

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y PATOLOGÍA  
INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN  
LABORATORIO DE PLASTICIDAD NEURONAL Y NEURORREPARACIÓN

**Alteración del sistema inmunitario periférico en un  
modelo murino de neurodegeneración selectiva: base  
para terapias con células madre con potencial  
inmunomodulador**

**-TESIS DOCTORAL-**

Carlos del Pilar Rodríguez

Directores:

Prof. Dr. D. Eduardo Weruaga Prieto

Prof. Dr. D. David Díaz López

Salamanca, 2020



Eduardo Weruaga Prieto, Catedrático de Biología Celular de la Universidad de Salamanca, y David Díaz López, Profesor Titular de Biología Celular de la Universidad de Salamanca

HACEMOS CONSTAR:

Que la Tesis Doctoral titulada “Alteración del sistema inmunitario periférico en un modelo murino de neurodegeneración selectiva: base para terapias con células madre con potencial inmunomodulador”, ha sido realizada por D. Carlos del Pilar Rodríguez 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 por la Universidad de Salamanca.

Salamanca, a 30 de septiembre de 2020



Fdo.: Eduardo Weruaga Prieto

Fdo.: David Díaz López



## *Agradecimientos*

*Si alguien me preguntara alguna vez qué es lo que más valoro de mi transcurso predoctoral, podría decirle que todo lo que he crecido como persona, pero no diría eso. También podría contarle que me quedo con todos los conocimientos que he adquirido, pero tampoco sería el caso. Si me tuviese que quedar con una sola cosa sería con todas las personas que he tenido la oportunidad de conocer durante toda esta etapa, pues son esas personas las que me han hecho crecer como persona y las que me han enseñado la mayor parte de lo que he aprendido.*

*En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores de tesis, David y Eduardo, por todo el apoyo que me han brindado, toda la confianza que han depositado en mí y toda la paciencia que han demostrado. Ha sido un honor trabajar al lado de unos directores repletos de humildad, vocación y constancia, valores que espero se vean reflejados en esta Tesis Doctoral. También me gustaría agradecer a José Ramón por sus sabios consejos y la cercanía que ha mostrado en todo momento. Los dos párrafos siguientes también van dedicados a vosotros.*

*A continuación, y como no podía ser de otra manera, me gustaría dedicar unas palabras a todos mis compañeros de laboratorio. Recordaré toda la vida esos descansos tan productivos, llenos de risas, de quejas y de cotilleos, y todas las experiencias compartidas tanto dentro como fuera del laboratorio. Muchas gracias por escucharme y apoyarme en todo momento. Dicen que cuando te dedicas a la investigación es muy importante trabajar en algo que te guste de verdad, que te apasione. Si bien eso es cierto, para mí es incluso más importante contar con un buen ambiente de trabajo, y gracias a vosotros he contado con el mejor. Tengo el palpito de que lo peor de todo no va a ser pensar en lo que me deparará el futuro, sino tener que despedirme de todos vosotros, pues os considero parte de mi familia, parte de mi corazón.*

*En relación al resto de profesores del Departamento de Biología Celular y Patología, simplemente quería expresar el orgullo que ha supuesto para mí estar rodeado de docentes tan extraordinarios y, no tengo miedo de decirlo, los mejores que he conocido en la Universidad de Salamanca.*

*Durante mi etapa predoctoral, he tenido la oportunidad de realizar una estancia en el Hospital Nacional de Parapléjicos, en el grupo de investigación dirigido por Diego Clemente. Esto me ayudó enormemente tanto a nivel personal como profesional, pues me hallaba en una etapa de estancamiento, y enfrentarme a nuevos objetivos me levantó el estado de ánimo y abrió nuevas posibilidades. Por todo ello, me gustaría agradecer a Diego Clemente que me recibiera con los brazos abiertos y por todo su apoyo durante y después de mi estancia. Por supuesto, también me gustaría dar las gracias a los miembros de su laboratorio, especialmente a Rafa, por su inestimable ayuda, y también a Cristina por sus consejos con las técnicas inmunohistoquímicas.*

*A todos los amigos con los que sé que siempre puedo contar y que han sido importantes en mi vida. Quiero mencionar expresamente a Carmen y Miguel, cuyo apoyo y cariño han sido fundamentales.*

*Finalmente, y no menos importante, a toda mi familia, en especial a mis abuelos, a mis hermanos, David y José, a María y Jessica, unas cuñadas fantásticas, a la pequeña aportación a la familia, Enzo, pero, sobre todo, a mis padres, por estar ahí en todo momento, por enseñarme a ser humilde y responsable, por mostrarme que las cosas no caen del cielo y hay que esforzarse para conseguirlas y, por supuesto, por su cariño incondicional.*

***¡Muchas gracias a todos!***

La investigación recogida en esta Tesis Doctoral ha sido financiada por el Ministerio de Educación y Formación Profesional (FPU14/02963), el Ministerio de Asuntos Económicos y Transformación Digital (SAF2016-79668-R), la Junta de Castilla y León (SA030P17), el Instituto de Salud Carlos III (PI15/00963; PI18/00357), la Fundación D. Samuel Solórzano Barruso (FS/3-2014), la Fundación Foltra, el Servicio de Salud de Castilla-La Mancha y la Universidad de Salamanca.

# ÍNDICE





# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS, SISTEMA INMUNITARIO Y TERAPIA CELULAR	7
Reacciones inflamatorias asociadas a la neurodegeneración .....	7
<i>Gliosis reactiva</i> .....	8
<i>Alteraciones leucocitarias</i> .....	9
Terapia celular: la importancia de las células derivadas de la médula ósea.....	9
CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES .....	12
Características generales .....	12
Terapia celular con células madre mesenquimales .....	14
Propiedades neuroprotectoras.....	15
CÉLULAS MIELOIDES SUPRESORAS .....	17
Definición, origen y clasificación .....	17
Mecanismos inmunosupresores.....	19
Aplicaciones terapéuticas .....	22
EL RATÓN MUTANTE PCD: MODELO DE NEURODEGENERACIÓN SELECTIVA .....	23
La mutación <i>pcd</i> .....	24
Efectos generales de la mutación <i>pcd</i> .....	24
Efectos de la mutación <i>pcd</i> en el cerebelo.....	25
<i>Cerebelo: anatomía e histología generales</i> .....	25
<i>Neurodegeneración cerebelosa</i> .....	29
<i>Alteraciones preneurodegenerativas en las células de Purkinje</i> .....	30
<i>Neuroinflamación cerebelosa</i> .....	32
Efectos de la mutación <i>pcd</i> en el bulbo olfativo principal .....	33
<i>Bulbo olfativo principal: anatomía e histología generales</i> .....	33
<i>Neurodegeneración en el bulbo olfativo principal</i> .....	35
<i>Alteraciones preneurodegenerativas en las células mitrales</i> .....	36
<i>Neuroinflamación en el bulbo olfativo principal</i> .....	37
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>39</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>43</b>
ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN .....	45
Colonia PCD: cría y genotipado.....	45
<i>Extracción de DNA</i> .....	46
<i>Reacción en cadena de la polimerasa</i> .....	46
<i>Electroforesis en gel de agarosa</i> .....	47
Colonia GFP: cría e identificación .....	48
Reparto de los animales para los experimentos.....	48

ADMINISTRACIÓN DE LIPOPOLISÁCARIDO Y DE RADIACIÓN GAMMA.....	49
ANÁLISIS DE POBLACIONES ESPLÉNICAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	49
CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS MIELOIDES INMADURAS .....	52
Día 1. Aislamiento y activación de linfocitos T .....	52
<i>Extracción de esplenocitos y aislamiento de linfocitos T</i> .....	52
<i>Siembra y activación de linfocitos T</i> .....	53
Día 2. Cocultivo de IMCs con linfocitos T.....	54
<i>Extracción de médula ósea y aislamiento de IMCs</i> .....	54
<i>Siembra de las IMCs con los linfocitos T</i> .....	55
Día 4. Análisis por citometría de flujo.....	55
<i>Análisis de la proliferación celular</i> .....	55
<i>Análisis del ciclo celular</i> .....	56
TRASPLANTE.....	56
Obtención de las células .....	56
<i>Células mesenquimales humanas</i> .....	56
<i>Células mieloides inmaduras monocíticas</i> .....	57
Inyección intravenosa .....	57
<i>A través de la vena lateral de la cola</i> .....	57
<i>Por vía retroorbital</i> .....	58
Cirugía estereotáctica e inyección intracerebelosa .....	59
ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO MOTOR: TEST DE ROTAROD .....	60
OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DEL TEJIDO .....	61
Perfusión y disección.....	61
Seccionamiento.....	61
ANÁLISIS HISTOLÓGICO .....	62
Marcaje de células mesenquimales humanas en suspensión .....	62
Inmunohistoquímica .....	62
Controles de especificidad.....	63
Técnicas de recuperación antigénica .....	63
<i>SDS 1%</i> .....	64
<i>SDS-EDTA</i> .....	64
<i>Choques térmicos en tampón citrato</i> .....	64
Técnica TUNEL .....	64
VISUALIZACIÓN AL MICROSCOPIO Y RECUENTO CELULAR .....	65
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	66
Recuento y análisis fenotípico de leucocitos .....	66
Test de RotaRod .....	66
Densidad de células de Purkinje y de células en apoptosis .....	66

