. Wang, X.; Willenbring, H.; Akkari, Y.; Torimaru, Y.; Foster, M.; Al Dhalimy, M.; Lagasse, E.; Finegold, M.; Olson, S.; Grompe, M. Cell fusion is the principal source of bone marrow derived hepatocytes. *Nature* 422:897-901; 2003.
52. Wehner, T.; Bontert, M.; Eyupoglu, I.; Prass, K.; Prinz, M.; Klett, F. F.; Heinze, M.; Bechmann, I.; Nitsch, R.; Kirchhoff, F.; Kettenmann, H.; Dirnagl, U.; Priller, J. Bone marrow derived cells expressing green fluorescent protein under the control of the glial fibrillary acidic protein promoter do not differentiate into astrocytes *in vitro* and *in vivo*. *J. Neurosci.* 23:5004-5011; 2003.
53. Weimann, J. M.; Charlton, C. A.; Brazelton, T. R.; Hackman, R. C.; Blau, H. M. Contribution of transplanted bone marrow cells to Purkinje neurons in human adult brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:2088-2093; 2003.

54. Weimann, J. M.; Johansson, C. B.; Trejo, A.; Blau, H. M. Stable reprogrammed heterokaryons form spontaneously in Purkinje neurons after bone marrow transplant. *Nat. Cell Biol.* 5:959-966; 2003.
55. Weruaga, E.; Briñón, J. G.; Barbado, V.; Aijón, J.; Alonso J. R. A standardized model for the anatomical division of the rodent olfactory bulb. *Eur. J. Anat.* 3:27-34; 1999.
56. Yang, T.; Tsang, K. S.; Poon, W. S.; Ng, H. K. Neurotrophism of bone marrow stromal cells to embryonic stem cells: noncontact induction and transplantation to a mouse ischemic stroke model. *Cell Transplant.* 18:391–404; 2009.

**Non-standard abbreviations:**

Bone Marrow Derived Cells (BMDC), *Purkinje Cell Degeneration* (PCD), Olfactory Bulb (OB), Green Fluorescent Protein (GFP), Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), Calbindin D-28k (CB), Bone Marrow Transplantation (BMT), Propidium Iodide (IP), Subventricular Zone (SVZ).

## TABLES

**Table I. Summary of the different experimental animals employed and the experimental procedures followed in the present study.**

Number of animals (n)	Genotype	Treatment	N° of transplanted cells	Sacrifice age	% GFP <sup>+</sup> blood cells at death (mean±SEM)	Degenerative stage	
						cerebellum	OB
4	+/+	BMT P20	7.5x10 <sup>6</sup>	P60	59.5±2.4	N	N
4	+/+	BMT P20	7.5x10 <sup>6</sup>	P110	65.7±2.9	N	N
4	+/+	BMT P20	7.5x10 <sup>6</sup>	P150	74.8±1.7	N	N
4	<i>pcd/pcd</i>	NT	--	P60	--	PD	N
4	<i>pcd/pcd</i>	NT	--	P110	--	PD	D
4	<i>pcd/pcd</i>	NT	--	P150	--	PD	PD
4	<i>pcd/pcd</i>	BMT P20	7.5x10 <sup>6</sup>	P60	58.2±0.9	PD	N
4	<i>pcd/pcd</i>	BMT P20	7.5x10 <sup>6</sup>	P110	64.8±1.8	PD	D
4	<i>pcd/pcd</i>	BMT P20	7.5x10 <sup>6</sup>	P150	72.7±4.9	PD	PD

Genotype: +/+, wild-type; *pcd/pcd*, PCD. Treatment: BMT, Bone marrow transplantation; NT, not treated.

Degenerative stage at sacrifice age of both Purkinje cells (cerebellum) and mitral cells (OB): N, normal; D, degeneration; PD, post-degeneration.

**Table II. Number of GFP<sup>+</sup> microglial cells after bone marrow transplantation**

		<b>Cerebellum</b> <i>n</i> =4		<b>Olfactory bulb</b> <i>n</i> =4	
Age	Genotype	Wild-type	PCD	Wild-type	PCD
	P60		73.67±6.96	76.00±25.48	43.25±4.77
P110		114.00±5.00	130.33±30.30	84.50±7.50	139.67±50.26
P150		314.00±28.03	290.00±28.05	393.00±47.84	359.50±86.56

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

**Table III. Number of GFP<sup>+</sup> neurons after bone marrow transplantation**

		<b>Purkinje Cells (cerebellum)</b> <i>n</i> =4		<b>Interneurons (olfactory bulb)</b> <i>n</i> =4	
Age	Genotype	Wild-type	PCD	Wild-type	PCD
	P60		0	0	0.25±0.25
P110		0	0	2.25±0.63	0.75±0.25
P150		2.07±0.71	0	4.25±0.48	3.50±0.87

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

## FIGURE LEGENDS

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

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

**Figure 3. Chart showing the number of GFP<sup>+</sup> microglial cells in the recipient animal after bone marrow transplantation.** The number of cells was quantified in comparable sections in both wild-type and mutant animals in order to avoid the incorrect evaluation of cell densities because the natural shrinkage of the tissue in mutant mice. Within each studied encephalic regions, statistical differences were founded among survival times for both wild type animals (##  $p < 0.01$  ANOVA-Bonferroni *post-hoc* test) and PCD mutant mice (§  $p < 0.05$  ANOVA-Bonferroni *post-hoc* test). Moreover, in the olfactory bulb, statistical differences were demonstrated between both experimental groups at P60 (\*\*  $p < 0.01$  Student *t*-test).

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

**Figure 5. Fluorescence microscopy images of cerebellum sections from wild-type mice grafted with wild-type bone marrow from CRE-GFP donors showing some examples of Purkinje cells originated from the transplanted bone marrow.** Images **A** and **D** show two perfectly differentiated different GFP<sup>+</sup> Purkinje cells. The arrowhead in **A** indicates the axon. **B** and **E** indicate the Calbindin (CB) labeling for the previous images, and **C** and **F** the corresponding merging. Purkinje cells produced from the grafted bone marrow not only show the typical morphology of this specific cell type, but also express CB, like the other Purkinje cells. Images **G-I** show the X-Gal staining of a cerebellar 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 with X-Gal and CB (with the DAB immunohistochemical technique).

Images at the bottom (**J-L**) represent high magnifications of the soma from a GFP<sup>+</sup> Purkinje cell (**J**), the staining of this region with the nuclear marker Propidium Iodide (PI; **K**), and the merging of both stainings (**L**). Arrowheads in **K** indicate the two nuclei belonging to the previous GFP<sup>+</sup> Purkinje cell, suggesting that it is a binucleate and presumably 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**.

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



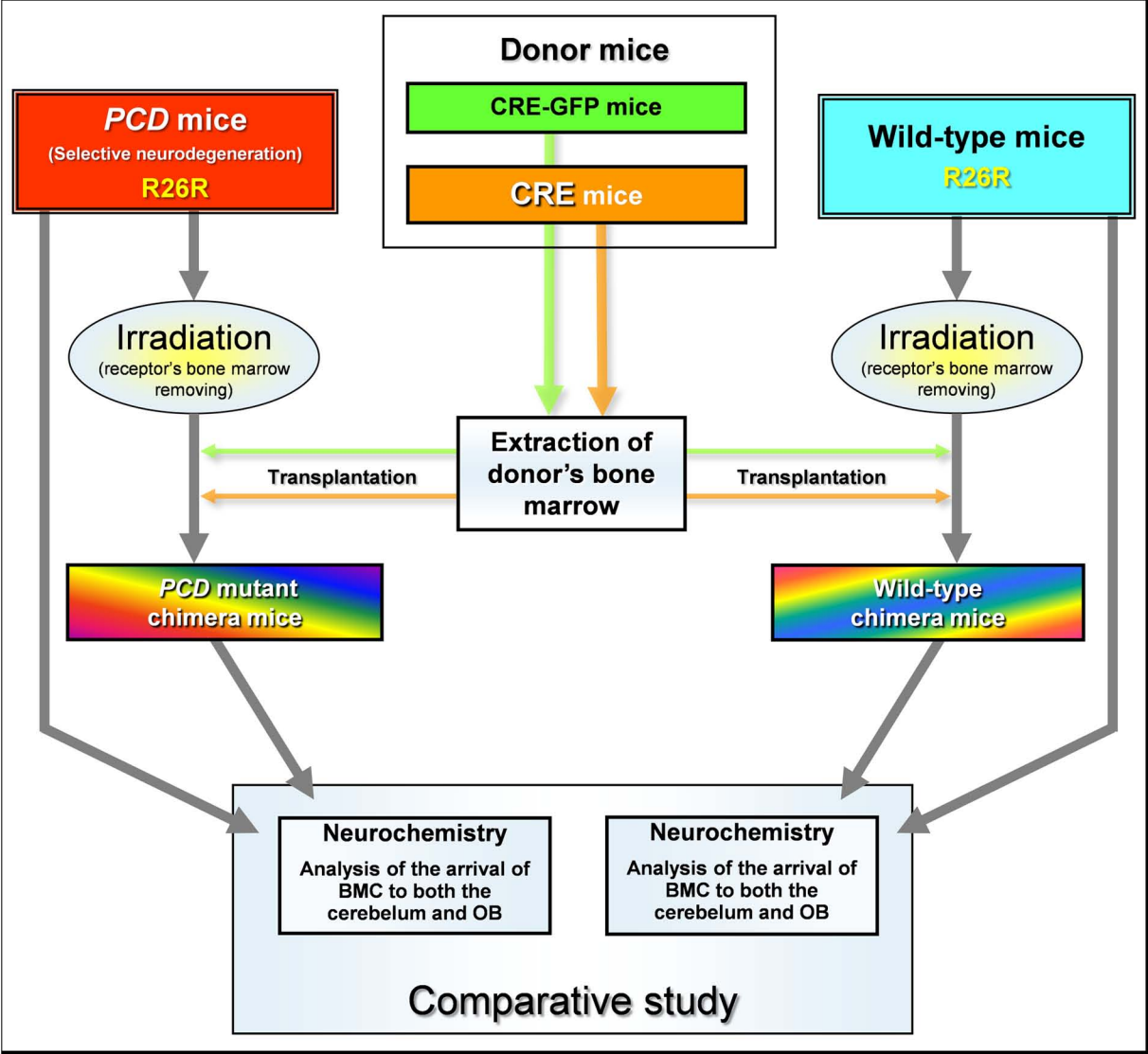


Figure 1. Chart depicting the work schema to demonstrate both the destination and cell mechanism for BMDC to be integrated into nervous tissue.

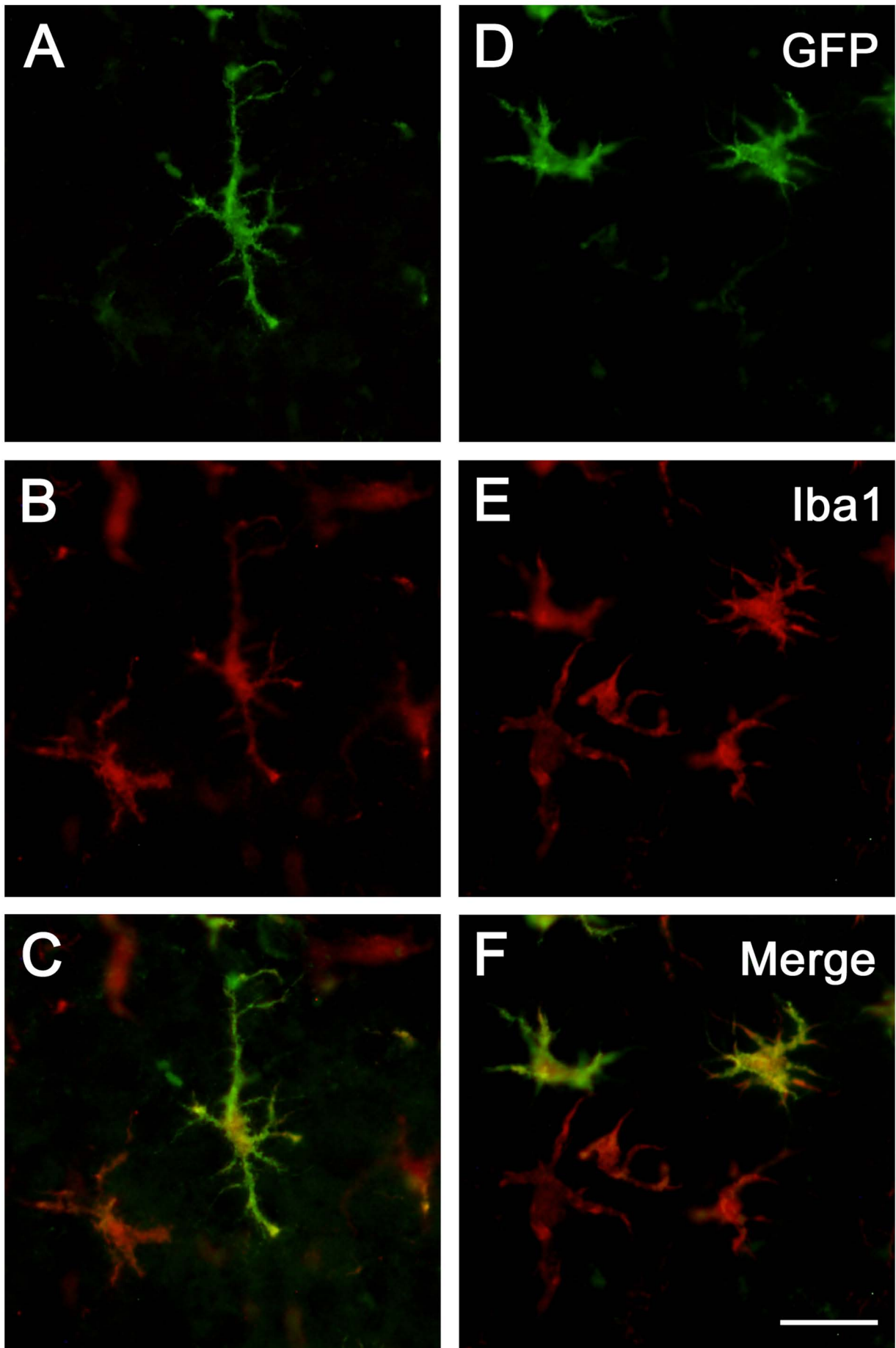


Figure 2. Epifluorescence microscopy images from encephalic sections of a P150 wild-type mouse transplanted with GFP bone marrow.

## Total numbers of GFP+ microglial cells in transplanted animals

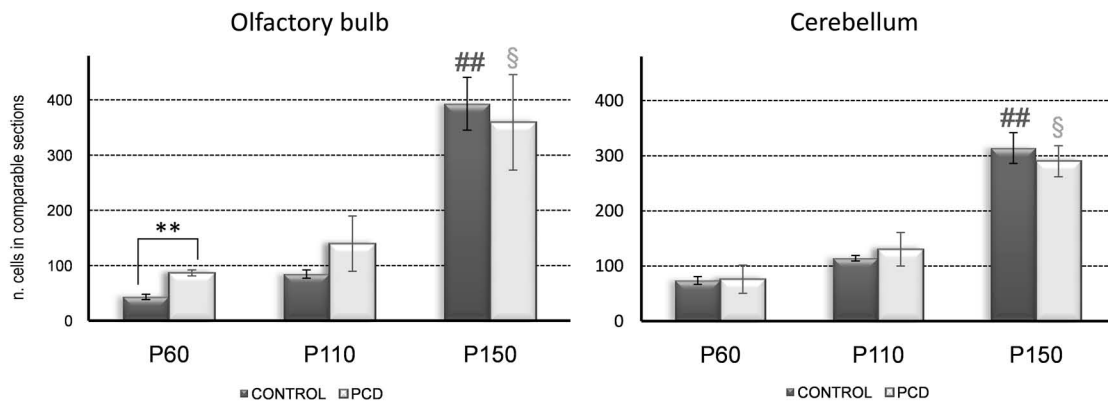


Figure 3. Chart showing the number of GFP+ microglial cells in the recipient animal after bone marrow transplantation.

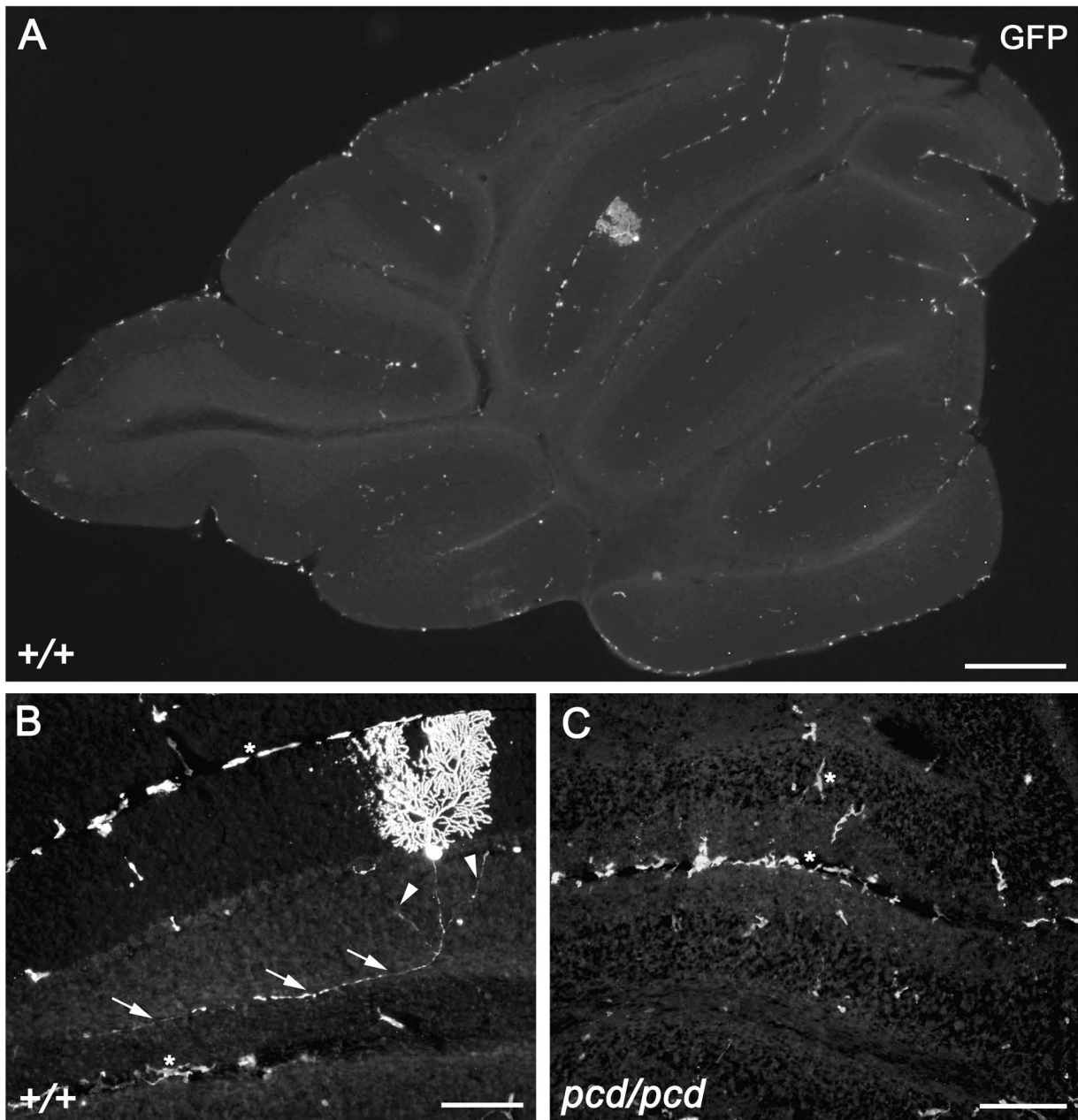


Figure 4. Epifluorescence microscopy images of cerebellum sections from a P150 wild-type mouse (A and B) and a P150 PCD mouse, both grafted with GFP bone marrow, showing the GFP+ cells.