<b>RESULTADOS.....</b>	<b>67</b>
ALTERACIONES LEUCOCITARIAS ANTE MUERTE NEURONAL SELECTIVA .....	69
Análisis del número de leucocitos en el bulbo olfativo principal de animales silvestres y PCD .....	69
Análisis del número y de la distribución de los leucocitos en el cerebelo de ratones silvestres y PCD...70	
Análisis del número y la distribución de leucocitos en el cerebelo de distintos modelos de neuroinflamación.....	71
Análisis fenotípico de los leucocitos a nivel periférico.....	76
TERAPIA CELULAR CON CÉLULAS MESENQUIMALES HUMANAS .....	80
Inmunomarcaje de células mesenquimales humanas .....	80
Análisis de la integración de las células mesenquimales humanas en el tejido de los animales receptores .....	82
TERAPIA CELULAR CON CÉLULAS MIELOIDES INMADURAS MONOCÍTICAS .....	82
Caracterización de las células mieloides inmaduras monocíticas .....	82
<i>Análisis de la proliferación celular.....</i>	83
<i>Análisis del ciclo celular.....</i>	84
Análisis de la integración de las células mieloides inmaduras monocíticas tras su trasplante intravenoso .....	86
Evaluación de la inyección intracerebelosa de las células mieloides inmaduras monocíticas .....	86
<i>Análisis del comportamiento motor .....</i>	87
<i>Análisis histológico.....</i>	87
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>91</b>
LA MUERTE SELECTIVA DE LAS CÉLULAS DE PURKINJE INDUCE ALTERACIONES LEUCOCITARIAS ESPECÍFICAS.....	93
Alteraciones leucocitarias en el sistema nervioso central en degeneración .....	93
Alteraciones leucocitarias en el bazo .....	97
TERAPIA CELULAR INMUNOMODULADORA .....	100
La detección de mitocondrias humanas es adecuada en las células mesenquimales humanas en suspensión, pero no en tejido .....	101
Caracterización y trasplante de células mieloides inmaduras monocíticas .....	102
<i>Las células mieloides inmaduras monocíticas se comportan como células mieloides supresoras ante condiciones patológicas.....</i>	103
<i>Las células mieloides inmaduras monocíticas no llegan al cerebelo de los ratones PCD tras su inyección intravenosa.....</i>	104
<i>La inyección intracerebelosa de células mieloides inmaduras monocíticas evita los efectos adversos causados por una cirugía estereotáctica .....</i>	105
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>109</b>
<b>APÉNDICE I: SOLUCIONES DE USO COMÚN.....</b>	<b>113</b>
<b>APÉNDICE II: ARTÍCULOS CIENTÍFICOS ELABORADOS HASTA LA FECHA, RELACIONADOS CON LA PRESENTE TESIS DOCTORAL .....</b>	<b>119</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>199</b>



## **ABREVIATURAS**



## ABREVIATURAS

**ANOVA:** análisis de la varianza (del inglés *ANalysis Of VAriance*)

**BO:** bulbo olfativo principal

**CCM:** capa de las células mitrales

**CCP1:** carboxipeptidasa citosólica 1 (del inglés *Cytosolic CarboxyPeptidase 1*)

**CG:** capa glomerular

**CGr:** capa de los granos

**CNO:** capa del nervio olfativo

**CPE:** capa plexiforme externa

**CPI:** capa plexiforme interna

**DAPI:** 4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato

**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium

**dUTP:** desoxiuridina trifosfato

**EAE:** encefalomiелitis autoinmune experimental

**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético (del inglés *EthyleneDiamineTetraacetic Acid*)

**ESM:** error estándar de la media

**Fc:** fracción cristalizable o constante

**GFAP:** proteína ácida fibrilar glial (del inglés *Glial Fibrillary Acidic Protein*)

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

**hMSCs:** células madre mesenquimales humanas (del inglés *human Mesenchymal Stem Cells*)

**IMCs:** células mieloides inmaduras (del inglés *Immature Myeloid Cells*)

**IMDM:** Iscove's Modified Dulbecco's Medium

**iNOS:** sintasa de óxido nítrico inducible (del inglés *inducible Nitric Oxide Synthase*)

**LPS:** lipopolisacárido

**MDSCs:** células mieloides supresoras (del inglés *Myeloid-Derived Suppressor Cells*)

**MFI:** intensidad media de fluorescencia (del inglés *Mean Fluorescence Intensity*)

**MHC:** complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés *Major Histocompatibility Complex*)

**MSCs:** células madre mesenquimales (del inglés *Mesenchymal Stem Cells*)

**NO:** óxido nítrico (del inglés *Nitric Oxide*)

**pb:** pares de bases

**PB:** tampón fosfato (del inglés *Phosphate Buffer*)

**PBS:** tampón fosfato salino (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*)

**RPMI:** Roswell Park Memorial Institute

**SBPE:** sustancia blanca periependimaria

**SDS:** dodecilsulfato sódico (del inglés *Sodium Dodecyl Sulfate*)

**SNC:** sistema nervioso central

**SP:** población lateral (del inglés *Side Population*)

**SSC:** citrato sódico salino (del inglés *Saline Sodium Citrate*)

**Th:** (linfocito) T helper o colaborador

**Treg:** (linfocito) T regulador

**TUNEL:** Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling



*“Si el cerebro humano fuese tan simple que pudiésemos entenderlo, entonces seríamos tan simples que no podríamos.”*

*Emerson M. Pugh*

# **INTRODUCCIÓN**



## ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS, SISTEMA INMUNITARIO Y TERAPIA CELULAR

Las enfermedades neurodegenerativas son patologías que presentan una gran diversidad, con incidencias, etiologías y pronósticos variados. Sin embargo, todas tienen en común la pérdida progresiva de elementos neurales que termina ocasionando trastornos neurológicos graves. Estas patologías representan un gran reto para la humanidad, por ser una de las principales causas de discapacidad (Gammon, 2014). Además, su impacto socioeconómico es considerable y será mayor en el futuro debido, en parte, al envejecimiento general de la población (Gitler *et al.*, 2017; Stephenson *et al.*, 2018).

Una característica común en la mayoría de enfermedades neurodegenerativas es el desarrollo de reacciones inflamatorias, que pueden exacerbar la muerte neuronal primaria. Estos procesos inflamatorios no solo implican a células del propio tejido nervioso (microglía y astrogía), sino también a células del sistema inmunitario periférico. Este será uno de los temas primordiales que se tratarán en esta Tesis Doctoral.

A día de hoy, estas patologías son incurables. Por ello, la comunidad científica está haciendo grandes esfuerzos para tratar de ponerles remedio o, al menos, de paliar sus síntomas. En este sentido, una de las líneas de investigación que se lleva explorando durante los últimos años es la terapia celular, que propone el trasplante de células madre como enfoque terapéutico. Precisamente, el desarrollo de nuevas terapias celulares constituirá el segundo tema principal de este proyecto.

Comenzaremos la Introducción de esta Tesis Doctoral describiendo las principales alteraciones del sistema inmunitario que se han asociado con las enfermedades neurodegenerativas, tanto a nivel del sistema nervioso central (SNC) como en el resto del organismo. Posteriormente, haremos referencia a la búsqueda de nuevas terapias para hacer frente a estas patologías devastadoras, centrándonos en la terapia celular. Finalmente, resumiremos las principales características del modelo animal empleado, el ratón mutante PCD (del inglés *Purkinje Cell Degeneration*), señalando su importancia y utilidad para este trabajo.

### Reacciones inflamatorias asociadas a la neurodegeneración

A continuación, se describirán los principales procesos inflamatorios que tienen lugar durante las enfermedades neurodegenerativas, resumiendo primero la reacción de las células propias del SNC (astrocitos y microglía) y detallando posteriormente las alteraciones que se han observado en el sistema inmunitario periférico.

## Gliosis reactiva

Cuando existe un daño en el sistema nervioso, ya sea por procesos infecciosos, trauma, ictus o neurodegeneración, las neuronas dañadas liberan moléculas de señalización (Garden y Moller, 2006; Milligan y Watkins, 2009; Kabba *et al.*, 2018). Esas moléculas son detectadas por poblaciones gliales, de manera que la microglía y la astrogía se activan, desencadenándose un proceso inflamatorio conocido como **gliosis reactiva** (Milligan y Watkins, 2009; Sofroniew y Vinters, 2010; Baltanás *et al.*, 2013). Inicialmente, el objetivo de esta respuesta glial está encaminado a proteger la región dañada. Para llevar a cabo esta función, tanto la microglía como los astrocitos experimentan cambios morfológicos importantes. Así, la microglía aumenta su tamaño y sus ramificaciones se acortan y aumentan de grosor (Kim y de Vellis, 2005). Los astrocitos también se hipertrofian y sobreexpresan fuertemente una proteína del citoesqueleto, la GFAP<sup>1</sup>. Una vez activadas, estas células gliales secretan un amplio abanico de mediadores inflamatorios que permiten mantener la respuesta inflamatoria, pero también confieren un entorno neuroprotector en la región afectada (Streit, 2002; Escartin y Bonvento, 2008). Sin embargo, en determinadas ocasiones, la glía reactiva desarrolla una respuesta inflamatoria exacerbada, y en vez de proteger las neuronas circundantes tiene consecuencias neurotóxicas (Wyss-Coray y Mucke, 2002; Zeng *et al.*, 2005). Es decir, la gliosis reactiva puede ejercer efectos beneficiosos o perjudiciales ante un proceso neurodegenerativo (Wyss-Coray y Mucke, 2002). Por su parte, los oligodendrocitos no parecen intervenir de forma activa durante la reacción glial, pero estas células pueden resultar afectadas por una respuesta glial descontrolada (Li *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008; Baltanás *et al.*, 2013).

Dependiendo de la intensidad de la gliosis se han descrito dos tipos de estados inflamatorios, especialmente en el caso de la microglía. Un estado **proinflamatorio** o **M1** refleja una activación desmesurada de las células gliales que, como consecuencia, producen un entorno neurotóxico en la región ya dañada. En cambio, en su estado **antiinflamatorio** o **M2** la glía responde de forma proporcional al daño, confiriendo neuroprotección a las células no afectadas (Milligan y Watkins, 2009; Tang y Le, 2016). Este paradigma dual M1/M2, aunque simplista, se ha estudiado profundamente durante los últimos años para intentar dilucidar el papel de la microglía en la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas (Tang y Le, 2016). Sin embargo, el fenotipo de estas células es bastante variable para cada patología, ya que depende completamente del microambiente en el que se encuentren (Dubbelaar *et al.*, 2018).

---

<sup>1</sup> Del inglés *Glial Fibrillary Acidic Protein*

## Alteraciones leucocitarias

Las enfermedades neurodegenerativas generalmente van acompañadas de reacciones inflamatorias locales que se han asociado con una infiltración alterada de células sanguíneas hacia el sistema nervioso dañado (Zlokovic, 2011; Ransohoff y Brown, 2012; Keaney y Campbell, 2015). Este fenómeno constituye un proceso crítico para la regulación de la microglía, tipo celular clave en la neuroinflamación y, de hecho, parece estar involucrado en la progresión del proceso neurodegenerativo (González *et al.*, 2014; Boyko *et al.*, 2017; McManus y Heneka, 2017). Recientemente se han identificado alteraciones funcionales en los leucocitos a nivel periférico en varias enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Alzheimer (Ray *et al.*, 2007; Ciaramella *et al.*, 2016; Gupta *et al.*, 2018; Le Page *et al.*, 2018;), la enfermedad de Huntington (Björkqvist *et al.*, 2008) o la enfermedad de Parkinson (Scherzer *et al.*, 2007; Fuzzati-Armentero *et al.*, 2019). Estas alteraciones incluyen cambios en la distribución y activación de linfocitos y macrófagos (Lucin y Wyss-Coray, 2009). Los últimos generalmente presentan un fenotipo proinflamatorio en pacientes con enfermedades neurodegenerativas (González y Pacheco, 2014). Además, se han detectado niveles incrementados de citocinas proinflamatorias tanto en la sangre como en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con enfermedad de Alzheimer o de Parkinson (Boyko *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018a). En este contexto, cada vez hay una mayor evidencia de que los sistemas nervioso e inmunitario están estrechamente comunicados (Giménez-Llort *et al.*, 2012; Busse *et al.*, 2017; Dantzer, 2018), de manera que las alteraciones que ocurren en uno de ellos afectan al otro. De hecho, parece ser que los mediadores inflamatorios generados durante un daño nervioso pueden migrar al resto del organismo y actuar sobre el sistema inmunitario periférico (Gupta *et al.*, 2018; Le Page *et al.*, 2018), contribuyendo así a activar o reclutar células sanguíneas (Ransohoff y Brown, 2012). Como resultado, ha surgido una nueva aproximación terapéutica para paliar los procesos de pérdida neuronal que consiste en modular la función del sistema inmunitario periférico (Björkqvist *et al.*, 2009; Le Page *et al.*, 2018).

En definitiva, parece necesario comprender cómo responde el sistema inmunitario periférico ante enfermedades neurodegenerativas para tratar de predecir, retrasar o detener su progresión. Por todo ello, en la primera parte de esta Tesis Doctoral se explorarán posibles alteraciones leucocitarias ante procesos de muerte neuronal selectiva, tanto a nivel central como periférico.

## Terapia celular: la importancia de las células derivadas de la médula ósea

La capacidad de regeneración del SNC es muy limitada, hecho que ha supuesto un enorme desafío en el desarrollo de terapias efectivas contra las enfermedades neurodegenerativas (Chen *et al.*, 2018b). El uso de células madre ha surgido como una aproximación terapéutica a tener en cuenta,

tanto para tratar de reemplazar las neuronas o células gliales perdidas, como para promover un ambiente neuroprotector (Lindvall *et al.*, 2004; Dantuma *et al.*, 2010; Lindvall y Kokaia, 2010).

Las células madre se pueden definir como células indiferenciadas que presentan capacidad de autorrenovación ilimitada y capacidad de diferenciación en diversos tipos celulares maduros o en poblaciones de células progenitoras con un potencial de diferenciación más restringido (Mimeault y Batra, 2006). Atendiendo a su origen, las células madre se pueden clasificar en cuatro tipos: células madre **embrionarias**, células madre **fetales**, células madre **pluripotentes inducidas** y células madre **adultas** (Bacakova *et al.*, 2018). Estas últimas son las que más se utilizan a nivel clínico, a pesar de poseer un potencial de diferenciación más restringido, puesto que no presentan las preocupaciones éticas ni los problemas técnicos de los demás tipos celulares (Dantuma *et al.*, 2010; Li y Hua, 2017). En concreto, las **células madre derivadas de la médula ósea** se han convertido en una herramienta prometedora en el campo de la medicina regenerativa (Tögel y Westenfelder, 2007). Además, la médula ósea es una fuente ideal de células madre puesto que es fácilmente accesible y contiene varias poblaciones distintas: las células madre hematopoyéticas (Becker *et al.*, 1963), las células madre estromales (Friedenstein *et al.*, 1968) y las células de la población lateral (Goodell *et al.*, 1996).

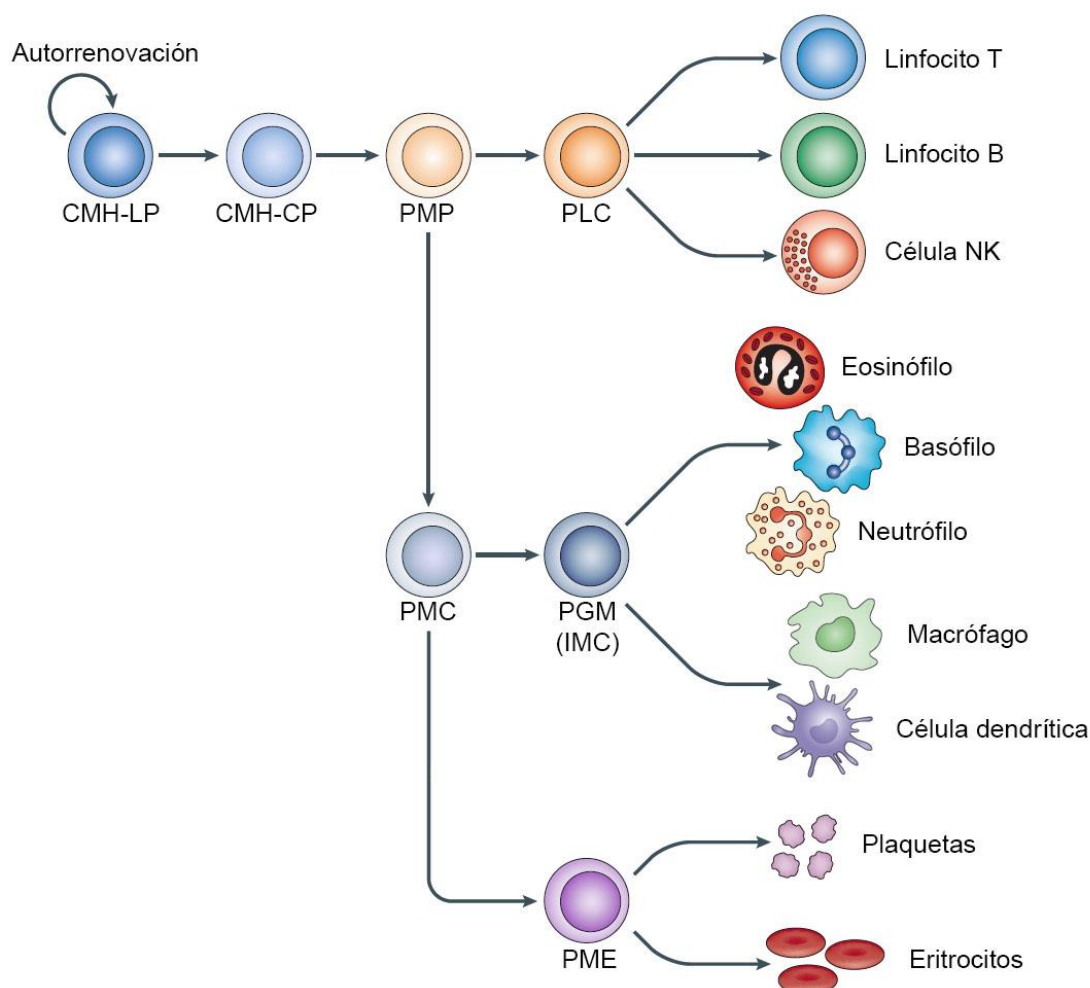
Las **células madre hematopoyéticas** son células multipotentes que se diferencian en los linajes mieloide, linfoide y eritroide. De este modo, son capaces de originar todos los elementos formes de la sangre durante toda la vida del organismo (Fig. 1). Las **células madre estromales** son una población heterogénea, de la que se han descrito distintos tipos (Mimeault y Batra, 2006), siendo el mayoritario las **células estromales mesenquimales multipotentes** o, simplemente, **células madre mesenquimales** (MSCs<sup>2</sup>; Dominici *et al.*, 2006). Estas células son responsables de originar todos los elementos del estroma, tanto células de un modo directo, como componentes de la matriz extracelular más indirectamente a través de su progenie (Uccelli *et al.*, 2008; Shi, 2012). Dichos elementos estromales participan en la regulación de la hematopoyesis, así como en la remodelación ósea (Reagan y Rosen, 2016), mediante la liberación de factores solubles y de proteínas de la matriz extracelular (Shi, 2012). Finalmente, también se han descrito las **células de la población lateral** o **SP<sup>3</sup>**, que no serían más que células madre hematopoyéticas más primitivas, que se distinguen por poseer una gran capacidad para expulsar moléculas extrañas o xenobióticos (Wolmarans *et al.*, 2018).