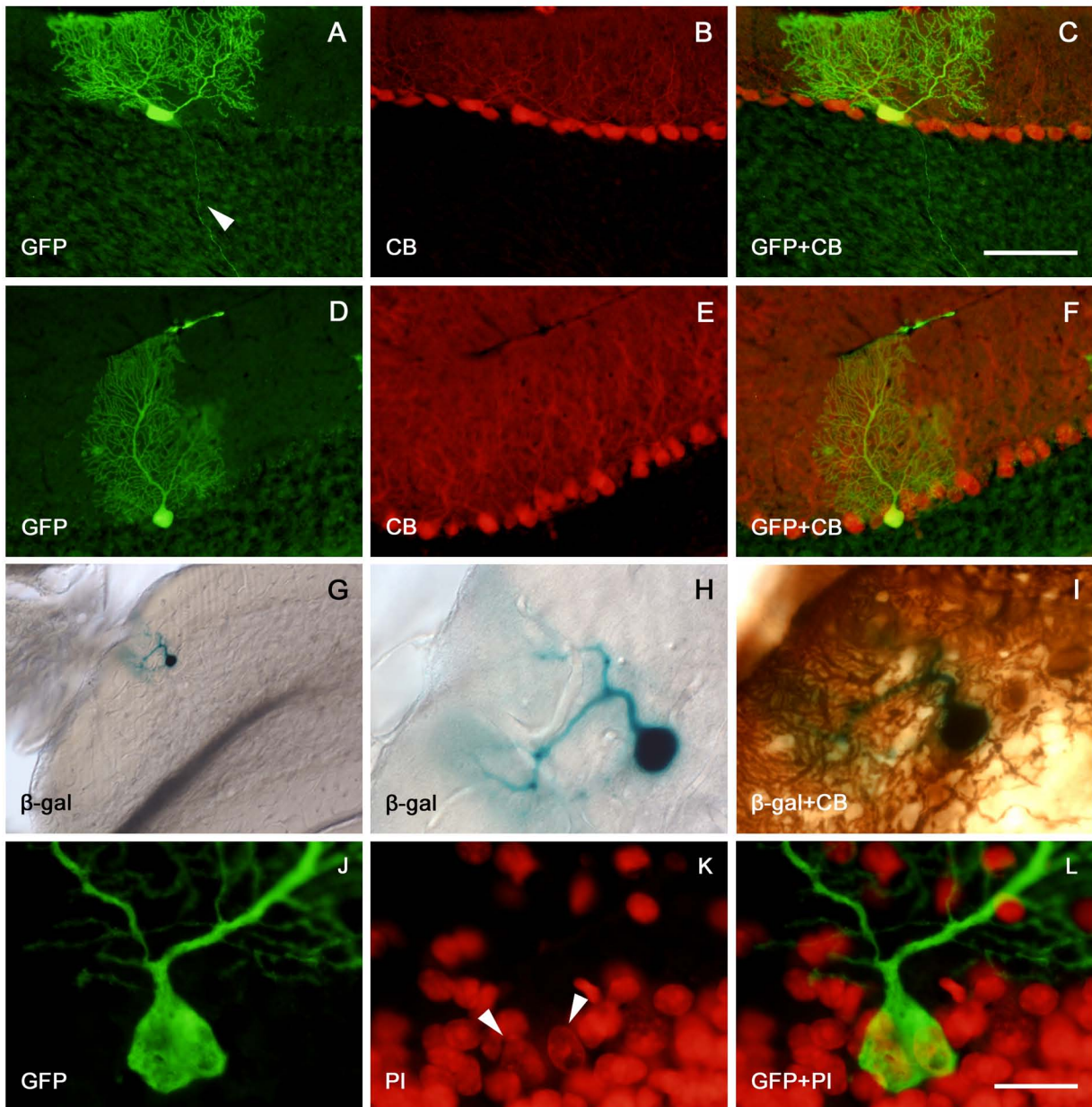


Figure 5. Fluorescence microscopy images of cerebellum sections from wild-type mice grafted with wild-type bone marrow from CRE-GFP donors showing some examples of Purkinje cells originated from the transplanted bone marrow.



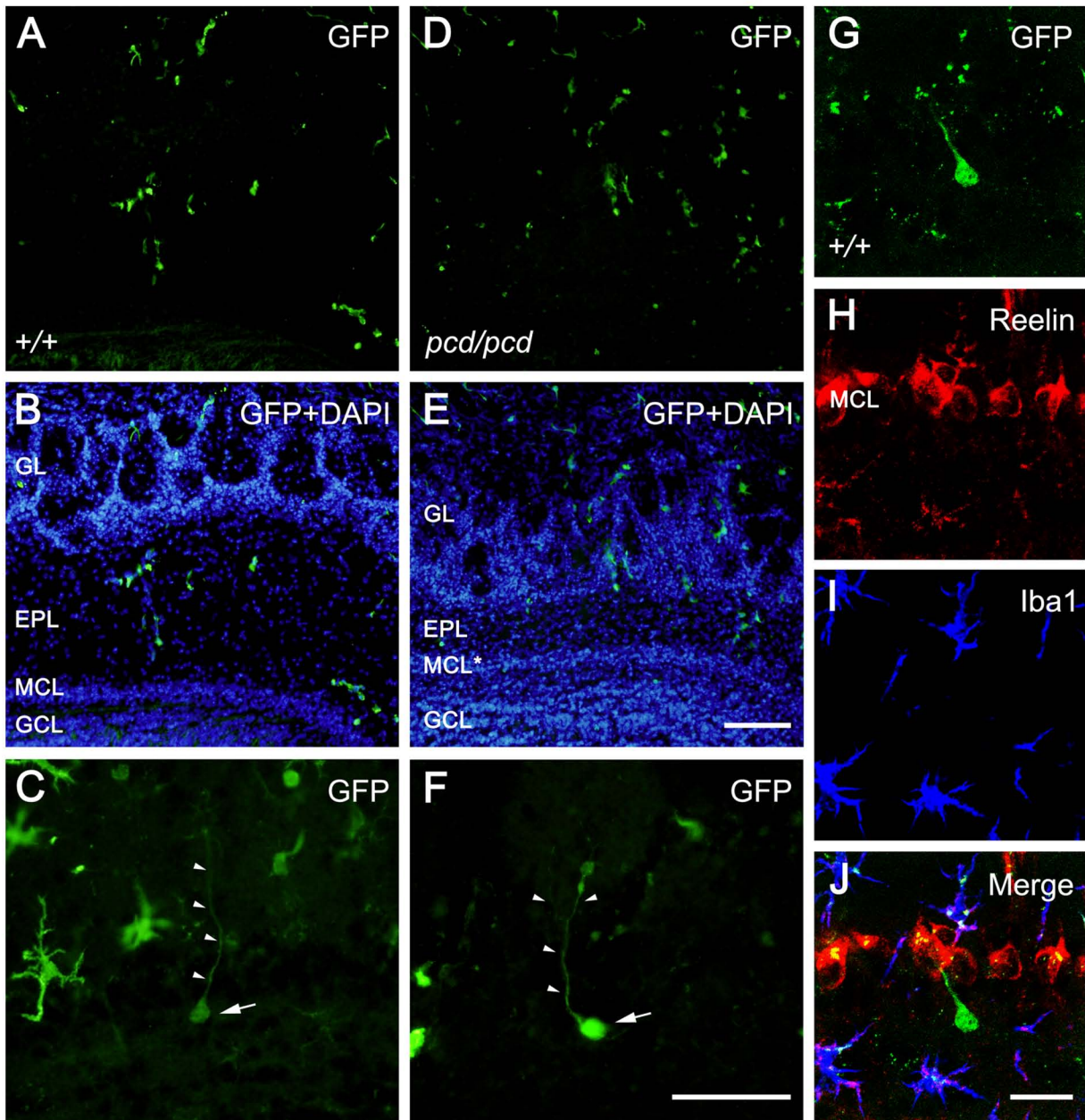


Figure 6. Fluorescence microscopy images of olfactory bulb (OB) sections from wild-type (A-C; G-J) and PCD (D-F) mice grafted with wild-type bone marrow from a CRE-GFP donor showing some examples of the typical neuronal types of this region originated from the transplanted bone marrow.





## Cell fusion of Purkinje and bone marrow-derived cells in aged heterozygous PCD mice

### Authors' names and institutions:

David Díaz<sup>1</sup>, Javier S. Recio<sup>1</sup>, Eduardo Weruaga<sup>1</sup>, José R. Alonso<sup>1,2,CA</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Neuronal Plasticity and Neurorepair, Institute for Neuroscience of Castile and León, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain.

<sup>2</sup> Instituto de Alta Investigación, Universidad de Tarapacá, Arica, Chile.

<sup>CA</sup>**Corresponding author:** Dr. José R. Alonso, Institute for Neuroscience of Castilla y León, C/ Pintor Fernando Gallego 1, E-37007, Salamanca, Spain; e-mail: [jralonso@usal.es](mailto:jralonso@usal.es); phone: +34 923 294500 ext. 5325; fax: + 34 923 294750

**Reprint requests:** Dr. J.R. Alonso, Institute for Neuroscience of Castilla y León, C/ Pintor Fernando Gallego 1, E-37007, Salamanca, Spain; e-mail: [jralonso@usal.es](mailto:jralonso@usal.es); phone: +34 923 294500 ext. 5325; fax: + 34 923 294750

**Running title:** Increased cell fusion in age-related degeneration

## ***Abstract***

Bone marrow-derived cells have different plastic properties, especially regarding cell fusion, which increases with time and is prompted by tissue injury. Several recessive mutations, including Purkinje Cell Degeneration, affect the numbers of Purkinje cells in homozygosis; heterozygous young animals have an apparently normal phenotype but they undergo Purkinje cell loss as they age. Our findings demonstrate that heterozygous *pcd* mice undergo Purkinje cell loss at postnatal day 300, this slow but steadily progressing cell death starting sooner than has been reported previously and without massive reactive gliosis or inflammation. Here, transplantation of bone marrow stem cells was performed to assess the arrival of bone marrow-derived cells in the cerebellum in these heterozygous mice. Our results reveal that a higher number of cell fusion events occur in heterozygous animals than in the controls, on days 150 and 300 postnatally. In sum, this study indicates that mild cell death promotes the fusion of bone marrow-derived cells with surviving Purkinje neurons. This phenomenon suggests new therapies for long-lasting neurodegenerative disorders.

**Keywords:** cell fusion, cerebellum, neurorepair, Purkinje Cell Degeneration, Purkinje cells, transplant.

## ***Introduction***

Several murine mutations lead to cerebellar degeneration, affording mutants such as Lurcher, hot foot, staggerer, nervous, reeler, weaver and Purkinje Cell Degeneration (16). All these mutants exhibit subsequent impairments of motor capacity and other cerebellar functions. These genetic alterations have been known for over fifty years and, with a few exceptions, most of these mutations elicit the death of Purkinje cells (PCs; 16). The Purkinje Cell Degeneration mutation (*pcd*) is characterized by an inhibited expression of the *Agtpbp1* gene (a.k.a. *Nna1*; 9). Homozygous PCD mice (*pcd/pcd*) undergo a dramatic PC loss that begins around postnatal day 20 (P20) and rapidly progresses over the next two weeks (20). Some cerebellar areas, such as the lobule X, seem to be more resistant to degeneration, but after two months virtually all the PCs of the cerebellum have disappeared (25). In addition, *pcd/pcd* mice undergo the loss of other specific neuronal populations, such as the mitral cells of the olfactory bulb, some thalamic neurons, and photoreceptors (12,25). Moreover, previous reports have demonstrated that aged (17 months) heterozygous *pcd* mice (*+/pcd*) are also subject to a decrease in the number of PC in comparison with age-matched controls (*+/+*; 8).

Cerebellar PCs are selective targets for fusion with bone marrow-derived cells (BMC), which can reach and integrate with different tissues, as previously demonstrated (2). In addition, a degenerative environment can foster the migration of these BMC to injured regions, presumably in an attempt to restore the damaged cytoarchitecture and their functions (14,17,21). There is now hope for the development of a new array of therapies for different disorders, including neurodegenerative diseases (5,18,27).

In the present work, we have employed *+/pcd* mice to analyze whether the aging-initiated increase in cerebellar neurodegeneration can be compensated by an increase in the phenomenon of cell fusion of BMC with the remaining PC. BMC from healthy donors carry two copies of the normal *Nna1* gene and can therefore promote PC survival in the affected animals. Similarly, this phenomenon of cell fusion can be employed as a cell therapy to restore the functionality of altered cells, promoting their survival under neurodegenerative conditions.

## ***Materials and methods***

Four green fluorescent protein (GFP) transgenic BALBc mice (*Mus musculus*, L. 1758; Jackson Bar Harbor, ME) were used as donors of BMC. *+/+* and *+/pcd* mice (eight animals each) of the C57BL/DBA

strain (Jackson) were employed as recipients of the bone marrow transplants. Mice were housed at the Animal Facilities of the University of Salamanca at constant temperature and humidity, with a 12/12 hour photoperiod, and were fed water and special rodent chow *ad libitum* (Rodent toxicology diet, B&K Universal G.J., S.L. Molins de Rei, Barcelona).

Recipient animals were irradiated at P19 with a  $^{137}\text{Cs}$  source for mice, model Gammacell 1000 Elite (MDS Nordion, Ottawa, Canada). This device provides a radiation rate of 243 cGy/min, with an energy of 0.662 MeV. The dose employed was 7.5 Gy, sufficient to ablate the bone marrow of irradiated animals and allow subsequent transplantation (6,21).

Donors were sacrificed by cervical dislocation, their hind paws were removed, and the femurs and tibiae were dissected. Bone marrow extraction was performed with an IMDM injection medium (Iscove's Modified Dulbecco's Medium; Invitrogen; Carlsbad, CA, USA) with an insulin syringe at both epiphyses. The bone marrow wash was filtered through a 70- $\mu\text{m}$  pore size filter (Becton Dickinson; Franklin Lakes, NJ, USA) and centrifuged at 1,500 rpm for 5 min. The supernatant was removed and the pellet was re-suspended in lysis buffer (140 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 17 mM Tris-base, pH 7.4) for 5 min to break up the erythrocytes. The reaction was then stopped by adding 45 ml of 0.1 M phosphate-buffered saline, pH 7.4 (PBS), to each collection tube. The number of cells in each vial was estimated from an aliquot using a Thoma chamber. The cell suspension was centrifuged again at 1,500 rpm for 5 min and the pellet was re-suspended in PBS for transplantation into the recipient animals. Transplants were performed twenty four hours after the irradiation (at P20), each mouse receiving a single injection in the tail vein containing a suspension of 7.5 million bone marrow cells from the GFP animals. The constitutive expression of GFP in donor mice makes it possible to trace the cells from the reconstituted bone marrow because of their distinctive green fluorescent signal (21).

After irradiation and transplantation, the mice were housed separately for two weeks in an insulated rack used specifically for immunodepressed animals. Then, animals were returned to their cages in the original environment until they were sacrificed at P150 or at P300.

The mice were deeply anaesthetized with 1  $\mu\text{l/g}$  b.w. of a mixture containing ketamine hydrochloride (Ketolar; Parke-Davis, Barcelona, Spain) and xylazine hydrochloride (Rompun; Bayer, Leverkusen, Germany) at a proportion of 3:4. Then, the animals were perfused intracardially with PBS, followed by 5 ml/g b.w. of Zamboni's fixative (4% w/v depolymerized paraformaldehyde and 15% v/v saturated picric acid in PBS). After perfusion, the brains were dissected out and rinsed for 2 hours with PBS.

Tissue blocks were cryoprotected by immersing them in 30% (w/v) sucrose in PBS, frozen, and sectioned in 40- $\mu$ m thick parasagittal slices using a freezing-sliding microtome (Jung SM 2000, Leica Instruments, Nussloch, Germany) attached to a freezing unit (Frigomobil, Leica Instruments).

Immunofluorescence was performed by washing the tissue slices in PBS and incubating them overnight at room temperature under continuous rotary shaking in a medium containing 0.2% (w/v) Triton X-100, 5% (v/v) normal donkey serum, the primary anti-GFP polyclonal goat antibody (1:2,000; Abcam, Cambridge, UK) and the primary anti-calbindin D28k (CB) monoclonal mouse antibody (1:2,000; Swant, Bellinzona, Switzerland) in PBS. An anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) polyclonal mouse IgG (1:1,000; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) to label astrocytes and an anti-Iba1 polyclonal rabbit IgG (1:1,000; Wako, Osaka, Japan) to label microglia were also employed. Following this, slices were washed in PBS and incubated in a second medium with Cy2-conjugated donkey anti-goat fluorescent antibody (1:500; Jackson Laboratories, West Grove, PA, USA) and Cy3-conjugated donkey anti-mouse fluorescent antibody (1:500; Jackson) in PBS for 2 hours at room temperature under continuous rotary shaking. Finally, sections were rinsed in PBS and mounted with coverslips and a freshly prepared anti-fade medium.

The TUNEL technique was employed to detect apoptotic cells, as previously described (24). Tissue slices were washed with PBS and treated for 15 min with 0.2% (v/v) Triton X-100 and 0.1% (p/v) sodium citrate in distilled water. They were washed again with PBS and incubated with TUNEL buffer containing 30 mM Tris-HCl, 140 mM sodium cacodylate, 1mM CoCl<sub>2</sub> and 0.3% Triton X-100 (v/v) for 30 min. Then, the tissue slices were incubated in a medium with terminal transferase (800 U/ml; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and biotinylated dUTP (1  $\mu$ M; Roche Diagnostics) in TUNEL buffer for 2 hours. The reaction was terminated by the addition of saline sodium citrate buffer (0.15 M sodium chloride and 0.015 M sodium citrate). Finally, the slices were washed with PBS and developed with a medium containing Cy2-conjugated streptavidin (1:200; Jackson) in PBS. Slide mounting was performed as described above.

PC in the vermis region were counted with the NeuroLucida (V8.23, MicroBrightField, Colchester, VT, USA) and Neuroexplorer programs (V4.70.3, MicroBrightField) following the same procedure as described in previous reports (10) to determine the PC density (expressed as number of PC / mm). Once homoscedasticity had been checked (Kolmogorov-Smirnov test), Student's *t* test was employed to analyze

possible differences between the experimental groups at the different survival ages (SPSS 17.0 for Windows, SPSS, Chicago, IL, USA).

All animals were housed, manipulated and sacrificed in accordance with current European (86/609/ECC and directive 2003/65/CE) and Spanish legislation (RD 1201/2005 and RD 32/2007). The experiments were approved by the Bioethical Committee of the University of Salamanca.