En los últimos años se ha demostrado que las células madre adultas derivadas de la médula ósea son capaces de migrar al encéfalo e integrarse, llegando a expresar marcadores tanto gliales como neuronales (Eglitis y Mezey, 1997; Brazelton *et al.*, 2000; Mezey *et al.*, 2000; Recio *et al.*,

<sup>2</sup> Del inglés *multipotent Mesenchymal Stromal Cells* o *Mesenchymal Stem Cells*

<sup>3</sup> Del inglés *Side Population*

2011). Más recientemente, se está aprovechando el potencial neuroprotector de estas células con el fin de diseñar nuevas estrategias para paliar procesos neurodegenerativos (Díaz *et al.*, 2015). Particularmente, para esta Tesis Doctoral, se ha propuesto el empleo de dos tipos específicos de células madre derivadas de la médula ósea, las **células mesenquimales humanas** (hMSCs) y las **células mieloides supresoras** (MDSCs<sup>4</sup>), por sus propiedades inmunomoduladoras y neuroprotectoras.



**Figura 1.** Esquema que representa las rutas hematopoyéticas. Las células madre hematopoyéticas a largo plazo (CMH-LP), tienen la capacidad de autorrenovarse durante toda la vida de un animal y de dar lugar a todos los elementos formes de la sangre. Otras células multipotentes -las células madre hematopoyéticas a corto plazo (CMH-CP) y los progenitores multipotentes (PMP)- tienen menor capacidad de autorrenovación. Estos últimos se diferencian en los progenitores de las dos ramas principales del desarrollo hematopoyético, por un lado, el progenitor linfocítico común (PLC) y, por otro, el progenitor mielocítico común (PMC). A partir de estos dos progenitores se diferencian otra serie de células progenitoras y precursoras que acaban dando lugar a las células sanguíneas maduras, representadas a la derecha. IMC, célula mielocítica inmadura; PGM, progenitor de granulocitos y macrófagos; PME, progenitor de megacariocitos y eritrocitos; NK, natural killer. Modificado de King y Goodell, 2011.

<sup>4</sup> Del inglés *Myeloid-Derived Suppressor Cells*

## CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

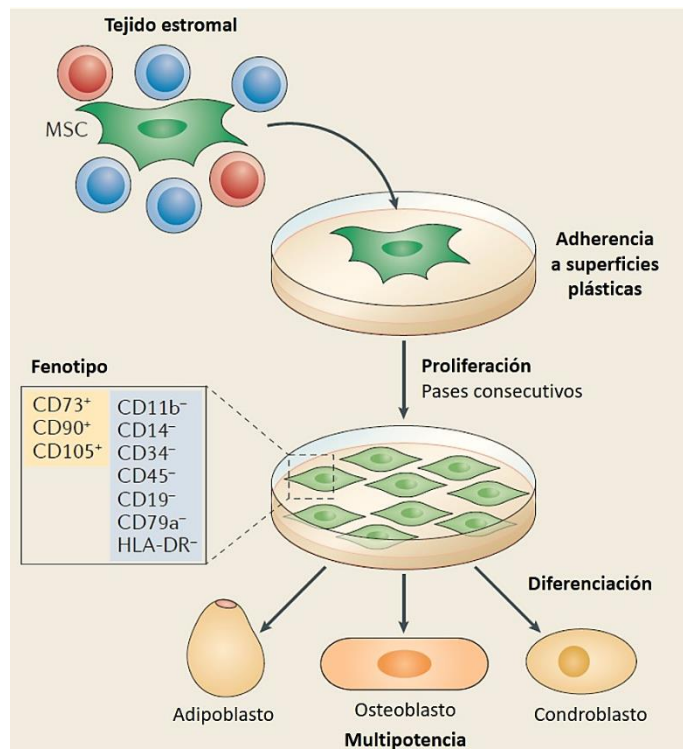
En este apartado se definirán las MSCs y se resaltarán las propiedades biológicas que las hacen tan atractivas en el campo de la terapia celular.

### Características generales

Las MSCs fueron aisladas inicialmente a partir de la médula ósea de roedores (Friedenstein *et al.*, 1970). Se caracterizaron como una población heterogénea de células madre estromales que proliferan *in vitro* como células que se adhieren al plástico, con una morfología similar a los fibroblastos, y capaces de diferenciarse al menos en osteoblastos, condrocitos y adipocitos, tanto *in vitro* como *in vivo* (Friedenstein *et al.*, 1974; Uccelli *et al.*, 2008).

Aparte de su adherencia a superficies plásticas y de su capacidad de diferenciarse en células del linaje mesodérmico, las MSCs se definen por presentar ciertos marcadores de superficie (Fig. 2; Le Blanc y Mougiakakos, 2012). Aunque las MSCs cultivadas *in vitro* representan una población heterogénea y carecen de un marcador específico, está aceptado que no expresan los marcadores hematopoyéticos CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79a y HLA-DR<sup>5</sup>, mientras que expresan niveles variables de CD105, CD90 y CD73 (Dominici *et al.*, 2006).

**Figura 2.** Criterios para definir las MSCs. La Sociedad Internacional de Terapia Celular (<https://isctglobal.org/>) ha propuesto una serie de criterios mínimos para definir estas células. El primero de ellos se basa en su adherencia al plástico, hecho que permite aislarlas de otros tipos celulares tras pases consecutivos. El segundo criterio es fenotípico, y tiene en cuenta la expresión positiva o negativa de ciertos marcadores de superficie. Finalmente, el tercer criterio considera su potencial para diferenciarse en células del linaje mesodérmico. En concreto, las MSCs deben ser capaces de diferenciarse en osteoblastos, adipoblastos y condroblastos. Este conjunto de pautas ha servido de base para comparar resultados entre diferentes grupos de investigación. Modificado de Le Blanc y Mougiakakos, 2012.



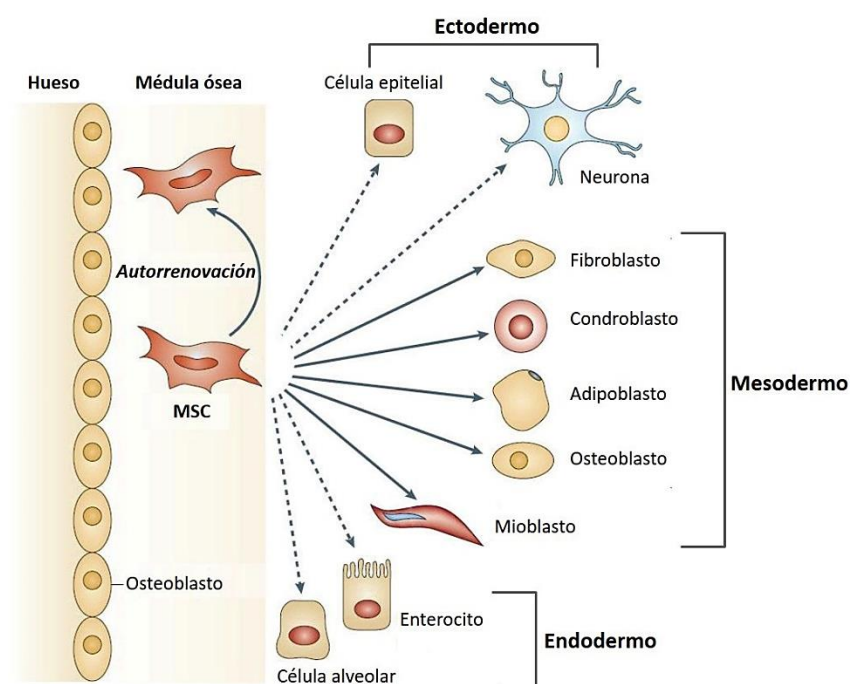
<sup>5</sup> CD: cluster of differentiation; HLA: human leukocyte antigen.



Actualmente se sabe que las MSCs son capaces de diferenciarse en muchas otras células del linaje mesodérmico, como fibroblastos modificados -característicos de los tendones y de los ligamentos- así como mioblastos (Dimarino *et al.*, 2013). También se ha observado que pueden diferenciarse *in vitro* en células de otros linajes germinales, como células epiteliales y neuronas (linaje ectodérmico), o enterocitos y células alveolares (linaje endodérmico; Fig. 3; Uccelli *et al.*, 2008). Varios estudios contemplan la transdiferenciación de las MSCs en células neurales *in vivo* (Kopen *et al.*, 1999; Muñoz-Elías *et al.*, 2004). Sin embargo, existe mucha controversia sobre la funcionalidad de las células neurales transdiferenciadas y, en cualquier caso, el número de MSCs que expresan marcadores de diferenciación neural es tan bajo que no explicaría los efectos encontrados tras su uso en modelos de enfermedades neurodegenerativas (Maltman *et al.*, 2011), al menos en lo que respecta a un posible reemplazo de neuronas en degeneración.

Las MSCs se pueden aislar a partir de muchos tejidos fetales y adultos tales como el cordón umbilical (sangre y gelatina de Wharton), el líquido amniótico, el hígado fetal, el tejido placentario, la membrana sinovial, el periostio, el tejido adiposo, la dermis, el músculo esquelético, la pulpa dental e incluso la sangre periférica (Chen *et al.*, 2008; Seo y Cho, 2012). No obstante, se han caracterizado principalmente aquellas que derivan directamente de la médula ósea, donde representan una población muy escasa (0,001-0,01 % del total de las células nucleadas; Pittenger *et al.*, 1999). El estroma de la médula ósea, además de por vasos sanguíneos, está formado por células reticulares, adipocitos, macrófagos y las propias MSCs. Las MSCs pueden diferenciarse en células reticulares (y estas a su vez en adipocitos), directamente en adipocitos, pero también en células endoteliales, pericitos y osteoblastos, todas estas células implicadas en el correcto funcionamiento de la hematopoyesis

**Figura 3.** Esquema que representa la multipotencialidad de las MSCs. Se puede observar su capacidad de autorrenovación (flecha curvada) y de diferenciación en tipos celulares del linaje mesodérmico (flechas rectas y continuas). Su capacidad de transdiferenciación en células de otros linajes (ectodérmico y endodérmico) se muestra en flechas discontinuas, ya que todavía es objeto de discusión *in vivo*. Modificado de Uccelli *et al.*, 2008.



(Uccelli *et al.*, 2008; Shi, 2012; Pinho y Frenette, 2019). De este modo, las MSCs son responsables de proporcionar un microambiente que apoya el mantenimiento de las células madre/progenitoras hematopoyéticas, controlando su proliferación, diferenciación y movilización hacia los sinusoides (Uccelli *et al.*, 2008; Méndez-Ferrer *et al.*, 2010; Shi, 2012; Morrison y Scadden, 2014).

## **Terapia celular con células madre mesenquimales**

Las MSCs son candidatas excelentes para la terapia celular, ya que muestran una gran propensión a reparar tejidos dañados en respuesta a una lesión o patología (Phinney y Prockop, 2007; Chen *et al.*, 2008). Una de sus principales ventajas es que son accesibles fácilmente y pueden expandirse *in vitro* rápidamente, resultando en cantidades suficientes para su explotación clínica (Volkman y Offen, 2017). De hecho, se ha demostrado que pueden mantener su multipotencialidad tras sufrir hasta 25 divisiones en cultivo (Meyerrose *et al.*, 2010). Asimismo, una de sus ventajas principales es que son unas células muy poco inmunogénicas, tanto *in vitro* como en estudios preclínicos y clínicos, un hecho que allana el camino para realizar trasplantes alogénicos (Le Blanc, 2006; Uccelli *et al.*, 2008). Efectivamente, las MSCs expresan bajos niveles del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC<sup>6</sup>-I) y no expresan ni MHC-II ni moléculas coestimuladoras (CD40, CD80 y CD86; Maltman *et al.*, 2011; Le Blanc y Mougiakakos, 2012). Además, son capaces de suprimir muchas funciones de los linfocitos T y B, de las células dendríticas y de las células NK (Meirelles *et al.*, 2009; Shi, 2012). Debido a ello, las MSCs se han utilizado ampliamente para prevenir o tratar la enfermedad de injerto contra huésped (Herrmann y Sturm, 2014). Otra cualidad interesante es que son capaces de favorecer el trasplante de células madre hematopoyéticas (Le Blanc y Mougiakakos, 2012; Kim *et al.*, 2013).

Por otra parte, las MSCs expresan un amplio número de proteínas reguladoras que modulan tanto la inflamación como la apoptosis; ello les permite responder de forma diferente a daños o lesiones dependiendo del microambiente en el que se encuentren, y a pesar de presentar una integración en los tejidos bastante limitada (Phinney y Prockop, 2007). También pueden secretar moléculas que estimulan la proliferación y diferenciación de las células madre locales (Yoo *et al.*, 2008; Hatzistergos *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2012; Karantalis y Hare, 2015; Premer *et al.*, 2015). Como consecuencia, las MSCs son capaces de acrecentar la capacidad regenerativa innata de los tejidos dañados.

A la hora de efectuar un tipo de terapia celular, es importante que las células trasplantadas puedan acceder fácilmente al órgano diana para ejercer sus efectos terapéuticos. En algunos tejidos, como el SNC, la administración *in situ* puede ser complicada o generar aún más daños. Este obstáculo

---

<sup>6</sup> Del inglés *Major Histocompatibility Complex*

puede ser superado por las MSCs, ya que cuando se administran de forma intravenosa parecen migrar y asentarse en el sitio de la lesión, donde favorecen la recuperación funcional (Kemp *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2012; Díaz *et al.*, 2015). De forma similar a las células del sistema inmunitario, las MSCs pueden salir de los vasos sanguíneos gracias a la expresión de moléculas de adhesión en su superficie (Uccelli *et al.*, 2008). Así, se ha comprobado que estas células migran en respuesta a varias quimiocinas que se unen a receptores expresados en su superficie y que conducen la activación de metaloproteinasas que degradan la membrana basal, permitiendo así su extravasación (Uccelli *et al.*, 2008; DelaRosa *et al.*, 2012). Gracias a su atracción por tejidos dañados, las MSCs potenciadas genéticamente pueden ser excelentes vehículos para difundir moléculas bioactivas (Nakamura *et al.*, 2015). De hecho, las hMSCs se pueden modificar genéticamente de forma eficiente y duradera, sin afectar a su capacidad proliferativa o de diferenciación (Meyeroose *et al.*, 2010).

Por último, es necesario remarcar que el trasplante de MSCs, ya sea autólogo o alogénico, ha demostrado ser factible y seguro tanto en modelos animales como en los ensayos clínicos que se están llevando a cabo recientemente (Han *et al.*, 2019; Pittenger *et al.*, 2019; Kabat *et al.*, 2020). En la actualidad, ya son más de un millar los ensayos clínicos que aparecen registrados con las palabras “mesenchymal stem cells” (<https://clinicaltrials.gov/>), lo que ilustra el gran interés generado por las terapias basadas en las MSCs.

## Propiedades neuroprotectoras

La evidencia experimental en modelos preclínicos de enfermedades neurodegenerativas sugiere que las MSCs son unas células prometedoras para ejercer algún tipo de neuroprotección (Huang *et al.*, 2012). En los últimos años se ha demostrado que la administración de MSCs promueve la supervivencia neuronal en modelos animales de accidente cerebrovascular, lesión cerebral traumática, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple y ataxia espinocerebelosa (Jones *et al.*, 2010; Kassis *et al.*, 2011).