## **Results**

The immunofluorescent technique against CB was performed to detect PC in the vermis of the cerebellum since this region is the first one that undergoes neurodegeneration in *pcd/pcd* mice (25) and contains all the cerebellar lobules. Student's *t* test showed no differences in the density of PC between control and *+/pcd* mice at P150 (Fig. 1 a-c;  $p>0.05$ ). However, at P300 a ~20% reduction in density was detected between the control and experimental groups (Fig. 1a, d-e;  $p<0.05$ ), indicating increased cell death in *+/pcd* mice, at least in the vermis. Additionally, no differences in the cerebellar volume were detected between experimental groups either at P150 or at P300, which confirms previous findings (8). Therefore, PC loss in heterozygous mice is not strong enough to cause a shrinkage of the entire cerebellum, as it does in the homozygous animals (20).

Immunofluorescent labelling against GFP was also performed to detect neural cells derived from the transplanted bone marrow. Both microglial (data not shown) and Purkinje cells (Fig. 2 b, c) derived from the transplanted bone marrow were detected. Accordingly, the total number of GFP positive PC in cerebella of both experimental groups at P150 and P300 was analyzed. The GFP positive PC increased with time from P150 to P300 in both the control and *+/pcd* mice, indicating a progressive increase in fusion events (Fig. 2 a, c). These GFP-positive PC showed normal morphological features but had two nuclei (Fig. 2 b, arrowheads), confirming that fusion had occurred. Moreover, on comparing both experimental groups Student's *t* test revealed a higher number of GFP-positive PC in *+/pcd* mice as compared to the controls at both survival times (Fig. 2 a, c;  $p<0.05$ ), pointing to a relationship between the decrease in PC numbers in *+/pcd* mice and an increase in cell fusion events.

The TUNEL technique was performed to analyze the neurodegenerative process, in particular cell death by apoptosis. A few TUNEL-positive PC were detected only in the cerebella of P300 *+/pcd* mice (Fig. 2

PC loss in *+/pcd* mice may start before it becomes discernible (e.g. by P150) and that cells in the process of neurodegeneration (which appear healthy) release putative signals that promote cell fusion. This should be taken into account to aim different therapeutic cell types (see above) at the damaged regions without the undesirable, reactive gliosis that can further damage the affected structures (19).

Our findings indicate that the relatively slow degeneration of the *+/pcd* mutation can promote cell fusion and attract healthy BMC to degenerating PC, this being useful to develop efficient cell therapies. More experiments will be necessary to clarify and improve this attraction so that functional regenerative therapies can be developed for severe neurodegenerative disorders.

### ***Acknowledgements***

This work was supported by the Ministerio de Investigación y Ciencia (BFU2010-18284), the Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad (Plan Nacional Sobre Drogas), the Junta de Castilla y León, the Centre for Regenerative Medicine and Cell Therapy of Castilla y León, the Fundación Samuel Solórzano and the University of Salamanca. The authors also express their gratitude to N. Skinner and C. Bruggemen for revising the English version of the manuscript. The authors have no conflicts of interest.

### Reference List

1. Álvarez-Dolado, M. Cell fusion: biological perspectives and potential for regenerative medicine. *Front. Biosci.* 12:1-12; 2007.
2. Álvarez-Dolado, M.; Pardal, R.; García-Verdugo, J. M.; Fike, J. R.; Lee, H. O.; Pfeffer, K.; Lois, C.; Morrison, S. J.; Álvarez-Buylla, A. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 425:968-973; 2003.
3. Baltanás, F. C.; Casafont, I.; Weruaga, E.; Alonso, J. R.; Berciano, M. T.; Lafarga, M. Nucleolar Disruption and Cajal Body Disassembly are Nuclear Hallmarks of DNA Damage-Induced Neurodegeneration in Purkinje Cells. *Brain. Pathol.* In press; 2010.
4. Caston, J.; Delhaye-Bouchaud, N.; Mariani, J. Motor behavior of heterozygous staggerer mutant (*+/-sg*) versus normal (*+/+*) mice during aging. *Behav. Brain. Res.* 72:97-102; 1995.
5. Cho S. R.; Kim, Y. R.; Kang, H. S.; Yim, S. H.; Park, C. I.; Min, Y. H.; Lee, B. H.; Shin, J. C.; Lim, J. B. Functional recovery after the transplantation of neurally differentiated mesenchymal stem cells derived from bone marrow in a rat model of spinal cord injury. *Cell Transplant.* 18:1359-68; 2009.
6. Díaz, D.; Recio, J. S.; Baltanás, F. C.; Gómez, C.; Weruaga, E.; Alonso, J. R. Long-lasting changes in the anatomy of the olfactory bulb after ionizing irradiation and bone marrow transplantation. *Neuroscience* 173:190-205; 2011.



d). No TUNEL-positive cells were detected in the control animals at either age or in the *+/pcd* mice at P150 postnatal age.

In order to determine whether reactive gliosis -a glial response to neuronal death- occurred, a double immunofluorescent labelling was performed against Iba1 and GFAP (Fig. 2 e-h). However, no differences either in the distribution pattern of microglia and astrocytes or in the morphology of the labelled cells were detected between the experimental groups, either at P150 or at P300. These results suggest a lack of the massive glial response that characterizes the neurodegeneration of homozygous *pcd* animals (unpublished data). These results point to an age-delayed degenerative process undergone by *+/pcd* mice, with few apoptotic events.

### ***Discussion***

The PC population in *+/pcd* mice is known to diminish with age, with a reduction of ~18% in the total PC number at P510 (17 months; 8). Our experiments demonstrate that this cell loss starts sooner, being clearly detectable at P300; i. e., more than 200 days earlier than previously reported. We focused our analysis on the vermis of the cerebellum, where PC degeneration starts in *pcd* mice. In a previous work (8) they analyzed PC loss by grouping all the cerebellar regions together without attempting to differentiate statistically between the vermis and the hemispheres. Thus, subtle differences between the levels of neural degeneration in these regions could have been masked by Doulazmi's approach (8). Moreover, our analysis of the volume of the vermis showed no differences between the experimental groups either at P150 or at P300, corroborating previous results obtained at P510 (8). The relatively mild neurodegeneration of the *+/pcd* mice is insufficient to affect the overall cerebellar volume.

Apoptotic PC were scarce in the cerebella of the P300 *+/pcd* mice. In addition, no reactive gliosis was detected in either experimental group, contrary to the case of homozygous mutants (unpublished data). Our data suggest that PC death in *+/pcd* mice is rare and occurs as isolated events, since PC loss spreads slowly from the vermis to the cerebellar hemispheres. Gradual PC apoptosis has been observed in other neurodegenerative models involving heterozygous animals with recessive mutations; these include both *in vitro* (28) and *in vivo* (7) examples. In these models, cell death was usually detected in old animals, suggesting that it is an age-related effect (4,7,8,22). Thus, gene silencing of the wild-type allele or any

other age-related alteration of the genome may provide a possible explanation for the observed apoptotic PC death subpopulation in heterozygous animals (11).

According to our results, cell fusion in the cerebellum is a process that increases with time, since progressively more tetraploid PC are observed (17,21). In addition, our experiments demonstrate that *+/pcd* mice undergo more fusion events than control animals, both at P150 and at P300. Previous studies have reported that damaged tissue can foster both the proliferation and attraction of stem cells, including those derived from bone marrow (13,15). Recent findings from our laboratory have revealed that although the severe neurodegeneration in homozygous PCD mice attracts microglial cells derived from the bone marrow (21), PC degeneration is too rapid to allow rescue by fusion with BMC (21). The milder activity of the heterozygous mutation, however, does foster BMC fusion. Our experiments show that *+/pcd* mice undergo more fusion events than control animals both at P150 and at P300, demonstrating the effectiveness of the transplantation and its therapeutic value in alleviating long-term neurodegeneration. PC derived from fusion events have two functional nuclei expressing their genetic information -one from the original neuron and the other from the BMC- (26). Therefore, the transplantation of BMC with a healthy or wild-type genotype (e.g. two copies of the *Nnal* gene), and the ensuing cell fusion can be considered a therapeutic tool for neurodegenerative diseases, rescuing neurons from cell death by restoring the expression of wild-type genes. In addition, cells derived from cell fusion can release antiapoptotic, neuroprotective or proliferating factors, which provide additional therapeutic benefits to the surrounding tissue (1).

Tissue inflammation encourages the fusion of BMC and PC (14,17), but in our experiments, apoptotic PC and reactive gliosis were undetectable at the time of sacrifice. Moreover, we identified a decrease in PC numbers only at P300 but not at P150. Therefore, a different signal must be responsible for the migration of BMC to the encephalon in *+/pcd* mice; a signal that does not elicit a glial reaction or massive apoptosis. Our results suggest that PC death in *+/pcd* mice is a slow and long-term process, characterized only by sporadic apoptosis. Consequently, such neurodegeneration can proceed for a long period of time before a loss of PC is detected.

Previous experiments in our laboratory have revealed that pre-neurodegeneration phenomena are present before cell death takes place, both in the olfactory bulb and in the cerebellum of homozygous PCD mice (3,23). These phenomena involve transcriptional changes and gene silencing. It is therefore possible that

7. Doulazmi, M.; Capone, F.; Frederic, F.; Bakouche, J.; Lemaigre-Dubreuil, Y.; Mariani, J. Cerebellar purkinje cell loss in heterozygous rora<sup>+/-</sup> mice: a longitudinal study. *J. Neurogenet.* 20:1-17; 2006.
8. Doulazmi, M.; Hadj-Sahraoui, N.; Frederic, F.; Mariani, J. Diminishing Purkinje cell populations in the cerebella of aging heterozygous Purkinje cell degeneration but not heterozygous nervous mice. *J. Neurogenet.* 16:111-123; 2002.
9. Fernández-González, A.; La Spada, A. R.; Treadaway, J.; Higdon, J. C.; Harris, B. S.; Sidman, R. L.; Morgan, J. I.; Zuo, J. Purkinje cell degeneration (pcd) phenotypes caused by mutations in the axotomy-induced gene, *Nna1*. *Science* 295:1904-1906; 2002.
10. Gómez, C.; Briñón, J. G.; Valero, J.; Recio, J. S.; Murias, A. R.; Curto, G. G.; Oriol L.; Colado, M. I.; Alonso, J. R. Sex differences in catechol contents in the olfactory bulb of control and unilaterally deprived rats. *Eur. J. Neurosci.* 25:1517-1528; 2007.
11. Gonzalo; S. Epigenetic alterations in aging. *J. Appl. Physiol.* 109:586-597; 2010.
12. Greer, C. A.; Shepherd, G. M. Mitral cell degeneration and sensory function in the neurological mutant mouse Purkinje cell degeneration (PCD). *Brain. Res.* 235:156-161; 1982.
13. Gussoni, E.; Soneoka, Y.; Strickland, C. D.; Buzney, E. A.; Khan, M. K.; Flint, A. F.; Kunkel, L. M.; Mulligan, R. C. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401:390-394; 1999.
14. Johansson, C. B.; Youssef, S.; Koleckar, K.; Holbrook, C.; Doyonnas, R.; Corbel, S. Y.; Steinman, L.; Rossi, F. M.; Blau, H. M. Extensive fusion of haematopoietic cells with Purkinje neurons in response to chronic inflammation. *Nat. Cell. Biol.* 10:575-583; 2008.
15. Lagasse, E.; Connors, H.; Al-Dhalimy, M.; Reitsma, M.; Dohse, M.; Osborne, L.; Wang, X.; Finegold, M.; Weissman, I.L.; Grompe, M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat. Med.* 6:1229-1234; 2000.
16. Lalonde, R.; Strazielle, C. Spontaneous and induced mouse mutations with cerebellar dysfunctions: behavior and neurochemistry. *Brain. Res.* 1140:51-74; 2007.
17. Magrassi, L.; Grimaldi, P.; Ibatici, A.; Corselli, M.; Ciardelli, L.; Castello, S.; Podesta, M.; Frassoni, F.; Rossi, F. Induction and survival of binucleated Purkinje neurons by selective damage and aging. *J. Neurosci.* 27:9885-9892; 2007.
18. Matsuda, R.; Yoshikawa, M.; Kimura, H.; Ouji, Y.; Nakase, H.; Nishimura, F.; Nonaka, J.; Toriumi, H.; Yamada, S.; Nishiofuku, M.; Moriya, K.; Ishizaka, S.; Nakamura, M.; Sakaki, T. Cotransplantation of mouse embryonic stem cells and bone marrow stromal cells following spinal cord injury suppresses tumor development. *Cell Transplant.* 18:39-54; 2009.
19. Milligan, E. D.; Watkins, L. R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev. Neurosci.* 10:23-36; 2009.
20. Mullen, R. J.; Eicher, E. M.; Sidman, R. L. *Purkinje cell degeneration*, a new neurological mutation in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73:208-212; 1976.
21. Recio, J. S.; Álvarez-Dolado, M.; Díaz, D.; Baltanás, F. C.; Piquer-Gil, M.; Alonso, J. R.; Weruaga, E. Bone marrow contributes simultaneously to different neural types in the central nervous system by different mechanisms of plasticity. *Cell Transplant.* In press; 2011.
22. Sakaguchi, S.; Katamine, S.; Nishida, N.; Moriuchi, R.; Shigematsu, K.; Sugimoto, T.; Nakatani, A.; Kataoka, Y.; Houtani, T.; Shirabe, S.; Okada, H.; Hasegawa, S.; Miyamoto, T.; Noda, T.

Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature* 380:528-531; 1996.

23. Valero, J.; Berciano, M. T.; Weruaga, E.; Lafarga, M.; Alonso, J. R. Pre-neurodegeneration 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; 2006.
24. Valero, J.; Weruaga, E.; Murias, A. R.; Recio, J. S.; Curto, G. G.; Gomez, C.; Alonso, J. R. Changes in cell migration and survival in the olfactory bulb of the *pcd/pcd* mouse. *Dev. Neurobiol.* 67:839-859; 2007.
25. Wang, T.; Morgan, J. I. The Purkinje cell degeneration (*pcd*) mouse: an unexpected molecular link between neuronal degeneration and regeneration. *Brain. Res.* 1140:26-40; 2007.
26. Weimann, J. M.; Johansson, C. B.; Trejo, A.; Blau, H. M. Stable reprogrammed heterokaryons form spontaneously in Purkinje neurons after bone marrow transplant. *Nat. Cell. Biol.* 5:959-966; 2003.
27. Yang, T.; Tsang, K. S.; Poon, W. S.; Ng, H. K. Neurotrophism of bone marrow stromal cells to embryonic stem cells: noncontact induction and transplantation to a mouse ischemic stroke model. *Cell Transplant.* 18:391-404; 2009.
28. Zanjani, H. S.; McFarland, R.; Cavelier, P.; Blokhin, A.; Gautheron, V.; Levenes, C.; Bambrick, L. L.; Mariani, J.; Vogel, M. W. Death and survival of heterozygous Lurcher Purkinje cells in vitro. *Dev. Neurobiol.* 69:505-517; 2009.

#### **Abbreviations:**

BMC	bone marrow-derived cells
CB	calbindin D-28k
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GFP	green fluorescent protein
PBS	phosphate-buffered saline
PC	Purkinje cells
PCD	Purkinje Cell Degeneration (mouse)
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP-biotin nick-end labeling

#### **Figure legends**

**Figure 1.** Analysis of the Purkinje cell density. **A**, chart showing the density of PC per mm between control and *+/pcd* mice at P150 and at P300; *+/pcd* mice at P300 undergo a decrease in these cells. Bars represent means  $\pm$  SEM. One asterisk indicates  $p < 0.05$  for statistically significant differences (Student's

*t* test). **B-E**, Neurolucida drawings of parasagittal sections of mouse vermis at P150 and at P300; each round dot represents one PC. Note the depletion of PC in the P300 *+/pcd* mouse.

**Figure 2.** Analysis of the transplant. **A**, chart showing the number of GFP positive PC at P150 and at P300; *+/pcd* mice show high numbers of such cells at both ages. Bars represent means  $\pm$  SEM. One asterisk indicates  $p < 0.05$  for statistically significant differences (Student's *t* test). **B**, GFP-positive PC (green) derived from a fusion event. Note the two nuclei (arrowheads) labelled with DAPI (blue). **C**, image of the cerebellar cortex of a *+/pcd* mouse. Note two GFP-positive PC (green). All Purkinje cells are labelled with calbindin (CB, red). **D**, apoptotic PC of a *+/pcd* animal at P300 labelled with TUNEL (green). All PC are labelled with calbindin (CB, red). **E-H**, immunostaining against GFAP (**E**, **G**) and Iba1 (**F**, **H**) to label astrocytes and microglia, respectively. Control animals (**E-F**) show no differences in comparison with *+/pcd* mice (**G-H**) for either marker.

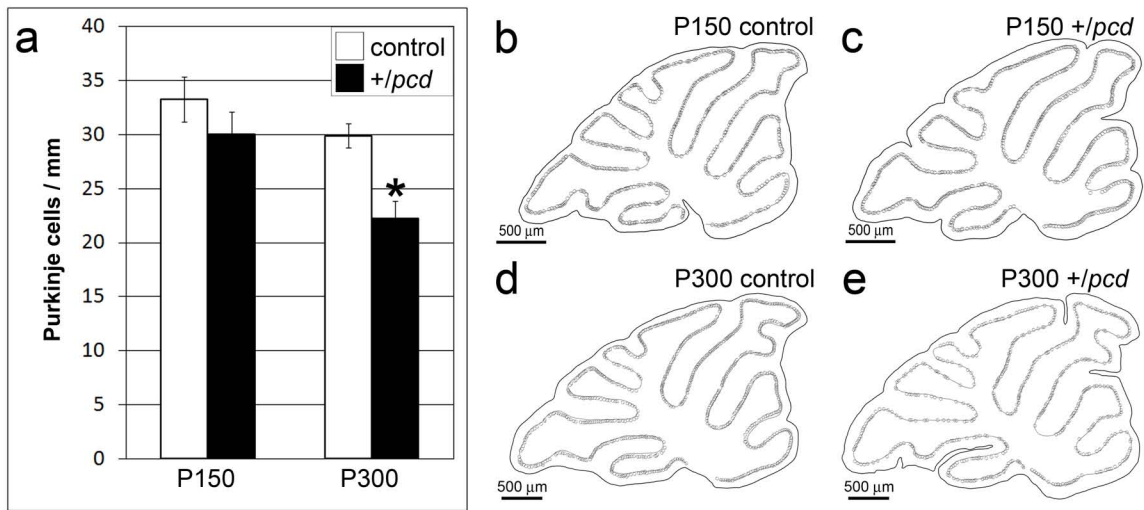


Figure 1. Analysis of the Purkinje cell density

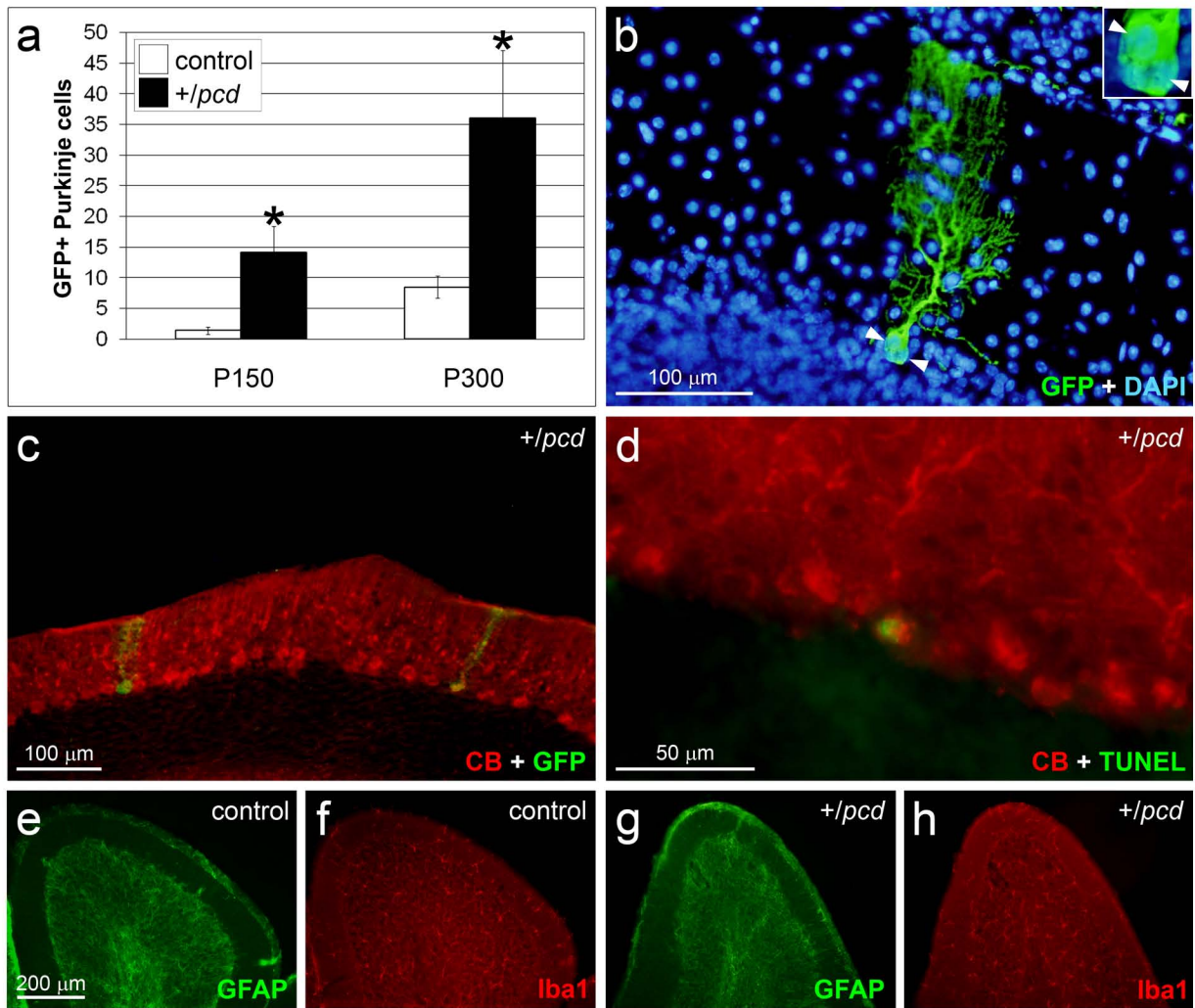


Figure 2. Analysis of the transplant



## **Effects of bone marrow transplantation in olfactive behavior of PCD mice.**

### **Authors' names and affiliations:**

Díaz D.<sup>1</sup>, Lepousez G.<sup>2</sup>, Gheusi G.<sup>2</sup>, Alonso J.R.<sup>1,3</sup>, Lledo P.M.<sup>2</sup>, Weruaga E.<sup>1,CA</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Cell plasticity and Neurorepair, Institute for Neuroscience of Castilla y León (INCyL), Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain.

<sup>2</sup>Laboratory for Perception and Memory, Institut Pasteur. 75015 Paris, France; Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) Unité de Recherche Associée 2182, 75015 Paris, France

<sup>3</sup>Instituto de Alta Investigación, Universidad de Tarapacá, Arica, Chile.

<sup>CA</sup>**Corresponding author:** Dr. Eduardo Weruaga, Institute for Neuroscience of Castilla y León, Universidad de Salamanca, C/ Pintor Fernando Gallego 1, E-37007, Salamanca, Spain; e-mail: [ewp@usal.es](mailto:ewp@usal.es); phone: +34 923 294500 ext. 5324; fax: + 34 923 294750

**Reprint requests:** Dr. Dr. Eduardo Weruaga, Institute for Neuroscience of Castilla y León, Universidad de Salamanca, C/ Pintor Fernando Gallego 1, E-37007, Salamanca, Spain; e-mail: [ewp@usal.es](mailto:ewp@usal.es); phone: +34 923 294500 ext. 5324; fax: + 34 923 294750

## ***Abstract***

### ***Introduction***

Aside from blood cell lineages, adult bone marrow cells have the capacity of transform into elements of different organs and tissues (Alvarez-Dolado, 2007; Krause et al., 2001; Wilson and Trumpp, 2006). The central nervous system does not constitute an exception; more than 10 years ago it has been demonstrated that bone marrow-derived (BMDC) can differentiate in to both neural and glial elements (Brazelton et al., 2000; Mezey et al., 2000). After these pioneer experiments, many groups have analyzed the arrival of the BMDC into the encephalon and its underlying mechanisms (Alvarez-Dolado et al., 2003; Bae et al., 2005; Corti et al., 2004; Espejel et al., 2009; Magrassi et al., 2007; Massengale et al., 2005; Priller et al., 2001). Accordingly, BMDC become into neural elements at least by two different mechanisms: cell fusion and transdifferentiation; moreover, both processes take place in the same animal depending on the cell type formed (Recio et al., 2011). These properties of the BMDC can be employed to develop therapeutic strategies aimed to introduce into the encephalon elements derived from a healthy bone marrow that can replace damaged cells, promote their survival or delay their loss in neurodegenerative diseases (Alvarez-Dolado, 2007; Bae et al., 2005; Bae et al., 2007; Rodriguez et al., 2007).

In the present study, we have employed the Purkinje cell degeneration (PCD) mutant mouse as a model of neurodegeneration. Animals with the *pcd* mutation suffer the dramatic loss of their Purkinje neurons, which leads to a severe cerebellar ataxia (Mullen et al., 1976; Wang and Morgan, 2007). In addition to this cell death, PCD mutant mice also experiment a later degeneration of certain thalamic neurons (O'Gorman and Sidman, 1985), the photoreceptors (Mullen and LaVail, 1975) and the mitral cells of the olfactory bulb (OB; Greer and Shepherd, 1982). However, PCD mice seem not to have affected the population of tufted cells, the other

projecting neurons of the OB, apart from the mitral cells (Bartolomei and Greer, 1998; Greer and Halasz, 1987; Greer and Shepherd, 1982; Recio et al., 2007). Regarding this topic, little is known about the olfactory capacity of these mice. BMDC have been demonstrated to arrive to the OB and become into interneurons (Brazelton et al., 2000; Corti et al., 2002; Recio et al., 2011), but the application of such cell plasticity as a therapeutic tool has been focused to other brain regions.

In the present study we have studied the effect of bone marrow cell transplantation in the neurodegenerating OB of the PCD mouse, analyzing both the OB tissue and the olfactory behavior in mutant and control animals. Moreover, we have also demonstrated that the transplant of a healthy, wild-type bone marrow in the PCD mice reduces the degeneration of mitral cells promoting their neuroprotection. In addition, the transplant increases the capacity of olfaction of mutant animals without affecting the olfactory behavior of control mice.

## ***Material and methods***

### **Animals**

Mice of the C57BL/DBA strain (*Mus musculus*, L. 1758) were used. The animals were housed at the Animal Facilities of the University of Salamanca at constant temperature and humidity, with a 12/12 hour photoperiod, and were fed *ad libitum* with water and special rodent chow (Rodent toxicology diet, B&K Universal G.J., S.L. Molins de Rei, Barcelona). Four groups of animals were employed (n=10 each), divided between transplanted or non-transplanted mice, and considering two different phenotypes within each group: i.e, wild-type and PCD.

Transgenic mice of the BALBc strain (Hadjantonakis et al., 1998) with constitutive green fluorescent protein (GFP) were also used as bone marrow donors for transplants. All donors were adult mice of about P60 age.

All animals were housed, manipulated and sacrificed in accordance with current European (86/609/ECC and directive 2003/65/CE) and Spanish legislation (RD 1201/2005 and law

32/2007) and the experiments were approved by the Bioethical Committee of the University of Salamanca and the Pasteur Institute.

### **Irradiation of mice**

Whole animals were irradiated with a gamma irradiation device with a  $^{137}\text{Cs}$  source, model Gammacell 1000 Elite (MDS Nordion, Ottawa, Canada). This device provides a radiation rate of 243 cGy/min, with an energy of 0.662 MeV. Mice were irradiated at the postnatal day 19 (P19) with a dose of 7.5 Gy, minimal radiation enough to ablate their bone marrow (Diaz et al., 2011). After the irradiation, the mice were housed separately in an insulated rack specific for immunodepressed animals at the Animal Facilities of the University of Salamanca for two weeks and thereafter under standard conditions.

### **Bone marrow transplantation**

GFP (green fluorescent protein) transgenic BALBc mice were used as donors. In these animals, the GFP is expressed constitutively and hence the incorporation of the transplant could be determined using flow cytometry analysis of peripheral blood (see below), and the fate of its cells could be followed because of their distinctive green fluorescent labeling under epifluorescence microscopy.

Donors were sacrificed by cervical dislocation. Then, their hind paws were removed and the femurs and tibias dissected. Bone marrow extraction was performed by injection of IMDM medium (Iscove's Modified Dulbecco's Medium; Invitrogen; Carlsbad, CA, USA) with an insulin syringe at both epiphyses of the bone. The bone marrow flush was filtered through a 70- $\mu\text{m}$  pore size filter (BD Falcon; Bedford, MA, USA) and centrifuged at 1,500 rpm for 5 min. The supernatant was removed and the pellet was re-suspended in lysis buffer (140 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 17 mM Tris-base, pH 7.4) for 5 min to break up erythrocytes. Following this, the reaction was stopped by adding 45 ml of 0.1 M phosphate-buffered saline, pH 7.4 (PBS), to each collection tube, and an aliquot was collected to estimate the number of BMSC extracted using a Thoma chamber. The cell suspension was centrifuged again at 1,500 rpm for 5 min and the pellet was

resuspended in PBS.  $7.5 \times 10^6$  cells were transplanted in each animal in a maximum volume of 150  $\mu$ l. The injection of BMSC was performed at P20 in the tail vein.

The BMSC remaining after the transplants were stained with Trypan Blue to determine their viability. These cells were subjected to the same manipulations as the injected ones and were therefore suitable for estimating the viability of the transplant. The criterion chosen for a complete viable and safe transplant was injecting more than 95% living cells.

Finally, some irradiated mice were not subjected to the transplantation process. These animals remained as irradiation controls to check the efficacy of the bone marrow ablation.

### **Graft monitoring**

The percentage of GFP-positive cells in peripheral blood was measured to check the correct assimilation of the transplant. Blood was extracted by means of a small prick in the supraorbital plexus two weeks after transplantation, once the period of isolation of the immunodepressed animals in the rack had ended. Blood samples (approximately 50  $\mu$ l) were collected in 100  $\mu$ l of heparinized saline (1000 U/ml in 0.9% p/v NaCl). Erythrocytes were destroyed with 6 ml of a specific lysis buffer (0.83% w/v  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.1% w/v  $\text{KHCO}_3$ , 0.372 % w/v EDTA, pH 7.3) for 20 min. Then, the cell suspension was centrifuged at 1,500 rpm for 5 min and the supernatant was removed. The pellet was resuspended in PBS and centrifuged again at 1,500 rpm for 5 min, and the resulting pellet was again resuspended in 1 ml of PBS. The percentage of GFP-positive cells was determined by flow cytometry (FACSCalibur, Becton Dickinson; NJ, USA). These procedures were repeated four and six weeks after transplantation and at the time of sacrifice (Supplementary figure 1).

### **Behavioral apparatus and odorants**

Mice were trained in computer-controlled eight-channel olfactometers functionally identical to those described in detail by Bisulco and Slotnick (2003). Briefly, solenoid pinch valves controlled air streams. Odors were generated by passing a 50 ml/min stream of air over the surface of mineral oil-diluted odorants in disposable 50 ml centrifuge tubes (saturation tubes).

This odorized air was diluted 1:40 in odor-free air before its introduction into an odor sampling tube in the mouse operant chamber. Before use or the introduction of a new odorant, the olfactometer was washed with 95% ethanol and air-dried. Similarly, before the test of each animal, the mouse operant chamber was also cleaned with 95% ethanol and air-dried. Each odorant liquid was refreshed daily.

The odorants employed were (+)-carvone (98,5%; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and (-)-carvone (99%; Sigma-Aldrich). All the odorants used were diluted in odorless mineral oil to the desired concentration, and 10 ml of this solution was used as the odorant source in the odor saturation tubes. Odorant concentrations are given as this dilution of the odorant in the mineral oil of the saturation tubes: i.e  $10^{-1}$ . The 50 ml/min odorant vapor from the saturation tube was mixed with 1950 ml/min clean air before its introduction into the sampling port. Thus, the odor concentration delivered to the sampling port was 2.5% that of the headspace above the odorant solution in the saturation tubes, being the surface concentrations of hydrocarbons from mineral oil dilutions proportional to their liquid dilution (Cometto-Muniz et al., 2003).

### **Behavioral tests**

For single odorant detection tests, partially water-deprived mice were trained using an operant conditioning go/no-go paradigm in the olfactometers as described by Bodyak and Slotnick (1999). Standard operant conditioning methods were used to train mice to insert their snouts into the odor sampling port and to respond by licking the water delivery tube (located within the odor sampling port) in the presence of an odorant, (+)-carvone (positive stimulus: S+). They were also trained to renounce from responding to the absence of odorant (i. e., odorless air from tubes with only mineral oil (negative stimulus: S-). In each trial, a single stimulus (S+ or S-) was presented. If the response criterion (licking) was met in S+ trials, a 3  $\mu$ l droplet of water was given as a reward and the trial was scored as “hit”, whereas failing to meet the response criterion was scored as “miss”.

Meeting the response criterion in S- trials was scored as “false alarm”, and failing to make a criterion response was scored as “correct rejection”. Trials in which the mouse did not keep its

snout in the odor sampling port for at least 0.1 s after odor onset were aborted and counted as “short sample trials”. S+ and S- trials were presented in a modified random order, thus each block of 20 trials contained equal numbers of each type of trial and no one type of trial was presented more than three times consecutively. In addition, animals had to wait a minimum of 5 seconds outside the odor sampling port before starting another trial. The percentage of appropriate responses was determined for each block of 20 trials [(hits + correct rejections)/20 x 100]. Each mouse underwent a session of 10 blocks (200 trials) per day. Mice were previously trained with a concentration of  $10^{-2}$  (+)-carvone in mineral oil, reaching a plateau of accuracy when they had understood the task (supplementary figure 3 A). Then, different dilutions of odorant were employed to determine the capacity of odor detection of mice. Concentrations of (+)-carvone in mineral oil of [ $10^{-1}$ ], [ $10^{-2}$ ], [ $10^{-3}$ ], [ $10^{-4}$ ] and [ $10^{-5}$ ] were tested.

For odorant discrimination tests, two odorants were employed: (+)-carvone as S+ and (-)-carvone as S-. Taking into account the results obtained with the detection tests (see *Results*), the concentration chosen for both odorants was [ $10^{-1}$ ]. In the first test, both stimuli were presented completely separated. Then, in the subsequent sessions, odorants were mixed progressively. In the second test 80% (+)-carvone / 20% (-)-carvone was the S+, and 80% (-)-carvone / 20% (+)-carvone the S-. In the third discrimination test, the ratio of mixture for both odorants was 68/32%; and in the fourth, 56/44%. As in the odorant detection tests, each mouse underwent a session of 10 blocks (200 trials) per day, testing each day one mixture of odorants.

The reaction time of the correct rejections was also measured. This parameter allows the detection of possible motor or behavioral problems that can interfere with the execution of the olfactory tests. Therefore, this parameter was estimated at odor concentrations of [ $10^{-1}$ ], when all of the animals can detect properly the odorants employed. Consequently, the reaction time for each mouse in each analyzed session was the average of the reaction time of the performed correct rejections.



## **Tissue preparation**

Animals were deeply anaesthetized with 10  $\mu$ l/g b.w. of a mixture (3:4) containing ketamine hydrochloride (Ketolar; Parke-Davis, Barcelona, Spain) and xylazine hydrochloride (Rompun; Bayer, Leverkusen, Germany). Then, the animals were perfused intracardially with a 0.9% w/v NaCl, followed by 5 ml/g b.w. of 4% w/v of depolymerized paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer (PB). After perfusion, the brains were dissected, postfixed for 2 hours with the same fixative and washed with 0.1M PB. Tissue blocks were cryoprotected by immersing them overnight in 30% (w/v) sucrose in 0.1M PB. When the blocks had sunk, they were frozen with liquid nitrogen and stored at -80°C until sectioning. Forty- $\mu$ m thick slices were obtained using a freezing-sliding microtome (Jung SM 2000, Leica Instruments, Nussloch, Germany) attached to a freezing unit (Frigomobil, Leica Instruments) and rinsed in 0.1M PB (3 x 10 min).

## **Immunofluorescence**

Immunofluorescence technique against GFP was carried out in order to detect bone marrow-derived cells in the OB. Mitral and microglial cells were also labeled using antibodies against reelin and Iba1, respectively (Okuyama-Yamamoto et al., 2005). Tissue slices were washed in PBS and incubated overnight at room temperature under continuous rotary shaking in a medium containing 0.2% (w/v) Triton X-100, 5% (v/v) normal donkey serum, and the primary antibodies in PBS. An anti-GFP polyclonal goat IgG (1:2,000; Abcam, Cambridge, UK) was employed to label bone marrow-derived cells, an anti-reelin monoclonal mouse IgG (1:1,000; Chemicon, Temecula, CA, USA) was used to detect mitral cells, and an anti-Iba1 polyclonal rabbit IgG (1:1,000; Wako, Osaka, Japan) was utilized to label microglia. Then, the sections were washed in PBS (3 x 10 min) and incubated in a second medium for 2 hours at room temperature under continuous rotary shaking. This second medium contained 0.2% (w/v) Triton X-100, secondary Cy2-conjugated donkey anti-goat fluorescent antibody (1:500; Jackson, West Grove, PA, USA), Cy3-conjugated donkey anti-mouse fluorescent antibody (1:500; Jackson), and Cy5-conjugated donkey anti-rabbit fluorescent antibody (1:500; Jackson) in PBS. Thirty

min before the end of the incubation, 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma-Aldrich) 1:2,000 (v/v) was added to the medium to counterstain the cell nuclei.

Finally, sections were rinsed in the darkness in PBS and mounted with coverslips using a freshly prepared anti-fade medium made of 0.42% (w/v) glycine, 0.021% (w/v) sodium hydroxide, 0.51% (w/v) sodium chloride, 5% (w/v) *N*-propyl-gallate, 70% (v/v) glycerol, and 0.002% (w/v) thymerosal in distilled water (Valero et al., 2005). Specificity controls were carried out in parallel with the immunofluorescence technique, using the same procedures without the first or the second antibodies. No labeling was detected in these controls.

### **Analyses**

For the behavioral tests, homoscedasticity (quality of samples with normal distribution and equal variances) was checked with the Kolmogorov-Smirnov test. Consequently, the ANOVA was employed to analyze possible differences among the percentage of correct responses of the different experimental groups, both for the different dilutions of the odorant (detection tests) or for the different ratios of odorant mixtures (discrimination tests). Thereafter, *post hoc* tests were applied to detect differences between experimental groups (SPSS 17.0 for Windows, SPSS, Chicago, IL, USA). The same analyses were performed with the results of the reaction time.