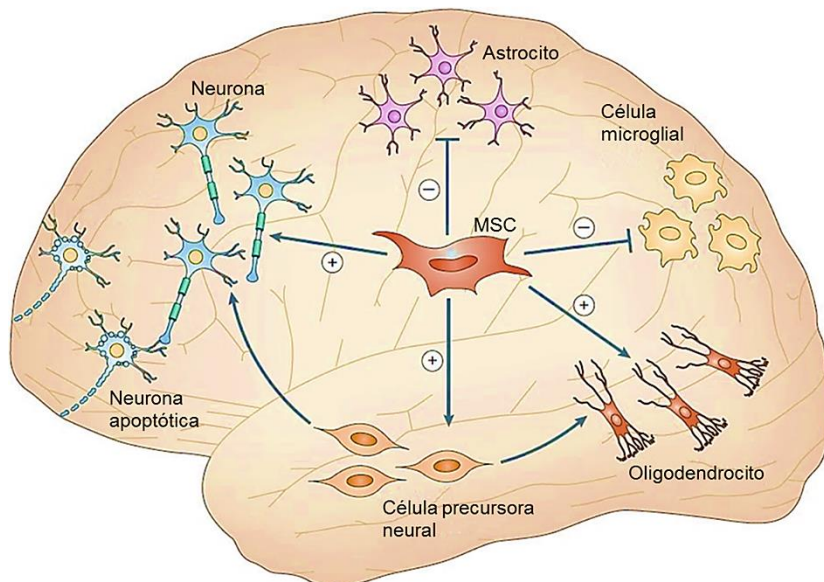
Las referencias actuales indican que las mejoras funcionales que aportan estas células no se deben al reemplazo celular, sino que ocurren a través de una serie de mecanismos paracrinos (Fig. 4; Uccelli *et al.*, 2008; Joyce *et al.*, 2010; Kassis *et al.*, 2011; Uccelli *et al.*, 2011; Seo y Cho, 2012):

- a) Una potente capacidad antiinflamatoria que se basa en inhibir la proliferación de los astrocitos y bloquear la activación de la microglía, o incluso inducir a la microglía a que adquiera un fenotipo más protector.
- b) La liberación de factores antiapoptóticos y neurotróficos que promueven la supervivencia de las neuronas y de los oligodendrocitos.

- c) La inducción de la proliferación de las células madre/progenitores neurales locales y su diferenciación en neuronas y, principalmente, en oligodendrocitos, fomentando así una posible remielinización de axones dañados.

Todos estos mecanismos resultan en el establecimiento de un microambiente neuroprotector. Entre los factores solubles secretados por las MSCs se encuentran BDNF, bFGF, CNTF, GDNF, HGF, NGF, NT-3 y VEGF<sup>7</sup> (Maltman *et al.*, 2011). Además, se ha descrito que ciertos componentes de la matriz extracelular segregados por las MSCs pueden facilitar el rebrote axonal y la sinaptogénesis (Joyce *et al.*, 2010; Maltman *et al.*, 2011; Seo y Cho, 2012).

Finalmente, se ha demostrado que las células madre derivadas de la médula ósea, tanto hematopoyéticas como mesenquimales, pueden fusionarse con ciertas neuronas del huésped, particularmente con las células de Purkinje (Álvarez-Dolado *et al.*, 2003; Weimann *et al.*, 2003; Bae *et al.*, 2007; Johansson *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2010; Kemp *et al.*, 2011; Recio *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2012b; Huda *et al.*, 2016). Aunque en general este proceso ocurre con una frecuencia muy baja, supone otro punto a tener en cuenta en la capacidad terapéutica de estas células, al poder emplearse como vectores de material genético mediante dicho proceso de fusión (Álvarez-Dolado, 2007; Chen *et al.*, 2011).



**Figura 4.** Mecanismos paracrinos que las MSCs ejercen sobre las células neurales. Las MSCs pueden rescatar de la apoptosis a las neuronas y los oligodendrocitos a través de la liberación de factores tróficos y antiapoptóticos, y son capaces de inhibir la proliferación y/o activación de los astrocitos y la microglía, resultando en la inducción de un ambiente neuroprotector. Además, las MSCs pueden promover la proliferación y maduración de las células precursoras neurales locales en neuronas y oligodendrocitos. Modificado de Uccelli *et al.*, 2008.

<sup>7</sup> BDNF: brain-derived neurotrophic factor; bFGF: basic fibroblast growth factor; CNTF: ciliary neurotrophic factor; GDNF: glial cell line-derived neurotrophic factor; HGF: hepatocyte growth factor; NGF: nerve growth factor; NT-3: neurotrophin 3; VEGF: vascular endothelial growth factor.

## CÉLULAS MIELOIDES SUPRESORAS

A continuación se explicarán las características generales y las propiedades inmunosupresoras de las MDSCs, así como sus posibilidades terapéuticas.

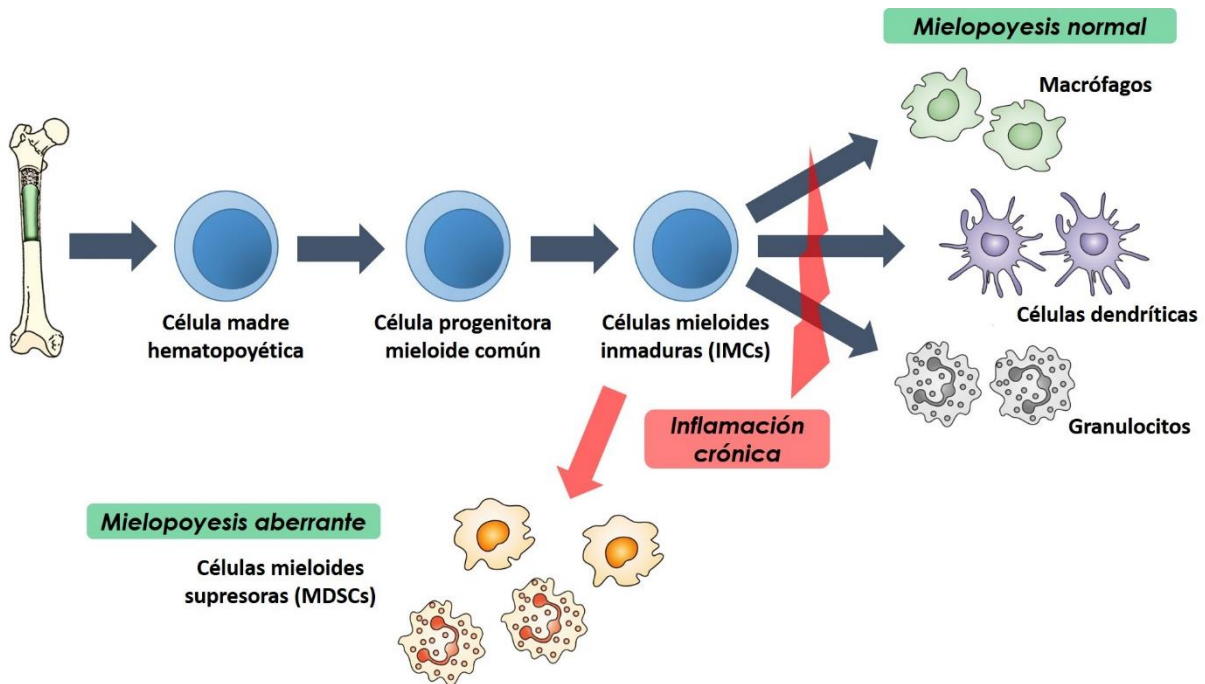
### Definición, origen y clasificación

Las MDSCs representan una población heterogénea de células mieloides inmaduras (IMCs<sup>8</sup>) con una capacidad notable para suprimir respuestas inmunitarias (Gabrilovich y Nagaraj, 2009). Estas células se identificaron inicialmente en los órganos linfoides de ratones portadores de tumores. En ese momento se conocían como “células supresoras naturales” y su presencia se comenzó a asociar con la progresión tumoral (Young *et al.*, 1987; Talmadge y Gabrilovich, 2013). Sin embargo, no fue hasta 2007 cuando recibieron su nomenclatura actual, pasando a denominarse *células mieloides supresoras* (Gabrilovich *et al.*, 2007). Este nombre se escogió para englobar tanto su origen mieloides como su principal característica funcional –una potente actividad inmunosupresora–. Desde la creación de este término, el interés en estas células ha crecido vertiginosamente, ya que se ha visto que son capaces de regular la respuesta inmunitaria no solo en el cáncer, sino también en diversas enfermedades inflamatorias, como infecciones, traumas, enfermedades autoinmunes y la enfermedad de injerto-contra-huésped (Bronte *et al.*, 2016).