For the histological analysis, each OB was sectioned in six consecutive series and one of them was used to perform quantitative analysis. Thus, a one-in-six series was studied in each animal. Photographs of each slice were taken with an Olympus DP70 digital camera (Olympus Optical, Tokyo, Japan) attached to an Olympus Provis AX70 photomicroscope (Olympus Optical). Estimation of the mitral cell density was referred as the number of mitral cell per mm of the mitral cell layer. Both parameters were measured using the NeuroLucida (V8.23, MicroBrightField, Colchester, VT, USA) and Neuroexplorer programs (V4.70.3, MicroBrightField) following the same procedure as described in previous reports (Valero et al., 2007). All counts were performed by the same person (D.D.), following the same criteria.

Once homoscedasticity had been checked with the Kolmogorov-Smirnov test, the Student's *t* test was employed to analyze possible differences between the transplanted and non-transplanted PCD mice.

## ***Results***

### **Efficiency of the transplant**

After the extraction of donor bone marrow cells and their injection, the remaining cells of the suspension for the transplants were stained with Trypan Blue (see *Material and Methods*) to label dead cells. Since only a few cells incorporated this dye, it was concluded that the vast majority (more than 95%) of the transplanted cells were alive and, therefore, suitable for an efficient engraftment. Moreover, after the radiation and transplantation processes, only the grafted mice survived whereas the animals taken as controls of irradiation (without transplantation) died. Finally, the results concerning the analysis of the peripheral blood by flow cytometry demonstrated an increasing percentage of GFP-positive donor-derived blood cells (supplementary figure 1). These data suggest the reposition of the ablated bone marrow by the grafted cells and therefore, the efficacy of the transplantation.

### **Integration of the BMDC into the brain. Neuroprotective effect of the transplant**

The first analysis of the OB of the transplanted animals revealed that the vast majority of the BMDC were microglia, both in control and in PCD animals (figure 1 A-C and supplementary figure 2). The immunolabelling for the protein reelin revealed the morphology of the mitral cell layer allowing the analysis and the quantification of these cells (supplementary figure 2). Moreover, the double immunohistochemistry against this marker and the GFP demonstrated that, in any case, no mitral cells were derived from the transplanted bone marrow (supplementary figure 2).

The quantification of the mitral cells of the PCD mice along different survival ages demonstrated a different process of neurodegeneration in the non-grafted and grafted animals (figure 1 D-F). Transplanted PCD mice seemed to have a slower mitral cell loss than the non-

grafted animals (figure 1 F), showing significant differences in the mitral cell density at P150 (figure 1 D-F). Accordingly, we have chosen this age to perform the behavioral tests.

### **Effects of the transplant in the capacity of olfaction**

In the training sessions, the animals were trained to recognize the (+)-carvone as S+, at a dilution of  $10^{-2}$  in mineral oil. Along these sessions, the mice increased their scores in the task execution till they reached a plateau (supplementary figure 3 A). The score level of this plateau was notably lower for the non-grafted PCD mice (supplementary figure 3 A), and it can suggest a problem of learning. However, the average block number at which the mice reached this plateau showed not significant differences amongst the experimental groups (figure 2 A), pointing to a similar learning level, but to differences in the detection capacity.

After these training sessions, animals were tested to detect the (+)-carvone at decreasing concentrations. We decided to increase the concentration of the odorant for the first session of this test, since the learning plateau of the non-grafted PCD mice reached a score lower than the other groups. Therefore, the first concentration chosen for the (+)-carvone was  $10^{-1}$ . At this level of the odorant all the mice reached scores of 85% or higher (Figure 2 B), demonstrating their capacity for detecting properly the (+)-carvone at a dilution of  $10^{-1}$ . Interestingly, the statistical analysis revealed differences only between the non-grafted control and PCD mice (figure 2 B). At the dilution of  $10^{-2}$  the non-grafted PCD mice showed a significant lower accuracy in comparison with the other three groups, which kept scores of 85% or higher. At the dilutions of  $10^{-3}$  and  $10^{-4}$  both groups of PCD mice showed a significant lower accuracy than the control ones, which still reached scores of 85% (figure 2 B). Finally, at a dilution of  $10^{-5}$ , the scores of the control groups diminished to the level of the PCD ones, and no statistical differences among the four experimental groups were detected (figure 2 B).

Concerning the odor discrimination tests, the (+)-carvone was employed as S+ whereas the (-)-carvone was used as S-. Taking into account the capacity of detection of the non-grafted PCD mice, the dilution for both odorants was  $10^{-1}$  in order to allow all the mice their detection. The results of this test without mixing odorants and at a level of mixture of 80%-20% (see *Material and Methods*) were identical: only significant differences were detected between the non-grafted

PCD mice and the non-grafted control animals, but all the mice reached a level of discrimination of 85% (figure 2 C). With an odorant mixture of 68%-32%, the mice showed a decrease in the accuracy, especially in both PCD groups. In this session, both control groups presented a significant better discrimination than the PCD ones (figure 2 C). At the same time, the grafted PCD mice also showed a higher score than the non-grafted PCD animals (figure 2 C). Finally, with a mixture of 56%-44%, significant differences were detected between the two groups of control mice and the two groups of PCD mice (figure 2 C).

Regarding the phenotype of the PCD mice, the cerebellar ataxia could affect the execution of the behavioral tests, interfering into the results. To check this issue, we have measured the reaction time in the execution of the “correct rejections”, as an indicative parameter of the motor capacity of mice to perform the olfactory tests. Obviously, this reaction time was measured at odorant concentrations of  $10^{-1}$ , when all the mice were able to detect the odorants. No significant differences were detected among the four experimental groups (figure 2 D), suggesting that the ataxia of PCD mice had no influence in the execution of the olfactory tests. In addition, the analysis of the reaction time along the discrimination tests showed a progressive increasing of this parameter, especially for the PCD mice (supplementary figure 3 B), as a consequence of the increasing difficulty of the task. Moreover, both PCD groups showed significant differences with the control animals at the level of odorant mixture of 56%-44%, when the capacity of discrimination of PCD mice was significant lower than the control animals (figure 2 D and supplementary figure 3 B).

## ***Discussion***

### **The transplantation of bone marrow cells is safe and effective**

Radiation is one of the most employed methodologies for performing experiments of bone marrow transplantation (Alvarez-Dolado et al., 2003; Espejel et al., 2009; Johansson et al., 2008; Magrassi et al., 2007; Massengale et al., 2005; Priller et al., 2001). In our experiments we have chosen a dose of 7.5 Gy that has been demonstrated enough to ablate the bone marrow, causing few secondary effects, as a minimal lethal dose (Diaz et al., 2011; Recio et al., 2011).

This fact has been demonstrated by the death of the mice employed as controls of radiation. On the other hand, the long-term survival of all the transplanted mice and the progressive formation of GFP-positive blood cells demonstrated the safety and the efficacy of the transplant, as previously described (Diaz et al., 2011; Recio et al., 2011). No differences in this increase of GFP- positive blood cells were observed between PCD and control mice, suggesting that the *pcd* mutation did not affect the progressive incorporation of the BMDC. Thus, the transplant was suitable for the mutant animals as well as for the control ones.

#### **Healthy bone marrow transplantation increases the survival of mitral cells in PCD mice**

Regarding the contribution of BMDC to the neural population of the OB, the vast majority of BMDC in this region was the microglia, (Diaz et al., 2011; Massengale et al., 2005; Recio et al., 2011), but these cells can also transdifferentiate into interneurons (Brazelton et al., 2000; Corti et al., 2002; Recio et al., 2011). Additionally, in the present study we have demonstrated the effect of the transplantation in the neurodegeneration of mitral cells. The progressive decrease of mitral cell density in non-grafted PCD mice fits entirely with that previously reported (Valero et al., 2007). By contrast, the mitral cell loss of the grafted PCD mice seemed to be milder or, at least, slower. We have not detected any bone marrow-derived mitral cell either in control or PCD grafted animals, suggesting that the differences in mitral cell density of the mutant groups are not related with new mitral cell formation. However, it has been previously demonstrated that a healthy transplanted bone marrow can release different chemokines and cytokines which promote the survival of neurons (Chen et al., 2003; Chopp et al., 2008; Li et al., 2006). In addition, it has been also proposed that bone marrow-derived microglia can also release neuroprotective substances (Rodriguez et al., 2007). Thus, since microglia is the most abundant BMDC in the OB, its putative neuroprotective effect has to be taken into account.

#### **Healthy bone marrow transplantation ameliorates the olfactory deficits of PCD mice**

To our knowledge, this is the first time that the olfactory capacity of PCD mice is studied, at least employing an olfactometer, which provides a consistent and reliable analysis. In addition, the use of these apparatus also excludes the influence of the cerebellar ataxia, feature of these mutant animals. Our results demonstrated that both the detection and discrimination of odorants

were affected in the PCD mice. These mutant mice experience a selective neurodegeneration of the mitral cells, remaining intact the other population of OB projection interneurons, the tufted cells (Greer and Shepherd, 1982). In addition, the neurodegeneration of PCD mice is postnatal, the animals being phenotypically normal at birth, lacking phenomena of compensation during the development. Therefore, the defects in the olfactory capacity of PCD mice are due exclusively to the postnatal mitral cell loss. Moreover, we have discarded the possibility of an interference of the PCD ataxia in the execution of tests. All the mutant animals were able to reach scores of 85% or higher, similar to the control mice one. This accuracy corresponded to the easiest tests, i.e. at the highest odorant concentration ( $10^{-1}$ ) in the detection tests, and without mixture of odorants or at their lowest combination (80% / 20%) in the discrimination tests. In addition, the reaction time for all mice groups was similar in those tests when all the animals made a good execution of the tasks (85% or higher). Logically, this time increased when the difficulty of tests rose, because animals needed more time to discriminate the odorants. Following this reasoning, only significant differences between PCD and control mice were detected at the odorant mixture of 56% / 44%, when both PCD groups did not discriminate as well as the control ones.

Regarding the two groups of mutant animals, our findings have also revealed that transplanted PCD mice experience an improvement in their olfactory capacity, both in the detection and the discrimination parameters. The grafted PCD mice also showed a certain neuroprotection on their mitral cells, having a milder or slower neurodegeneration than the non-grafted mutant animals. Other OB neuronal populations that can be affected by the bone marrow transplantation are the interneurons. The transdifferentiation of BMDC into these OB cells has been previously demonstrated (Brazelton et al., 2000; Corti et al., 2002; Recio et al., 2011). However, the number of these bone marrow-derived interneurons was scarce and, although the neurodegenerative microenvironment of the PCD animals increases the formation of bone marrow-derived microglia, the interneurons formation was not affected (Recio et al., 2011). Taking these data into account, we can hypothesize that the neuroprotection of the mitral cells - provided by the healthy bone marrow transplantation- is the responsible of the amelioration in

the olfactory deficits. In addition, the similar reaction time of both PCD groups discards any influence of a possible bone marrow transplantation effect in the motor behavior of animals.

Summarizing the previous data, PCD mice, which have a very small population of mitral cells, are capable of detect odorants at relative high concentrations, and make odor easy odor discriminations. Grafted PCD mice, which have a higher mitral cell density than the former, can detect lower odorant concentrations and have a higher discrimination capacity than the non-grafted PCD animals. Taking this data into account, we can assume that mitral cells are not indispensable for a coarse odor detection or discrimination, being enough other projection neurons. However, mitral cells are necessary for a much more refined and acute olfactory capacity.

Finally, previous findings have demonstrated that similar radiation doses as those employed in the present work have a deleterious effect on the neurogenesis of the OB (Diaz et al., 2011; Lazarini et al., 2009), leading to a dramatic reduction of the OB volume (Diaz et al., 2011). However, we have not detected any difference in the olfactory tests between the two control groups, excluding the influence of the mutation and the therapeutic effect of the bone marrow transplantation. The decrease of the OB volume due to the radiation was detected at P300, but not at P150 (Diaz et al., 2011), age employed for this work. In addition, it has been demonstrated that the changes in cell proliferation in the OB can affect the long-term olfactory memory, but not the capacity of olfaction itself (Lazarini et al., 2009).

### **Final remarks**

Our results have revealed that the bone marrow cells transplantation is safe and effective for provide a neuroprotection in a neurodegenerative environment. This protection had a significant effect in the olfaction capacity, noteworthy sense for rodents. Thus, this work supposes a further step in the cell therapy field, by means of providing new strategies for putative regenerating treatments, useful for ameliorate the symptoms of other neurodegenerative diseases.

### **Aknowledgements**

This work was supported by the Ministerio de Investigación y Ciencia (BFU2010-18284), the Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad (“Plan Nacional Sobre Drogas”), the Junta de



Castilla y León, the Centre for Regenerative Medicine and Cell Therapy of Castilla y León, the Fundación Samuel Solórzano, the University of Salamanca, the Fondation pour la Recherche Médicale ("Equipe FRM"), the Groupe Arpège, the Agence Nationale de la Recherche (ANR-2007-SEST-015 03), and the Ecole des Neurosciences de Paris. The authors also express their gratitude to N. Skinner and Kerren Murray for revising the English version of the manuscript. The authors have no conflicts of interest.

## Reference List

Álvarez-Dolado M. Cell fusion: biological perspectives and potential for regenerative medicine. *Front. Biosci.* 12:1-12. 2007.

Álvarez-Dolado M, Pardal R, García-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, Lois C, Morrison SJ, Álvarez-Buylla A. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 425:968-973. 2003.

Bae JS, Furuya S, Shinoda Y, Endo S, Schuchman EH, Hirabayashi Y, Jin HK. Neurodegeneration augments the ability of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to fuse with Purkinje neurons in Niemann-Pick type C mice. *Hum. Gene Ther.* 16:1006-1011. 2005.

Bae JS, Han HS, Youn DH, Carter JE, Mado M, Schuchman EH, Jin HK. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote neuronal networks with functional synaptic transmission after transplantation into mice with neurodegeneration. *Stem Cells* 25:1307-1316. 2007.

Bartolomei JC, Greer CA. The organization of piriform cortex and the lateral olfactory tract following the loss of mitral cells in PCD mice. *Exp. Neurol.* 154:537-550. 1998.

Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 290:1775-1779. 2000.

Chen J, Li Y, Katakowski M, Chen X, Wang L, Lu D, Lu M, Gautam SC, Chopp M. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. *J. Neurosci. Res.* 73:778-786. 2003.

Chopp M, Li Y, Zhang J. Plasticity and remodeling of brain. *J. Neurol. Sci.* 265:97-101. 2008.

Cometto-Muniz JE, Cain WS, Abraham MH. Quantification of chemical vapors in chemosensory research. *Chem. Senses* 28:467-477. 2003.

Corti S, Locatelli F, Donadoni C, Guglieri M, Papadimitriou D, Strazzer S, Del BR, Comi GP. Wild-type bone marrow cells ameliorate the phenotype of SOD1-G93A ALS mice and contribute to CNS, heart and skeletal muscle tissues. *Brain* 127:2518-2532. 2004.

Corti S, Locatelli F, Strazzer S, Salani S, Del Bo R, Soligo D, Bossolasco P, Bresolin N, Scarlato G, Comi GP. Modulated generation of neuronal cells from bone marrow by expansion and mobilization of circulating stem cells with in vivo cytokine treatment. *Exp. Neurol.* 177:443-452. 2002.

Díaz D, Recio JS, Baltanás FC, Gómez C, Weruaga E, Alonso JR. Long-lasting changes in the anatomy of the olfactory bulb after ionizing irradiation and bone marrow transplantation. *Neuroscience* 173:190-205. 2011.

Espejel S, Romero R, Álvarez-Buylla A. Radiation damage increases Purkinje neuron heterokaryons in neonatal cerebellum. *Ann. Neurol.* 66:100-109. 2009.

Greer CA, Halász N. Plasticity of dendrodendritic microcircuits following mitral cell loss in the olfactory bulb of the murine mutant Purkinje cell degeneration. *J. Comp. Neurol.* 256:284-298. 1987.

Greer CA, Shepherd GM. Mitral cell degeneration and sensory function in the neurological mutant mouse Purkinje cell degeneration (PCD). *Brain Res.* 235:156-161. 1982.

Johansson CB, Youssef S, Koleckar K, Holbrook C, Doyonnas R, Corbel SY, Steinman L, Rossi FM, Blau HM. Extensive fusion of haematopoietic cells with Purkinje neurons in response to chronic inflammation. *Nat. Cell Biol.* 10:575-583. 2008.

Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105:369-377. 2001.

Lazarini F, Mouthon MA, Gheusi G, de CF, Olivo-Marin JC, Lamarque S, Abrous DN, Boussin FD, Lledo PM. Cellular and behavioral effects of cranial irradiation of the subventricular zone in adult mice. *PLoS One* 4:e7017. 2009.

Li Y, McIntosh K, Chen J, Zhang C, Gao Q, Borneman J, Raginski K, Mitchell J, Shen L, Zhang J, Lu D, Chopp M. Allogeneic bone marrow stromal cells promote glial-axonal

remodeling without immunologic sensitization after stroke in rats. *Exp. Neurol.* 198:313-325. 2006.

Magrassi L, Grimaldi P, Ibatici A, Corselli M, Ciardelli L, Castello S, Podesta M, Frassoni F, Rossi F. Induction and survival of binucleated Purkinje neurons by selective damage and aging. *J. Neurosci.* 27:9885-9892. 2007.

Massengale M, Wagers AJ, Vogel H, Weissman IL. Hematopoietic cells maintain hematopoietic fates upon entering the brain. *J. Exp. Med.* 201:1579-1589. 2005.

Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 290:1779-1782. 2000.

Mullen RJ, Eicher EM, Sidman RL. Purkinje cell degeneration, a new neurological mutation in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:208-212. 1976.

Mullen RJ, LaVail M. Two types of retinal degeneration in cerebellar mutant mice. *Nature* 258:528-530. 1975.

O'Gorman S, Sidman RL. Degeneration of thalamic neurons in "Purkinje cell degeneration" mutant mice. I. Distribution of neuron loss. *J. Comp. Neurol.* 234:277-297. 1985.

Okuyama-Yamamoto A, Yamamoto T, Miki A, Terashima T. Changes in reelin expression in the mouse olfactory bulb after chemical lesion to the olfactory epithelium. *Eur. J. Neurosci.* 21:2586-2592. 2005.

Priller J, Persons DA, Klett FF, Kempermann G, Kreutzberg GW, Dirnagl U. Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo. *J. Cell Biol.* 155:733-738. 2001.

Recio JS, Álvarez-Dolado M, Díaz D, Baltanás FC, Piquer-Gil M, Alonso JR, Weruaga E. Bone marrow contributes simultaneously to different neural types in the central nervous system through different mechanisms of plasticity. *Cell Transplant.* 2011.

Recio JS, Weruaga E, Gómez C, Valero J, Briñón JG, Alonso JR. Changes in the connections of the main olfactory bulb after mitral cell selective neurodegeneration. *J. Neurosci. Res.* 85:2407-2421. 2007.

Rodriguez M, Alvarez-Erviti L, Blesa FJ, Rodriguez-Oroz MC, Arina A, Melero I, Ramos LI, Obeso JA. Bone-marrow-derived cell differentiation into microglia: a study in a progressive mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 28:316-325. 2007.

Valero J, Weruaga E, Murias AR, Recio JS, Alonso JR. Proliferation markers in the adult rodent brain: bromodeoxyuridine and proliferating cell nuclear antigen. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* 15:127-134. 2005.

Valero J, Weruaga E, Murias AR, Recio JS, Curto GG, Gómez C, Alonso JR. Changes in cell migration and survival in the olfactory bulb of the pcd/pcd mouse. *Dev. Neurobiol.* 67:839-859. 2007.

Wang T, Morgan JI. The Purkinje cell degeneration (pcd) mouse: an unexpected molecular link between neuronal degeneration and regeneration. *Brain Res.* 1140:26-40. 2007.

Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat. Rev. Immunol.* 6:93-106. 2006.

## Figure legends

**Figure 1.** Effects on cell transplantation of bone marrow cells in the OB. A-C, arrival of GFP bone marrow-derived cells (green) to the OB. The vast majority of these cells are microglia (labeled with Iba1, red). All nuclei are counterstained with DAPI (blue). D, E. Mitral cells in PCD (D) and grafted PCD mice (E) labeled with reelin (red). Note the higher density of mitral cells in the OB of grafted animals. F. Chart showing the density of mitral cells in PCD and grafted PCD animals through time. Grafted PCD mice show slower mitral cell loss. Each point represents the mean  $\pm$  SEM. Two asterisks indicate  $p < 0.01$  for statistically significant differences (Student's  $t$  test). GL, glomerular layer; EPL, external plexiform layer; ML, mitral cell layer; GCL, granule cell layer.

**Figure 2.** Charts showing the learning and execution of the behavioral tests. A. During the block of training sessions, the mice reached a learning plateau. The average maximum scores after which animals did not show an increase in the training sessions are given for each group. B. Detection tests. Scores obtained at different dilutions of the odorant, carvone (+). C. Discrimination tests. Scores obtained with different ratios of carvone (+) and carvone (-) odorants at a dilution of  $10^{-1}$ . D. Reaction time of “correct retreat” responses in the first discrimination test (without mixture of odorants). Each point represents the mean  $\pm$  SEM. Two asterisks indicate  $p < 0.01$ ; a pound symbol indicates  $p < 0.05$  where the only statistically significant difference is between the control and PCD animals (ANOVA analysis with Bonferroni and Student-Newman-Keuls tests).

**Supplementary figure 1.** Percentage of GFP-positive white blood cells out of the total 2, 4 and 6 weeks after the transplant, and before sacrifice at P150. Each point represents the mean  $\pm$  SEM.

**Supplementary figure 2.** Panoramic view of an OB of a grafted control mouse. GFP bone marrow-derived cells (green; A, C) are spread throughout the entire OB and have microglial morphology (A, magnification). Mitral cells are labeled with reelin (red; B, C).

**Supplementary figure 3.** A. Learning curves of each experimental group in training sessions. The mice reached a plateau after which they did not show an increase in the score obtained. No statistical analysis was performed. B. Reaction time through the discrimination tests. Note the increase of the score in the most difficult tasks, especially for PCD groups. One asterisk indicates  $p < 0.05$ ; for statistically significant differences (ANOVA analysis with Bonferroni and Student-Newman-Keuls tests).

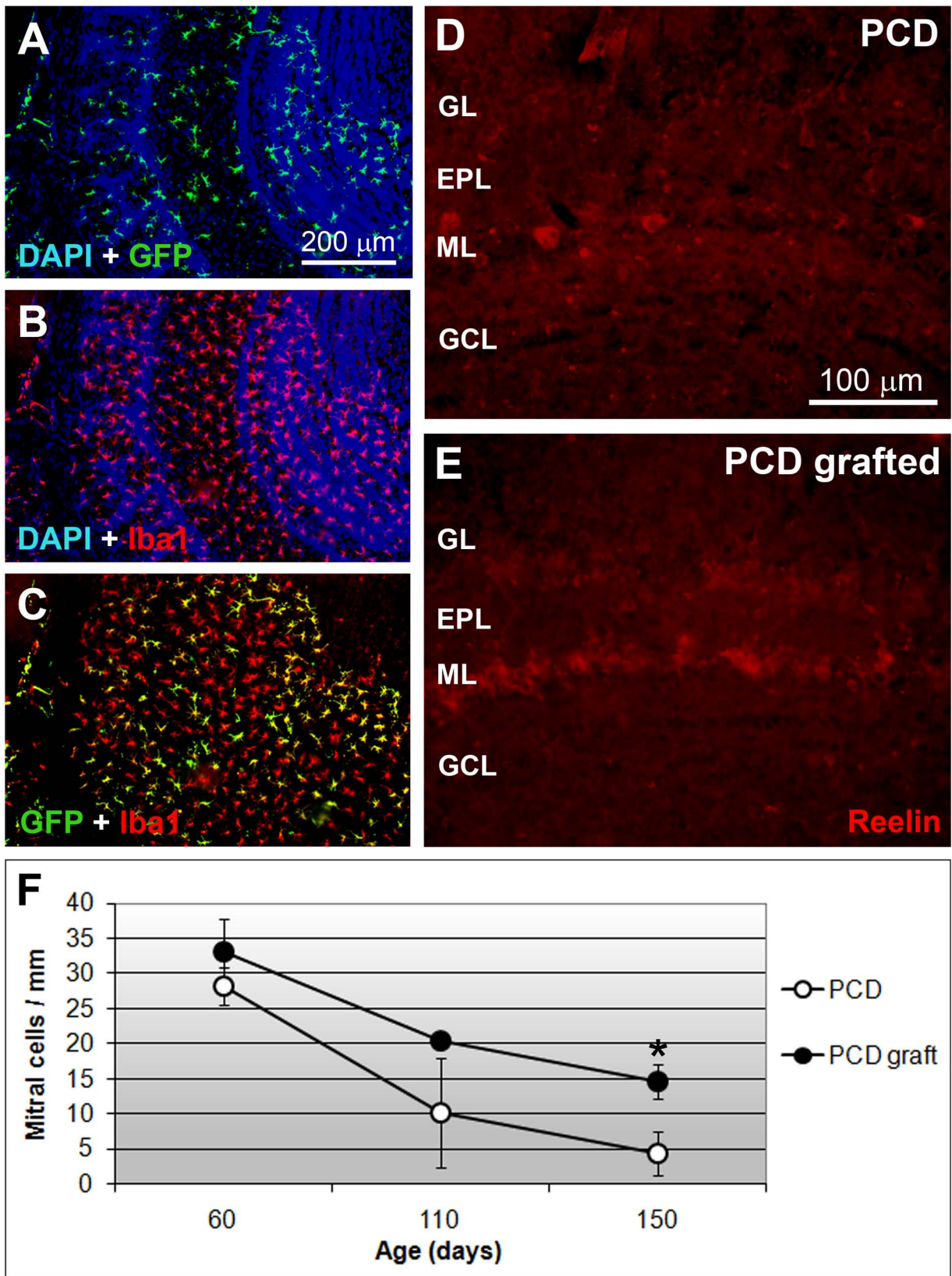


Figure 1

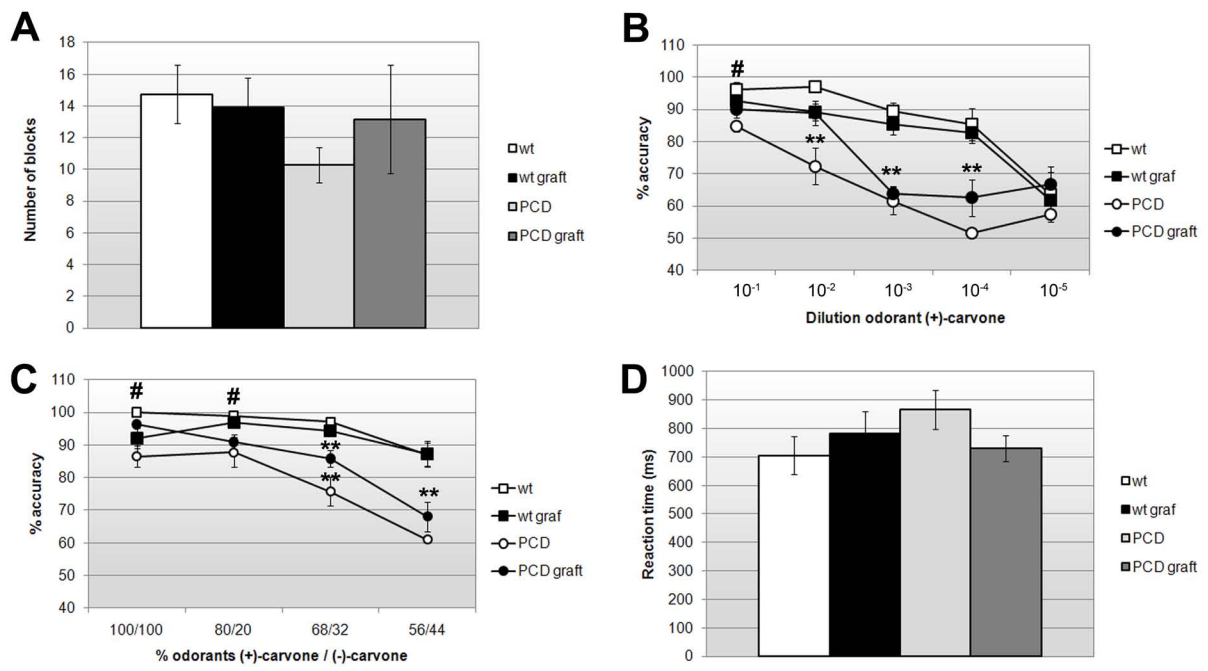
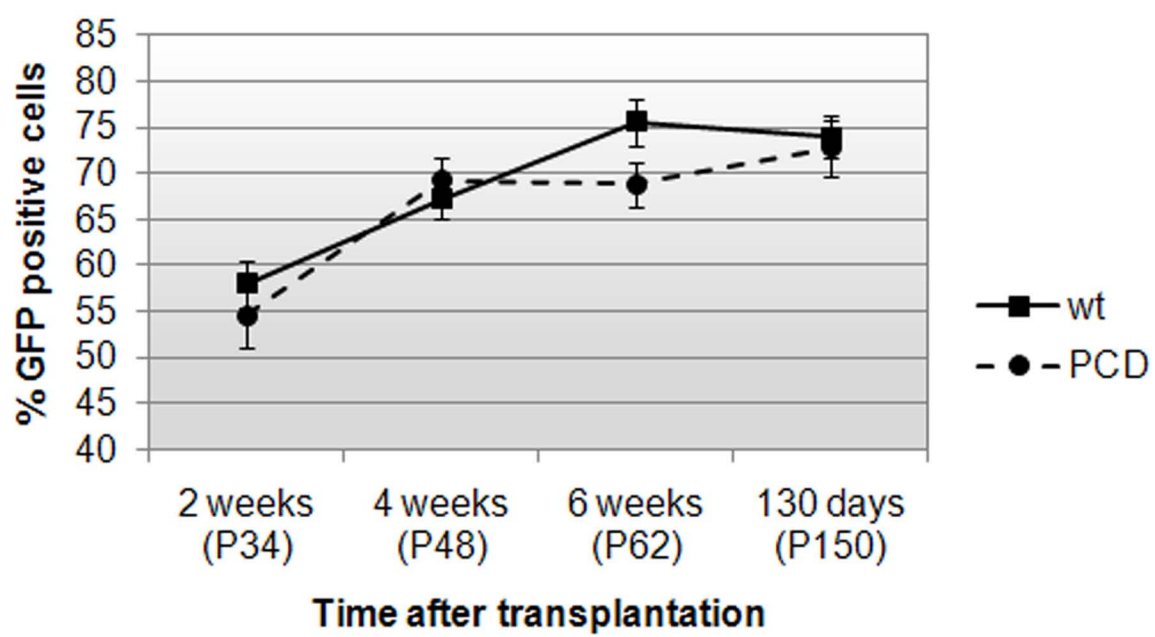
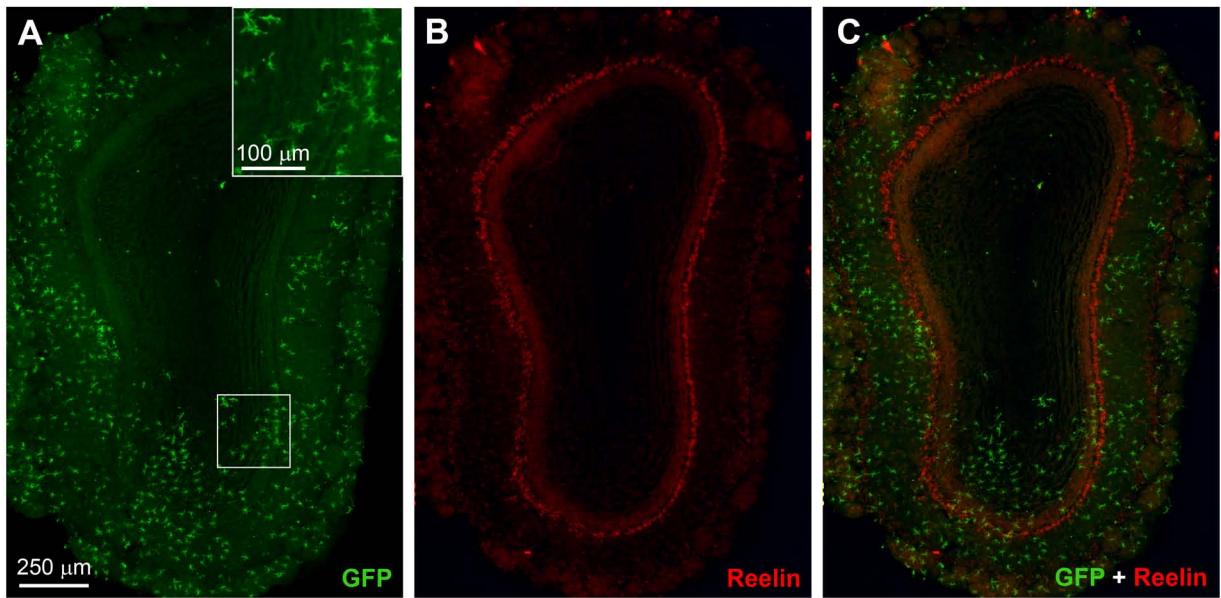


Figure 2

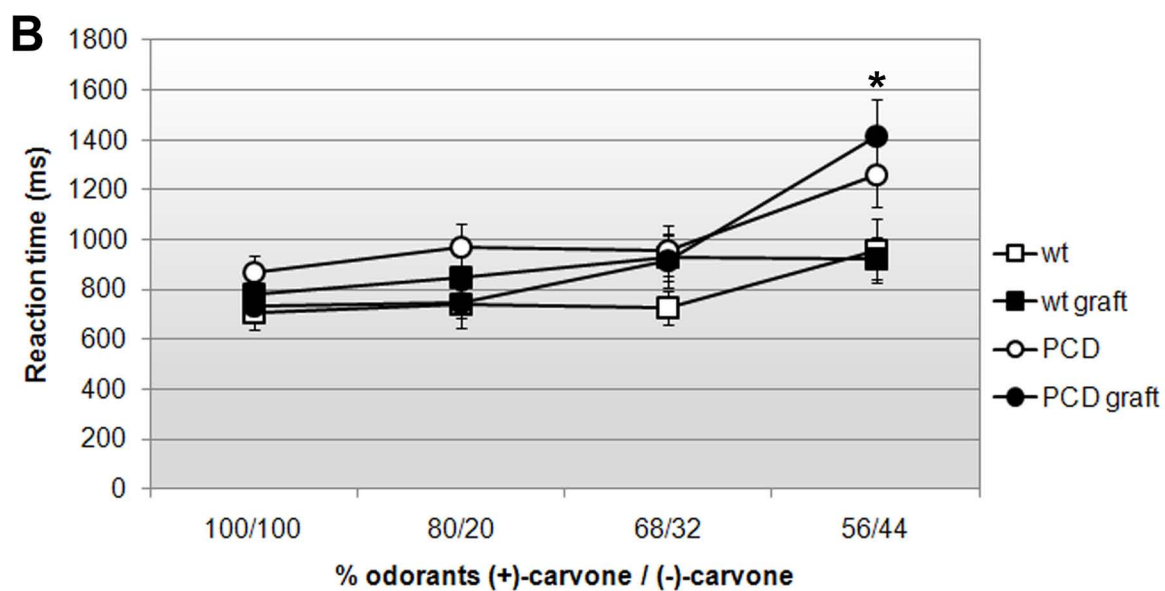
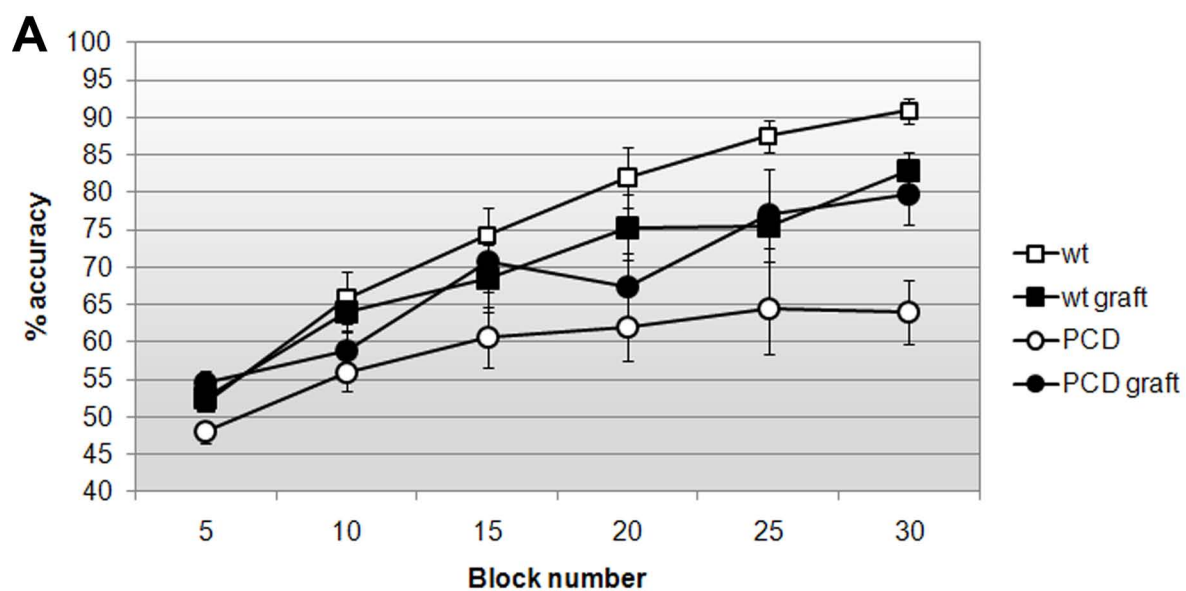




Supplementary figure 1



Supplementary figure 2



Supplementary figure 3

# Bibliografía



- A**irado C, Gómez C, Recio JS, Baltanás FC, Weruaga E, Alonso JR. 2008. Zincergic innervation from the anterior olfactory nucleus to the olfactory bulb displays plastic responses after mitral cell loss. *J. Chem. Neuroanat.* 36:197-208.
- Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM. 2007. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat. Neurosci.* 10:1538-1543.
- Alison MR, Poulson R, Forbes S, Wright NA. 2002. An introduction to stem cells. *J. Pathol.* 197:419-423.
- 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.
- Altman J, Das GD. 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. Comp. Neurol.* 124:319-335.
- 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 JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, Lois C, Morrison SJ, Álvarez-Buylla A. 2003. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 425:968-973.
- Andrew W. 1937. The effects of fatigue due to muscular exercise on the Purkinje cells of the mouse, with special reference to the factor age. *Cell Tissue Res.*, 27:534-555.
- Andrews PW, Matin MM, Bahrami AR, Damjanov I, Gokhale P, Draper JS. 2005. Embryonic stem (ES) cells and embryonal carcinoma (EC) cells: opposite sides of the same coin. *Biochem. Soc. Trans.* 33:1526-1530.
- Anjos-Afonso F, Siapati EK, 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 JJ, Dymecki S. 2001. An Flp indicator mouse expressing alkaline phosphatase from the ROSA26 locus. *Nat. Genet.* 29:257-259.
- B**ae JS, Furuya S, Shinoda Y, Endo S, Schuchman EH, Hirabayashi Y, Jin HK. 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 JS, Han HS, Youn DH, Carter JE, Mudo M, Schuchman EH, Jin HK. 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.
- Baker H, Greer CA. 1990. Region-specific consequences of *pcd* gene expression in the olfactory system. *J. Comp. Neurol.* 293:125-133.
- Balentova S, Racekova E, Martoncikova M, Misurova E. 2006. Cell proliferation in the adult rat rostral migratory stream following exposure to gamma irradiation. *Cell. Mol. Neurobiol.* 26:1131-1139.
- Balentova S, Racekova E, Misurova E. 2007. Effect of low-dose irradiation on proliferation dynamics in the rostral migratory stream of adult rats. *Folia Biol. (Praha)* 53:74-78.
- Baltanás FC, Casafont I, Weruaga E, Alonso JR, Berciano MT, Lafarga M. 2010. Nucleolar Disruption and Cajal Body Disassembly are Nuclear Hallmarks of DNA Damage-Induced Neurodegeneration in Purkinje Cells. *Brain Pathol.* En prensa.
- Baltanás FC, Weruaga E, Airado C, Valero J, Recio JS, Díaz D, Alonso JR. 2007. Chemical heterogeneity of the periglomerular neurons in the olfactory bulb. A review. *Eur. J. Anat.* 11:123-147.