El origen de las MDSCs tiene lugar durante un proceso patológico de mielopoyesis (Fig. 5). Durante la mielopoyesis de individuos sanos se generan continuamente IMCs que, posteriormente, migran hacia diferentes órganos periféricos donde se diferencian en células mieloides maduras. En la médula ósea murina sana, el 20-30 % de las células son IMCs, en el bazo representan solo el 2-4 %, y están ausentes en los ganglios linfáticos (Gabrilovich y Nagaraj, 2009). Muchas situaciones patológicas, como una infección o un daño tisular, intensifican la mielopoyesis con el fin de proporcionar células que hagan frente a la amenaza. Si estas situaciones se resuelven rápidamente, el número de células mieloides se restaura. Sin embargo, ante procesos inflamatorios crónicos o tumorales, se desencadena una mielopoyesis sostenida y aberrante que se caracteriza por la acumulación de IMCs que, en vez de diferenciarse en células maduras, experimentan una activación patológica por la que adquieren una actividad inmunosupresora considerable. Es en este momento cuando se conocen como MDSCs (Gabrilovich y Nagaraj, 2009; Gabrilovich *et al.*, 2012). En resumen, la actividad inmunosupresora de las MDSCs es inducible y aumenta drásticamente bajo condiciones proinflamatorias. Este hecho las convierte en una herramienta terapéutica atractiva para tratar patologías inflamatorias.

---

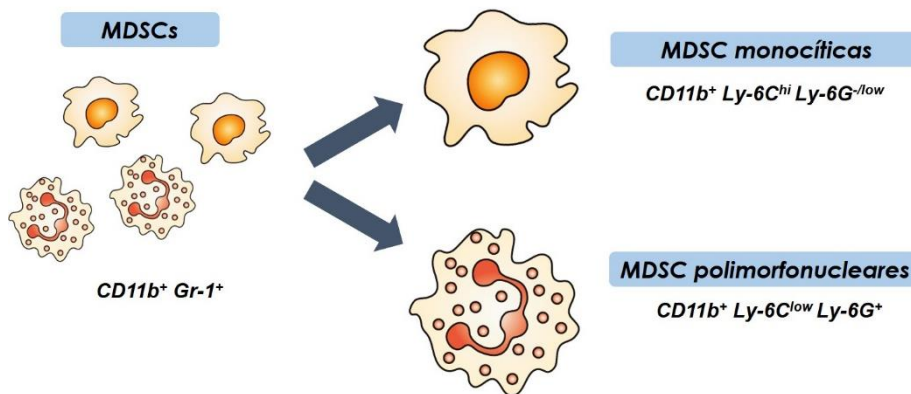
<sup>8</sup> Del inglés *Immature Myeloid Cells*



**Figura 5.** Origen de las MDSCs. En condiciones fisiológicas, las células madre hematopoyéticas se diferencian en IMCs a través de células progenitoras mieloides comunes. Estas IMCs, tras migrar a distintos órganos periféricos, dan lugar a células mieloides maduras, ya sea macrófagos, células dendríticas o granulocitos. Sin embargo, los factores que se producen durante procesos inflamatorios crónicos inducen la expansión y activación patológica de las IMCs. De este modo, adquieren funciones inmunosupresoras y pasan a conocerse como MDSCs.

En los ratones, las MDSCs se caracterizan por la coexpresión de dos marcadores mieloides, CD11b y Gr-1<sup>9</sup> (Bronte *et al.*, 1998). Más recientemente, se averiguó que los anticuerpos frente a Gr-1 se unen a dos proteínas diferentes, Ly-6G y Ly-6C. El uso de anticuerpos específicos para dichas proteínas permitió distinguir las dos subpoblaciones principales de MDSCs (Fig. 6; Movahedi *et al.*, 2008; Youn *et al.*, 2008):

- MDSCs polimorfonucleares
- MDSCs monocíticas



**Figura 6.** Clasificación de las MDSCs en ratones. Estas células pueden dividirse en dos conjuntos principales: las MDSCs monocíticas, que se definen como CD11b<sup>+</sup> Ly-6G<sup>-</sup> Ly-6C<sup>high</sup>, y las MDSCs polimorfonucleares, que se definen como CD11b<sup>+</sup> Ly-6G<sup>+</sup> Ly-6C<sup>low</sup>.

<sup>9</sup> Del inglés *granulocyte-differentiation antigen* o *granulocyte receptor-1*

Estos subtipos, no son solo diferentes morfológica y fenotípicamente, sino que también presentan diferencias bioquímicas y funcionales. Así, las MDSCs polimorfonucleares suprimen respuestas específicas de antígeno por parte de los linfocitos T, predominantemente a través de la producción de especies reactivas de oxígeno. A su vez, las MDSCs monocíticas controlan las respuestas inmunitarias de un modo más amplio, tanto específicas de antígeno como inespecíficas, principalmente a través de la acción combinada de la arginasa-1 y de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), y mediante la producción de especies reactivas de nitrógeno y de citocinas (Gabrilovich *et al.*, 2012). Además, mediante ensayos de inmunosupresión se ha comprobado que las MDSCs monocíticas tienen una mayor potencia supresora que las polimorfonucleares, tanto *in vitro* como *in vivo* (Movahedi *et al.*, 2008; Dolcetti *et al.*, 2010). Otra diferencia interesante es que las MDSCs polimorfonucleares no sobreviven fácilmente a la congelación, es decir, son altamente criosensibles (Trellakis *et al.*, 2013). Esto constituye otro punto a favor de usar las MDSCs monocíticas, sobre todo desde un punto de vista traslacional, ya que en humanos la fuente principal de MDSCs es la sangre periférica, la cual se congela en muchos casos para su almacenamiento (Pawelec *et al.*, 2019).

Algo importante a tener en cuenta es que los marcadores fenotípicos no son suficientes para identificar las MDSCs, puesto que las monocíticas y las polimorfonucleares poseen un fenotipo similar al de los monocitos inflamatorios y al de los neutrófilos, respectivamente. Por esta razón, es necesario realizar ensayos funcionales a la hora de trabajar con las MDSCs, ya que lo que realmente las distingue de otras poblaciones mieloides es su potente actividad inmunosupresora (Bronte *et al.*, 2016; Veglia *et al.*, 2018).

## Mecanismos inmunosupresores

Como se ha comentado previamente, la supresión inmunitaria es el rasgo principal de las MDSCs. Estas células utilizan una serie de mecanismos para regular tanto las respuestas inmunitarias innatas como adaptativas, aunque la supresión de los linfocitos T es su característica más distintiva (Nagaraj y Gabrilovich, 2008). A continuación comentaremos los 4 tipos principales de estos mecanismos (Fig. 7), que consisten en propiciar el catabolismo de la L-arginina, generar estrés oxidativo, inducir linfocitos T reguladores (Treg<sup>10</sup>) y regular la actividad de los macrófagos y la microglía.

---

<sup>10</sup> Linfocitos Treg: células capaces de suprimir la activación y expansión de linfocitos T autorreactivos y, por tanto, cruciales para mantener la tolerancia a antígenos propios.

## 1. Catabolismo de la L-arginina

Uno de los mecanismos fundamentales por el que las MDSCs efectúan la supresión de los linfocitos T se basa en eliminar la L-arginina del medio extracelular, que es esencial para su función y proliferación. Este aminoácido es el sustrato de dos enzimas, la arginasa-1 y la iNOS, ambas sobreexpresadas por las MDSCs. La arginasa-1 hidroliza la L-arginina dando lugar a L-ornitina y urea, mientras que la iNOS convierte la L-arginina en L-citrulina y en óxido nítrico (NO; Bronte y Zanovello, 2005). El consumo local de L-arginina reprime la traducción de la cadena  $\zeta$  de la molécula CD3, que es el principal componente en mediar la transducción del receptor del linfocito T. Asimismo, la privación de este aminoácido induce la parada del ciclo celular en fase G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>. En otras palabras, se inhibe la proliferación de los linfocitos T (Gabrilovich y Nagaraj, 2009; De Sanctis *et al.*, 2016).

## 2. Estrés oxidativo

El segundo mecanismo consiste en la liberación de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno. El NO originado por la acción de la iNOS bloquea la transducción de la señal del receptor de IL-2 de los linfocitos T y, además, induce directamente su apoptosis (Bronte y Zanovello, 2005; Gabrilovich y Nagaraj, 2009).

Por otro lado, las MDSCs expresan la NADPH oxidasa (especialmente las polimorfonucleares), que es la principal enzima leucocitaria encargada de producir especies reactivas de oxígeno (De Sanctis *et al.*, 2016). En concreto, el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) generado por esta enzima reacciona con el NO formando peroxinitrito, que es uno de los agentes oxidantes más potentes producidos por el organismo. Este compuesto es capaz de inducir la anergia<sup>11</sup> del linfocito T, mediante la nitración del receptor del linfocito T (Nagaraj *et al.*, 2007). La nitración es una modificación postraduccional que produce cambios conformacionales, en este caso, en el receptor del linfocito T, de tal suerte que se vuelve incapaz de reconocer su antígeno afín. Asimismo, la nitración de quimiocinas y sus receptores tiene un profundo impacto sobre el tráfico leucocitario (De Sanctis *et al.*, 2016). En particular, la quimiocina CCL2 modificada por nitración pierde su capacidad para atraer los linfocitos T hacia el núcleo tumoral, lo que supone que no puedan llevar a cabo su acción antitumoral y, de este modo, se favorezca el desarrollo del tumor (Molon *et al.*, 2011).