- Bartolomei JC, Greer CA. 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.
- Baurle J, Helmchen C, Grusser-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 AJ, McCulloch EA, Till JE. 1963. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 197:452-454.
- Bisulco S, Slotnick B. 2003. Olfactory discrimination of short chain fatty acids in rats with large bilateral lesions of the olfactory bulbs. *Chem. Senses* 28:361-370.
- Blanks JC, Mullen RJ, LaVail MM. 1982. Retinal degeneration in the pcd cerebellar mutant mouse. II. Electron microscopic analysis. *J. Comp. Neurol.* 212:231-246.
- Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. 2001. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell* 105:829-841.
- Bodyak N, Slotnick B. 1999. Performance of mice in an automated olfactometer: odor detection, discrimination and odor memory. *Chem. Senses* 24:637-645.
- Bonfanti L, Peretto P, Merighi A, Fasolo A. 1997. Newly-generated cells from the rostral migratory stream in the accessory olfactory bulb of the adult rat. *Neuroscience* 81: 489-502.
- Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. 2000. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 290:1775-1779.
- Brittan M, Wright NA. 2002. Gastrointestinal stem cells. *J. Pathol.* 197:492-509.
- Broxmeyer HE. 2010. Cord blood hematopoietic stem cell transplantation. In: Lisa Girard, editor. *Stembooks: The Stem Cell Research Community*. pp 1-13.
- Burger PE, Xiong X, Coetzee S, Salm SN, Moscatelli D, Goto K, Wilson EL. 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.
- Butterworth RF. 1993. Pathophysiology of cerebellar dysfunction in the Wernicke-Korsakoff syndrome. *Can. J. Neurol. Sci.* 20 Suppl 3:S123-S126.
- C**ampion DR. 1984. The muscle satellite cell: a review. *Int. Rev. Cytol.* 87:225-251.
- Can A, Karahuseyinoglu S. 2007. Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. *Stem Cells* 25:2886-2895.
- Carleton A, Petreanu LT, Lansford R, Álvarez-Buylla A, Lledo PM. 2003. Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nat. Neurosci.* 6:507-518.
- Carletti B, Rossi F. 2005. Selective rather than inductive mechanisms favour specific replacement of Purkinje cells by embryonic cerebellar cells transplanted to the cerebellum of adult Purkinje cell degeneration (pcd) mutant mice. *Eur. J. Neurosci.* 22:1001-1012.
- Carrascosa C, Torres-Alemán I, López-López C, Carro E, Espejo L, Torrado S, Torrado JJ. 2004. Microspheres containing insulin-like growth factor I for treatment of chronic neurodegeneration. *Biomaterials* 25:707-714.
- Carro E, Trejo JL, Busiguina S, 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.
- Carter RJ, Morton J, Dunnett SB. 2001. Motor coordination and balance in rodents. *Curr. Protoc. Neurosci.* Chapter 8:Unit 8.12.
- Casper J, Knauf W, Kiefer T, Wolff D, Steiner B, Hammer U, Wegener R, Kleine HD, Wilhelm S, Knopp A, Hartung G, Dolken G, Freund M. 2004. Treosulfan and fludarabine: a new toxicity-reduced conditioning regimen for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 103:725-731.

- Caston J, Delhaye-Bouchaud N, Mariani J. 1995. Motor behavior of heterozygous staggerer mutant (+/sg) versus normal (+/+) mice during aging. *Behav. Brain Res.* 72:97-102.
- Caulfield T, Scott C, Hyun I, Lovell-Badge R, Kato K, Zarzeczny A. 2010. Stem cell research policy and iPS cells. *Nat. Methods* 7:28-33.
- Celio MR. 1990. Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* 35:375-475.
- Chang AC, 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.
- Chen J, Li Y, Katakowski M, Chen X, Wang L, Lu D, Lu M, Gautam SC, 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.
- Chin MH, Mason MJ, Xie W, Volinia S, Singer M, Peterson C, Ambartsumyan G, Aimiwu O, Richter L, Zhang J, Khvorostov I, Ott V, Grunstein M, Lavon N, Benvenisty N, Croce CM, Clark AT, Baxter T, Pyle AD, Teitell MA, Pelegri M, Plath K, Lowry WE. 2009. Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell* 5:111-123.
- Chopp M, Li Y, Zhang J. 2008. Plasticity and remodeling of brain. *J. Neurol. Sci.* 265:97-101.
- Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, Veress B, Nilsson E, Karlstrom H, Lendahl U, Frisen J. 2000. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* 288:1660-1663.
- Clayton E, Doupe DP, Klein AM, Winton DJ, Simons BD, Jones PH. 2007. A single type of progenitor cell maintains normal epidermis. *Nature* 446:185-189.
- Clayton H, Titley I, Vivanco M. 2004. Growth and differentiation of progenitor/stem cells derived from the human mammary gland. *Exp. Cell Res.* 297:444-460.
- Cohen Y, Nagler A. 2004. Umbilical cord blood transplantation--how, when and for whom? *Blood Rev.* 18:167-179.
- Cohen-Tannoudji M, Babinet C, Morello D. 2000. lacZ and ubiquitously expressed genes: should divorce be pronounced? *Transgenic Res.* 9:233-235.
- Cometto-Muñiz JE, Cain WS, Abraham MH. 2003. Quantification of chemical vapors in chemosensory research. *Chem. Senses* 28:467-477.
- Corti S, Locatelli F, Donadoni C, Guglieri M, Papadimitriou D, Strazzer S, Del BR, Comi GP. 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.
- Corti S, Locatelli F, Strazzer S, Salani S, Del Bo R, Soligo D, Bossolasco P, Bresolin N, Scarlato G, Comi GP. 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.
- Crespo C, Gracia-Llanes FJ, Gutiérrez-Mecinas M, Blasco-Ibáñez JM, Marqués-Marí AI, Náchter J, Varea E, Martínez-Guijarro FJ. 2006. El bulbo olfativo de los mamíferos: aspectos de su organización anatómica. En: Alonso JR, de Castro F, López-Mascaraque L, editores. *La olfacción en España*. Salamanca: SBI. pp 71-95.
- D**íaz D, Recio JS, Baltanás FC, Gómez C, Weruaga E, Alonso JR. 2011. Long-lasting changes in the anatomy of the olfactory bulb after ionizing irradiation and bone marrow transplantation. *Neuroscience* 173:190-205.
- Djurisic M, Antic S, Chen WR, 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.



- Doetsch F, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. 1997. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J. Neurosci.* 17:5046-5061.
- Doetsch F, Petreanu L, Caille I, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. 2002. EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* 36:1021-1034.
- Dominici M, Le BK, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytherapy.* 8:315-317.
- Doulazmi M, Capone F, Frederic F, Bakouche J, Lemaigre-Dubreuil Y, Mariani J. 2006. Cerebellar purkinje cell loss in heterozygous *rora*+/- mice: a longitudinal study. *J. Neurogenet.* 20:1-17.
- Doulazmi M, Hadj-Sahraoui N, Frederic F, 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.
- Dringen R, Hirrlinger J. 2003. Glutathione pathways in the brain. *Biol. Chem.* 384:505-16.
- E**gger V, Urban NN. 2006. Dynamic connectivity in the mitral cell-granule cell microcircuit. *Semin. Cell Dev. Biol.* 17:424-432.
- Eglitis MA, 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 AA, Allers CI, Conget PA, Rojas CV, Minguell JJ. 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 PS, Perfilieva E, Björk E, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* 4:1313-1317.
- Espejel S, Romero R, Álvarez-Buylla A. 2009. Radiation damage increases Purkinje neuron heterokaryons in neonatal cerebellum. *Ann. Neurol.* 66:100-109.
- F**arbman AI. 1992. The cell biology of olfaction. Cambridge: Cambridge University Press.
- Fernández-González A, La Spada AR, Treadaway J, Higdon JC, Harris BS, Sidman RL, Morgan JI, 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 AG, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. 1998. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279:1528-1530.
- Fine EJ, Ionita CC, Lohr L. 2002. The history of the development of the cerebellar examination. *Semin. Neurol.* 22:375-384.
- Forbes SJ, Vig P, Poulson R, Wright NA, Alison MR. 2002. Adult stem cell plasticity: new pathways of tissue regeneration become visible. *Clin. Sci. (Lond)* 103:355-369.
- Fortier LA. 2005. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Vet. Surg.* 34:415-423.
- Franco R, Cidlowski JA. 2009. Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death Differ.* 16:1303-14.
- Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. 1970. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 3:393-403.
- Friedman D, Strowbridge BW. 2000. Functional role of NMDA autoreceptors in olfactory mitral cells. *J. Neurophysiol.* 84:39-50.
- Friedrich G, 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, Guasch G. 2004. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 116:769-778.
- G**age FH. 2000. Mammalian neural stem cells. *Science* 287:1433-1438.
- García-Marqués J, Blanchart A, López-Mascaraque L. 2006. Construyendo un bulbo olfativo. En: Alonso JR, de Castro F, López-Mascaraque L, editores. *La olfacción en España*. Salamanca: SBI. pp 55-69.
- García-Verdugo, Ferron S, Flames N, Collado L, Desfilis E, Font E. 2002. The proliferative ventricular zone in adult vertebrates: a comparative study using reptiles, birds, and mammals. *Brain Res. Bull.* 57:765-775.
- García-Verdugo JM, Doetsch F, Wichterle H, Lim DA, Álvarez-Buylla A. 1998. Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells. *J. Neurobiol.* 36:234-248.
- Garden GA, Moller T. 2006. Microglia biology in health and disease. *J Neuroimmune Pharmacol.* 1:127-137.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben Sasson SA. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119:493-501.
- Ghetti B, Norton J, Triarhou LC. 1987. Nerve cell atrophy and loss in the inferior olivary complex of "Purkinje cell degeneration" mutant mice. *J. Comp. Neurol.* 260:409-422.
- Ghoumari AM, Dusart I, El-Etr M, Tronche F, Sotelo C, Schumacher M, Baulieu EE. 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 AJ, Karasinski J, Relvas J, Moss J, Sherratt TG, Strong PN, Watt DJ. 1995. Dermal fibroblasts convert to a myogenic lineage in mdx mouse muscle. *J. Cell Sci.* 108:207-214.
- Goings GE, Sahni V y Szele FG. 2004. Migration patterns of subventricular zone cells in adult mice change after cerebral cortex injury. *Brain Res.* 996: 213-226.
- Gomez C, Briñón JG, Orio L, Colado MI, Lawrence AJ, Zhou FC, Vidal M, Barbado MV, Alonso JR. 2007. Changes in the serotonergic system in the main olfactory bulb of rats unilaterally deprived from birth to adulthood. *J. Neurochem.* 100:924-938.
- González-Granero S, Capilla V, Lezameta M, García-Verdugo JM. 2006. Aspectos comparados de la neurogénesis y migración tangencial al bulbo olfativo. En: Alonso JR, de Castro F, López-Mascaraque L, editores. *La olfacción en España*. Salamanca: SBI. pp 155-170.
- Gonzalo S. 2010. Epigenetic alterations in aging. *J. Appl. Physiol.*
- Gould E. 2007. How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nat. Rev. Neurosci.* 8:481-488.
- Gould E, Tanapat P. 1997. Lesion-induced proliferation of neuronal progenitors in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 80:427-436.
- Granados-Fuentes D, Saxena MT, Prolo LM, Aton SJ, Herzog ED. 2004. Olfactory bulb neurons express functional, entrainable circadian rhythms. *Eur. J. Neurosci.* 19:898-906.
- Greer CA, 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 CA, Shepherd GM. 1982. Mitral cell degeneration and sensory function in the neurological mutant mouse Purkinje cell degeneration (PCD). *Brain Res.* 235:156-161.
- Griffiths MJ, Bonnet D, Janes SM. 2005. Stem cells of the alveolar epithelium. *Lancet* 366:249-260.
- Grillo MA. 1970. Cytoplasmic inclusions resembling nucleoli in sympathetic neurons of adult rats. *J. Cell Biol.* 45:100-117.

- Grove JE, Bruscia E, Krause DS. 2004. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells* 22:487-500.
- Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. 2008. Wound repair and regeneration. *Nature* 453:314-321.
- Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, Kunkel LM, Mulligan RC. 1999. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401:390-394.
- H**alász N, Johansson O, Hökfelt T, Ljungdahl A, Goldstein M. 1981. Immunohistochemical identification of two types of dopamine neuron in the rat olfactory bulb as seen by serial sectioning. *J. Neurocytol.* 10:251-259.
- Handel MA, Dawson M. 1981. Effects on spermiogenesis in the mouse of a male sterile neurological mutation, *Purkinje cell degeneration*. *Gamete Res.* 4:185-192.
- Harris A, Morgan JI, Pecot M, Soumare A, Osborne A, Soares HD. 2000. Regenerating motor neurons express *Nna1*, a novel ATP/GTP-binding protein related to zinc carboxypeptidases. *Mol. Cell. Neurosci.* 16:578-596.
- Hatten ME, Alder J, Zimmerman K, Heintz N. 1997. Genes involved in cerebellar cell specification and differentiation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7:40-47.
- Haydout V, Gilliot O, Rivera S, Bourcier C, Francois A, Aigueperse J, Bourhis J, Vozenin-Brotans MC. 2007. Successful mitigation of delayed intestinal radiation injury using pravastatin is not associated with acute injury improvement or tumor protection. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 68:1471-1482.
- Hellstrom NA, Bjork-Eriksson T, Blomgren K, Kuhn HG. 2008. Differential recovery of neural stem cells in the subventricular zone and dentate gyrus after ionizing radiation. *Stem Cells* 27:634-641.
- Hess DC, Abe T, Hill WD, Studdard AM, Carothers J, Masuya M, Fleming PA, Drake CJ, Ogawa M. 2004. Hematopoietic origin of microglial and perivascular cells in brain. *Exp. Neurol.* 186:134-144.
- Hinds JW. 1968. Autoradiographic study of histogenesis in the mouse olfactory bulb. I. Time of origin of neurons and neuroglia. *J. Comp. Neurol.* 134:287-304.
- Hirrlinger J, Dringen R. 2010. The cytosolic redox state of astrocytes: Maintenance, regulation and functional implications for metabolite trafficking. *Brain Res. Rev.* 63:177-88.
- Hou L, Hong T. 2008. Stem cells and neurodegenerative diseases. *Sci. China C. Life Sci.* 51:287-294.
- Huangfu D, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Chen S, Muhlestein W, Melton DA. 2008. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat. Biotechnol.* 26:1269-1275.
- Hyun I. 2010. The bioethics of stem cell research and therapy. *J. Clin. Invest.* 120:71-75.
- I**hukai 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.
- J**ackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA. 2001. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J. Clin. Invest.* 107:1395-1402.
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-González XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418:41-49.
- Johansson CB, Youssef S, Koleckar K, Holbrook C, Doyonnas R, Corbel SY, Steinman L, Rossi FM, Blau HM. 2008. Extensive fusion of haematopoietic cells with Purkinje neurons in response to chronic inflammation. *Nat. Cell. Biol.* 10:575-583.

- Jones J, Jaramillo-Merchán J, Bueno C, Pastor D, Viso-Leon M, Martinez S. 2010. Mesenchymal stem cells rescue Purkinje cells and improve motor functions in a mouse model of cerebellar ataxia. *Neurobiol. Dis.* 40:415-423.
- K**ale S, Karihaloo A, Clark PR, Kashgarian M, Krause DS, Cantley LG. 2003. Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule. *J. Clin. Invest* 112:42-49.
- Khosrotehrani K, Bianchi DW. 2005. Multi-lineage potential of fetal cells in maternal tissue: a legacy in reverse. *J. Cell Sci.* 118:1559-1563.
- Koeppen AH. 1998. The hereditary ataxias. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57:531-543.
- Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. 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.
- Kosaka K, Heizmann CW, 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.
- Kratskin IL, Belluzzi O. 2003. Anatomy and neurochemistry of the olfactory bulb. En: Doty R.L., editor. *Handbook of olfaction and gustation*. Nueva York. pp 139-164.
- Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ. 2001. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105:369-377.
- Kyuhou S, Kato N, Gemba H. 2006. Emergence of endoplasmic reticulum stress and activated microglia in Purkinje cell degeneration mice. *Neurosci. Lett.* 396:91-96.
- L**aBarge MA, Blau HM. 2002. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell* 111:589-601.
- Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. 2000. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat. Med.* 6:1229-1234.
- Lagier S, Panzanelli P, Russo RE, Nissant A, Bathellier B, Sassoe-Pognetto M, Fritschy JM, Lledo PM. 2007. GABAergic inhibition at dendrodendritic synapses tunes gamma oscillations in the olfactory bulb. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:7259-7264.
- Laine J, Axelrad H. 1994. The candelabrum cell: a new interneuron in the cerebellar cortex. *J. Comp. Neurol.* 339:159-173.
- Landis SC. 1973. Ultrastructural changes in the mitochondria of cerebellar Purkinje cells of nervous mutant mice. *J. Cell Biol.* 57:782-797.
- Landis SC, Mullen RJ. 1978. The development and degeneration of Purkinje cells in *pcd* mutant mice. *J. Comp. Neurol.* 177:125-143.
- Lapham LW. 1968. Tetraploid DNA content of Purkinje neurons of human cerebellar cortex. *Science* 159:310-312.
- Larramendi LM. 1969. Electron microscopic studies of cerebellar interneurons. *UCLA Forum Med. Sci.* 11:289-307.
- Laurent G, Stopfer M, Friedrich RW, Rabinovich MI, Volkovskii A, Abarbanel HD. 2001. Odor encoding as an active, dynamical process: experiments, computation, and theory. *Annu. Rev. Neurosci.* 24:263-297.
- Lavin MF, Gueven N, Bottle S, Gatti RA. 2007. Current and potential therapeutic strategies for the treatment of ataxia-telangiectasia. *Br. Med. Bull.* 81-82:129-147.
- Lazarini F, Mouthon MA, Gheusi G, de CF, Olivo-Marín JC, Lamarque S, Abrous DN, Boussin FD, Lledo PM. 2009. Cellular and behavioral effects of cranial irradiation of the subventricular zone in adult mice. *PLoS One.* 4:e7017.
- Leri A, Kajstura J, Anversa P. 2005. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiol. Rev.* 85:1373-1416.

- Li L, Xie T. 2005. Stem cell niche: structure and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21:605-631.
- Li Y, McIntosh K, Chen J, Zhang C, Gao Q, Borneman J, Raginski K, Mitchell J, Shen L, Zhang J, Lu D, Chopp M. 2006. Allogeneic bone marrow stromal cells promote glial-axonal remodeling without immunologic sensitization after stroke in rats. *Exp. Neurol.* 198:313-325.
- Lindroos B, Suuronen R, Miettinen S. 2010. The Potential of Adipose Stem Cells in Regenerative Medicine. *Stem Cell Rev. En prensa.*
- Lledo PM, Alonso M, Grubb MS. 2006. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat. Rev. Neurosci.* 7:179-193.
- Locatelli F, Pession A, Bonetti F, Maserati E, Prete L, Pedrazzoli P, Zecca M, Prete A, Paolucci P, 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, Álvarez-Buylla A. 1993. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2074-2077.
- Lois C, Álvarez-Buylla A. 1994. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264:1145-1148.
- Lois C, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. 1996. Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271:978-981.
- Long MA, Rossi FM. 2009. Silencing inhibits Cre-mediated recombination of the Z/AP and Z/EG reporters in adult cells. *PLoS One* 4:e5435.
- López-Mascaraque L, de Castro F. 2002. The olfactory bulb as an independent developmental domain. *Cell Death. Differ.* 9:1279-1286.
- Lowe G. 2003. Electrical signaling in the olfactory bulb. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13:476-481.
- Lumia AR, Teicher MH, Salchli F, Ayers E, Possidente B. 1992. Olfactory bulbectomy as a model for agitated hyposerotonergic depression. *Brain Res* 587:181-185.
- M**agrassi L, Grimaldi P, Ibatici A, Corselli M, Ciardelli L, Castello S, Podesta M, Frassoni F, Rossi F. 2007. Induction and survival of binucleated Purkinje neurons by selective damage and aging. *J. Neurosci.* 27:9885-9892.
- Mao X, Fujiwara Y, Chapdelaine A, Yang H, Orkin SH. 2001. Activation of EGFP expression by Cre-mediated excision in a new ROSA26 reporter mouse strain. *Blood* 97:324-326.
- Mao X, Fujiwara Y, Orkin SH. 1999. Improved reporter strain for monitoring Cre recombinase-mediated DNA excisions in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:5037-5042.
- Massengale M, Wagers AJ, Vogel H, Weissman IL. 2005. Hematopoietic cells maintain hematopoietic fates upon entering the brain. *J. Exp. Med.* 201:1579-1589.
- McGinn MJ, Sun D, Colello RJ. 2008. Utilizing X-irradiation to selectively eliminate neural stem/progenitor cells from neurogenic regions of the mammalian brain. *J. Neurosci. Methods* 170:9-15.
- McLaren A. 2001. Ethical and social considerations of stem cell research. *Nature* 414:129-131.
- McLean JH, Shipley MT. 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 JH, Shipley MT. 1987b. Serotonergic afferents to the rat olfactory bulb: II. Changes in fiber distribution during development. *J. Neurosci.* 7:3029-3039.
- Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR. 2000. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 290:1779-1782.



- Miale IL, Sidman RL. 1961. An autoradiographic analysis of histogenesis in the mouse cerebellum. *Exp. Neurol.* 4:277-296.
- Milligan ED, Watkins LR. 2009. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat. Rev. Neurosci.* 10:23-36.
- Mimeault M, Batra SK. 2006. Concise review: recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. *Stem Cells* 24:2319-2345.
- Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. 2008. Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell* 11:265-278.
- Moore BE, Colvin GA, Dooner MS, Quesenberry PJ. 2005. Lineage-negative bone marrow cells travel bidirectionally in the olfactory migratory stream but maintain hematopoietic phenotype. *J. Cell. Physiol.* 202:147-152.
- Morrison SJ, Kimble J. 2006. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 441:1068-1074.
- Mouret A, Gheusi G, Gabellec MM, de Chaumont F, Olivo-Marín JC, Lledo PM. 2008. Learning and survival of newly generated neurons: when time matters. *J. Neurosci.* 28:11511-11516.
- Mouret A, Lepousez G, Gras J, Gabellec MM, Lledo PM. 2009. Turnover of newborn olfactory bulb neurons optimizes olfaction. *J. Neurosci.* 29:12302-12314.
- Mullen RJ, Eicher EM, Sidman RL. 1976. *Purkinje cell degeneration*, a new neurological mutation in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:208-212.
- Mullen RJ, LaVail M. 1975. Two types of retinal degeneration in cerebellar mutant mice. *Nature* 258:528-530.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, 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.
- Naik K, Pittman I, Wolfe A, Miller RS, Radovick S, Wondisford FE. 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, Shimada T. 2001. Differentiation of transplanted bone marrow cells in the adult mouse brain. *Transplantation* 71:1735-1740.
- Nygren JM, Liuba K, Breitbach M, Stott S, Thoren L, Roell W, Geisen C, Sasse P, Kirik D, Bjorklund A, Nerlov C, Fleischmann BK, Jovinge S, Jacobsen SE. 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, Sidman RL. 1985. Degeneration of thalamic neurons in "Purkinje cell degeneration" mutant mice. I. Distribution of neuron loss. *J. Comp. Neurol.* 234:277-297.
- O'Hare MJ. 1978. Teratomas, neoplasia and differentiation: a biological overview. I. The natural history of teratomas. *Invest. Cell. Pathol.* 1:39-63.
- Ogawa S, Miyagawa S. 2009. Potentials of regenerative medicine for liver disease. *Surg. Today* 39:1019-1025.
- Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, Pocius J, Michael LH, Behringer RR, Garry DJ, Entman ML, Schneider MD. 2003. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:12313-12318.
- Oppenheim RW. 1991. Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 14:453-501.
- Orona E, Rainer EC, Scott JW. 1984. Dendritic and axonal organization of mitral and tufted cells in the rat olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 226:346-356.

- P**achter JS, de Vries HE, 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.
- Peretto P, Merighi A, Fasolo A, Bonfanti L. 1997. Glial tubes in the rostral migratory stream of the adult rat. *Brain Res. Bull.* 42:9-21.
- Peretto P, Merighi A, Fasolo A, Bonfanti L. 1999. The subependymal layer in rodents: a site of structural plasticity and cell migration in the adult mammalian brain. *Brain Res. Bull.* 49:221-243.
- Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. 1999. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284:1168-1170.
- Petreanu L, Álvarez-Buylla A. 2002. Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *J. Neurosci.* 22:6106-6113.
- Pfannkuche K, Hannes T, Khalil M, Noghabi MS, Morshedi A, Hescheler J, Droge P. 2010. Induced pluripotent stem cells: a new approach for physiological research. *Cell Physiol. Biochem.* 26:105-124.
- Pinching AJ, Powell TPS. 1971. The neuron types of the glomerular layer of the olfactory bulb. *J. Cell Sci.* 9:305-345.
- Poulsom R, Alison MR, Forbes SJ, Wright NA. 2002. Adult stem cell plasticity. *J. Pathol.* 197:441-456.
- Price JL, Sprich WW. 1975. Observations on the lateral olfactory tract of the rat. *J. Comp. Neurol.* 162:321-336.
- Priller J, Flugel A, Wehner T, Boentert M, Haas CA, Prinz M, Fernández-Klett F, Prass K, Bechmann I, de Boer BA, Frotscher M, Kreutzberg GW, Persons DA, Dirnagl U. 2001a. Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nat. Med.* 7:1356-1361.
- Priller J, Persons DA, Klett FF, Kempermann G, Kreutzberg GW, Dirnagl U. 2001b. Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo. *J. Cell. Biol.* 155:733-738.
- Prockop DJ, Olson SD. 2007. Clinical trials with adult stem/progenitor cells for tissue repair: let's not overlook some essential precautions. *Blood* 109:3147-3151.
- R**aff M. 2003. Adult stem cell plasticity: fact or artifact? *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 19:1-22.
- Ramón y Cajal S. 1911. *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés.* Maloine, Paris.
- Ramos A. 2008. Animal models of anxiety: do I need multiple tests?. *Trends Pharmacol. Sci.* 29:493-498.
- Recio JS. 2008. 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, Universidad de Salamanca.
- Recio JS, Álvarez-Dolado M, Díaz D, Baltanás FC, Piquer-Gil M, Alonso JR, Weruaga E. 2011. Bone marrow contributes simultaneously to different neural types in the central nervous system through different mechanisms of plasticity. *Cell Transplant.* En prensa.
- Recio JS, Weruaga E, Gómez C, Valero J, Brinon JG, Alonso JR. 2007. Changes in the connections of the main olfactory bulb after mitral cell selective neurodegeneration. *J. Neurosci. Res.* 85:2407-2421.
- Romanko MJ, Rola R, Fike JR, Szele FG, Dizon ML, Felling RJ, Brazel CY, Levison SW. 2004a. Roles of the mammalian subventricular zone in cell replacement after brain injury. *Prog. Neurobiol.* 74:77-99.
- Romanko MJ, Rothstein RP, Levison SW. 2004b. Neural stem cells in the subventricular zone are resilient to hypoxia/ischemia whereas progenitors are vulnerable. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 24:814-825.

- Rosselli-Austin L, Altman J. 1979. The postnatal development of the main olfactory bulb of the rat. *J. Dev. Physiol* 1:295-313.
- S**akaguchi S, Katamine S, Nishida N, Moriuchi R, Shigematsu K, Sugimoto T, Nakatani A, Kataoka Y, Houtani T, Shirabe S, Okada H, Hasegawa S, Miyamoto T, Noda T. 1996. Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature* 380:528-531.
- Sanmano B, Mizoguchi M, Suga Y, Ikeda S, 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.
- Saric T, Frenzel LP, Hescheler J. 2008. Immunological barriers to embryonic stem cell-derived therapies. *Cells Tissues. Organs* 188:78-90.
- Scheulen ME, Hilger RA, Oberhoff C, Casper J, Freund M, Josten KM, Bornhauser M, Ehninger G, Berdel WE, Baumgart J, Harstrick A, Bojko P, Wolf HH, Schindler AE, 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.
- Schmahmann JD. 2004. Disorders of the cerebellum: ataxia, dysmetria of thought, and the cerebellar cognitive affective syndrome. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 16:367-378.
- Schneider SP, Macrides F. 1978. Laminar distributions of interneurons in the main olfactory bulb of the adult hamster. *Brain Res. Bull.* 3:73-82.
- Schofield R. 1978. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4:7-25.
- Seaberg RM, Smukler SR, Kieffer TJ, Enikolopov G, Asghar Z, Wheeler MB, Korbitt G, 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.
- Sekerkova G, Katarova Z, Joo F, Wolff JR, Prodan S, 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.
- Shepherd GM. 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.
- Shinohara C, Gobbel GT, Lamborn KR, Tada E, Fike JR. 1997. Apoptosis in the subependyma of young adult rats after single and fractionated doses of X-rays. *Cancer Res.* 57:2694-2702.
- Sillitoe RV, Joyner AL. 2007. Morphology, molecular codes, and circuitry produce the three-dimensional complexity of the cerebellum. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23:549-577.
- Slotkin TA, Cousins MM, Tate CA, Seidler FJ. 2005. Serotonergic cell signaling in an animal model of aging and depression: Olfactory bulbectomy elicits different adaptations in brain regions of young adult vs. aging rats. *Neuropsychopharmacology* 30:52-57.
- Smith LG, Weissman IL, Heimfeld S. 1991. Clonal analysis of hematopoietic stem-cell differentiation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2788-2792.
- Solomon JN, Lewis CA, Ajami B, Corbel SY, Rossi FM, 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, Alvarado-Mallart RM. 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, Alvarado-Mallart RM. 1987. Embryonic and adult neurons interact to allow Purkinje cell replacement in mutant cerebellum. *Nature* 327:421-423.
- Spees JL, Olson SD, Whitney MJ, Prockop DJ. 2006. Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:1283-1288.
- Strathdee D, Ibbotson H, Grant SG. 2006. Expression of transgenes targeted to the Gt(ROSA)26Sor locus is orientation dependent. *PLoS One*. 1:e4.
- Sundholm-Peters NL, Yang HK, Goings GE, Walker AS, Szele FG. 2005. Subventricular zone neuroblasts emigrate toward cortical lesions. *J Neuropathol Exp. Neurol.* 64: 1089-1100.
- Sun TT, Lavker RM. 2004. Corneal epithelial stem cells: past, present, and future. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 9:202-207.
- T**ada E, Yang C, Gobbel GT, Lamborn KR, Fike JR. 1999. Long-term impairment of subependymal repopulation following damage by ionizing irradiation. *Exp. Neurol.* 160:66-77.
- Takahashi A, Kato K, Makino J, Shiroishi T, Koide T. 2006. Multivariate analysis of temporal descriptions of open-field behavior in wild-derived mouse strains. *Behav. Genet.* 36:763-774.
- Takahashi K, Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663-676.
- Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW. 2002. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416:542-545.
- Tögel F, Westenfelder C. 2007. Adult bone marrow-derived stem cells for organ regeneration and repair. *Dev. Dyn.* 236:3321-31.
- Travlos GS. 2006. Normal structure, function, and histology of the bone marrow. *Toxicol. Pathol.* 34:548-565.
- Triarhou LC, Ghetti B. 1991. Stabilisation of neurone number in the inferior olivary complex of aged 'Purkinje cell degeneration' mutant mice. *Acta Neuropathol.* 81:597-602.
- Triarhou LC, Norton J, 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 LC, Zhang W, Lee WH. 1995. Graft-induced restoration of function in hereditary cerebellar ataxia. *Neuroreport* 6:1827-1832.
- Triarhou LC, Zhang W, Lee WH. 1996. Amelioration of the behavioral phenotype in genetically ataxic mice through bilateral intracerebellar grafting of fetal Purkinje cells. *Cell Transplant.* 5:269-277.
- Tropepe V, Craig CG, Morshead CM, van der KD. 1997. Transforming growth factor-alpha null and senescent mice show decreased neural progenitor cell proliferation in the forebrain subependyma. *J. Neurosci.* 17:7850-7859.
- Trounson A. 2006. The production and directed differentiation of human embryonic stem cells. *Endocr. Rev.* 27:208-219.
- Tumbar T. 2006. Epithelial skin stem cells. *Methods Enzymol.* 419:73-99.
- V**alero J, Berciano MT, Weruaga E, Lafarga M, Alonso JR. 2006. Pre-neurodegeneration 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, Weruaga E, Murias AR, Recio JS, Alonso JR. 2005. Proliferation markers in the adult rodent brain: bromodeoxyuridine and proliferating cell nuclear antigen. *Brain Res. Protoc.* 15:127-134.
- Valero J, Weruaga E, Murias AR, Recio JS, Curto GG, Gómez C, Alonso JR. 2007. Changes in cell migration and survival in the olfactory bulb of the pcd/pcd mouse. *Dev. Neurobiol.* 67:839-859.
- van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. 2002. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415:1030-1034.
- Vanier MT. 2010. Niemann-Pick disease type C. *Orphanet. J. Rare. Dis.* 5:1-18.
- von Schalburg KR, McCarthy SP, Rise ML, Hutson JC, Davidson WS, Koop BF. 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, Glickstein M. 1998. The anatomy of the cerebellum. *Trends Neurosci.* 21:370-375.
- W**agers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL. 2002. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 297:2256-2259.
- Wang T, Morgan JI. 2007. The Purkinje cell degeneration (pcd) mouse: an unexpected molecular link between neuronal degeneration and regeneration. *Brain Res.* 1140:26-40.
- Wehner T, Bontert M, Eyupoglu I, Prass K, Prinz M, Klett FF, Heinze M, Bechmann I, Nitsch R, Kirchhoff F, Kettenmann H, Dirnagl U, 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 JM, Charlton CA, Brazelton TR, Hackman RC, Blau HM. 2003a. Contribution of transplanted bone marrow cells to Purkinje neurons in human adult brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:2088-2093.
- Weimann JM, Johansson CB, Trejo A, Blau HM. 2003b. Stable reprogrammed heterokaryons form spontaneously in Purkinje neurons after bone marrow transplant. *Nat. Cell Biol.* 5:959-966.
- Weruaga-Prieto E, Egli P, Celio MR. 1996. Rat brain oligodendrocytes do not interact selectively with axons expressing different calcium-binding proteins. *Glia* 16:117-128.
- Whetton AD, Graham GJ. 1999. Homing and mobilization in the stem cell niche. *Trends Cell Biol.* 9:233-238.
- Whitworth KM, Prather RS. 2010. Somatic cell nuclear transfer efficiency: How can it be improved through nuclear remodeling and reprogramming? *Mol. Reprod. Dev.* 77:1001-1015.
- Willey TJ, Maeda G, Schultz RL, Seibly WS, Horowitz JM. 1983. The principal projection pathway between the olfactory bulb and the prepyriform cortex in the cat. *J. Neurosci. Res.* 9:253-277.
- Wilmot I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810-813.
- Wilson A, Trumpp A. 2006. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat. Rev. Immunol.* 6:93-106.
- Wu GD, Nolta JA, Jin YS, Barr ML, Yu H, Starnes VA, Cramer DV. 2003. Migration of mesenchymal stem cells to heart allografts during chronic rejection. *Transplantation* 75:679-685.
- X**u Y, Shi Y, Ding S. 2008. A chemical approach to stem-cell biology and regenerative medicine. *Nature* 453:338-344.
- Y**amanaka S, Blau HM. 2010. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature* 465:704-712.

- Yao S, Chen S, Clark J, Hao E, Beattie GM, Hayek A, Ding S. 2006. Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:6907-6912.
- Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG. 2002. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 416:545-548.
- Yoder MC, Cumming JG, Hiatt K, Mukherjee P, Williams DA. 1996. A novel method of myeloablation to enhance engraftment of adult bone marrow cells in newborn mice. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2:59-67.
- Young HE, Black AC, Jr. 2004. Adult stem cells. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol.* 276:75-102.
- Yuan H, Gaber MW, Boyd K, Wilson CM, Kiani MF, Merchant TE. 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, Takahashi Y. 1991. Development and migration of Purkinje cells in the mouse cerebellar primordium. *Anat. Embryol. (Berl)* 184:195-212.
- Z**ambrowicz BP, Imamoto A, Fiering S, Herzenberg LA, Kerr WG, 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.
- Zanjani HS, McFarland R, Cavelier P, Blokhin A, Gautheron V, Levenes C, Bambrick LL, Mariani J, Vogel MW. 2009. Death and survival of heterozygous Lurcher Purkinje cells in vitro. *Dev. Neurobiol.* 69:505-517.
- Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L. 2003. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425:836-841.
- Zhang W, Ghetti B, Lee WH. 1997. Decreased IGF-I gene expression during the apoptosis of Purkinje cells in *pcd* mice. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 98:164-176.
- Zhang W, Ghetti B, Yang XL, Lee WH. 1999. Alteration of IGF system gene expression during the postnatal development of *pcd* mice. *J. Endocrinol.* 163:191-198.
- Zhang W, Lee WH, Triarhou LC. 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.
- Zoghbi HY. 1995. Spinocerebellar ataxia type 1. *Clin. Neurosci.* 3:5-11.