---

<sup>11</sup> Anergia: incapacidad del linfocito T para reaccionar ante un antígeno específico.



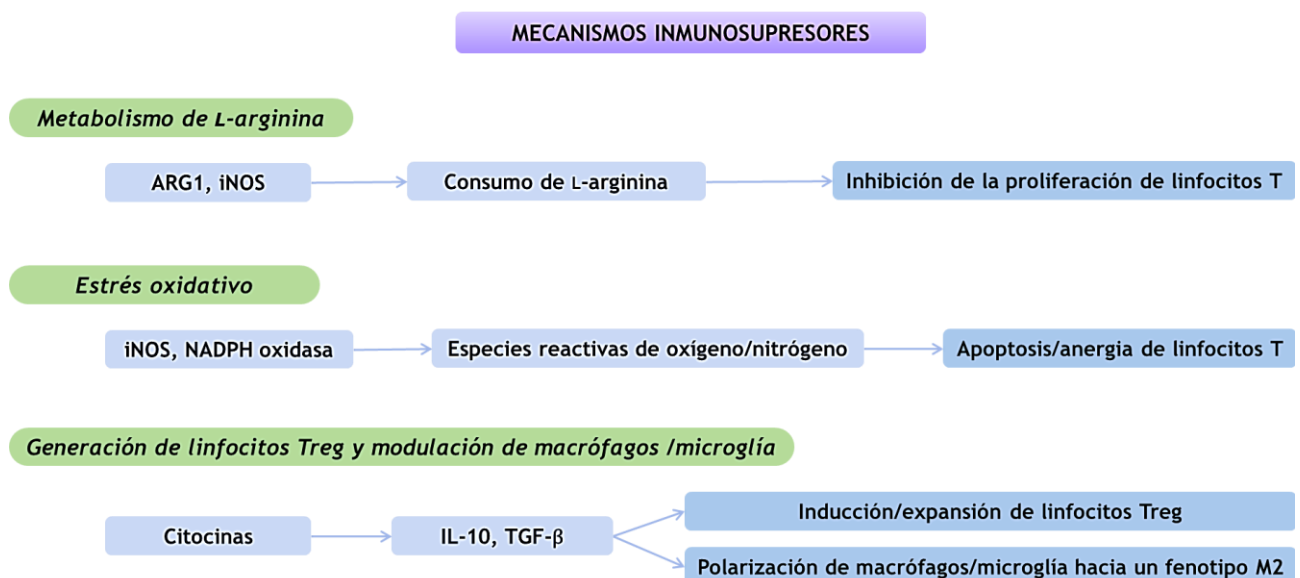
### 3. Inducción/expansión de linfocitos T reguladores

También se ha descrito la capacidad de las MDSCs para inducir la conversión de linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes en linfocitos Treg, así como para promover la expansión clonal de linfocitos Treg preexistentes. Los mecanismos no se conocen completamente, pero parecen involucrar interacciones célula-célula (CD40-CD40L; Pan *et al.*, 2010), además de la producción de factores solubles, tales como INF- $\gamma$ , IL-10 y TGF- $\beta$  (Huang *et al.*, 2006).

### 4. Modulación de macrófagos/microglía

Además de suprimir las respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos T, las MDSCs también regulan las respuestas inmunitarias innatas modulando los macrófagos/microglía y las células dendríticas, lo que pone de manifiesto la interrelación entre las células del linaje mieloide (Ostrand-Rosenberg *et al.*, 2012). En concreto, las MDSCs monocíticas dirigen la polarización de macrófagos/microglía hacia un fenotipo M2 o protector a través de citocinas, tales como la IL-10 (Sinha *et al.*, 2007; Bunt *et al.*, 2009; Hosomi *et al.*, 2019). Curiosamente, los propios macrófagos refuerzan su polarización, ya que estimulan a las MDSCs para producir más IL-10 (Sinha *et al.*, 2007).

La gran variedad de mecanismos inmunosupresores descritos no implica que estén funcionando todos a la vez (Fig. 7). La prevalencia de un determinado mecanismo dependerá del subconjunto de MDSCs, además del estado y la progresión de la patología (Gabrilovich, 2017).



**Figura 7.** Mecanismos inmunosupresores principales que emplean las MDSCs sobre los linfocitos T y la población de macrófagos/microglía.

## Aplicaciones terapéuticas

Actualmente está reconocido que las MDSCs son uno de los reguladores negativos principales del sistema inmunitario ante procesos inflamatorios persistentes (Bronte, 2009; Veglia et al., 2018). Teniendo en cuenta su potente carácter inmunosupresor, es posible que el papel principal de las MDSCs sea la protección del organismo frente a un daño tisular excesivo causado por una respuesta inmunitaria descontrolada. Desafortunadamente, los tumores son capaces de apropiarse y de amplificar esta actividad supresora para protegerse del ataque del sistema inmunitario (Bronte et al., 2016). Tanto es así que niveles mayores de MDSCs circulantes en pacientes con cáncer se correlacionan con una mayor carga tumoral y una peor prognosis (Youn et al., 2008; Díaz-Montero et al., 2009).

En general, se considera que las MDSCs ofrecen dos oportunidades terapéuticas. Por un lado, en modelos de cáncer, donde los efectos de las MDSCs resultan perjudiciales, se han propuesto cinco posibilidades de acción: promover la diferenciación de las MDSCs, bloquear su expansión, evitar su tráfico hacia el sitio tumoral, inhibir sus funciones supresoras o, directamente, eliminarlas de forma selectiva (Gimeno y Barquinero, 2011; Gabrilovich et al., 2012). Por otro lado, las MDSCs podrían ser una herramienta a tener en cuenta ante aquellas enfermedades inflamatorias donde controlar la respuesta inmunitaria puede ejercer efectos beneficiosos (Gimeno y Barquinero, 2011). En este contexto, el trasplante de MDSCs puede ser una oportunidad atractiva en el caso de enfermedades autoinmunes, de alotrasplantes o, incluso, de patologías neuroinflamatorias (Crook y Liu, 2014; Melero-Jerez et al., 2016; Zhang et al., 2018).

Si nos centramos en el SNC, las MDSCs se han estudiado en varias patologías: encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), encefalomiелitis por infección con el virus de Theiler, esclerosis múltiple, glioma, uveítis, lesión de médula espinal, malaria cerebral, ictus y lesión cerebral traumática (Melero-Jerez *et al.*, 2016; Hosomi *et al.*, 2019). No obstante, el trasplante de MDSCs solo se ha llevado a cabo en modelos de EAE y de lesión de médula espinal, al menos en lo que respecta a nuestro conocimiento (Saiwai *et al.*, 2013; Melero-Jerez *et al.*, 2016). En cuanto al modelo animal de EAE, el papel de las MDSCs guarda cierta controversia entre los diferentes estudios. Unos indican que estas células ayudan a perpetuar la enfermedad, mientras que otros notifican efectos beneficiosos (Ioannou *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2015). En lo que respecta al trasplante de MDSCs **en ratones con EAE**, en general se han obtenido efectos beneficiosos (Barnie *et al.*, 2017), empleando tanto MDSCs polimorfonucleares (Ioannou *et al.*, 2012) como monocíticas (Zhu *et al.*, 2011). En particular, se ha logrado retrasar la aparición y disminuir la gravedad de los síntomas, así como reducir significativamente las regiones desmielinizadas (Zhu *et al.*, 2011; Ioannou *et al.*, 2012). En relación al modelo murino con **lesión de la médula espinal**, se ha observado que el trasplante de MDSCs monocíticas

en las áreas lesionadas atenúa significativamente la inflamación aguda y promueve la reparación tisular mediante la creación de un ambiente permisivo para el desarrollo de macrófagos M2. En definitiva, se han conseguido efectos antiinflamatorios y neurotróficos, además de mejoras funcionales (Saiwai *et al.*, 2013).

En resumen, las MDSCs pueden constituir herramientas terapéuticas prometedoras ante varias enfermedades neuroinflamatorias (Melero-Jerez *et al.*, 2016), y esto es precisamente lo que se ha explorado en este trabajo de Tesis Doctoral.

## EL RATÓN MUTANTE PCD: MODELO DE NEURODEGENERACIÓN SELECTIVA

Tradicionalmente, las estirpes de animales portadoras de mutaciones han proporcionado información valiosa sobre el desarrollo y la función del organismo normal y patológico (Fernández-González *et al.*, 2002). Una gran ventaja de estos modelos mutantes es que son una alternativa más constante, sencilla y económica que los modelos inducidos por una lesión física o química, que pueden presentar efectos secundarios y resultados bastante heterogéneos.

Particularmente, los modelos animales que presentan muerte neuronal constituyen herramientas esenciales para comprender mejor las enfermedades neurodegenerativas. El uso de estos animales permite estudiar, no solo las respuestas del organismo ante dichas patologías, sino también ensayar nuevas terapias para prevenir la pérdida neuronal o lograr una recuperación funcional. Este es el caso del ratón mutante PCD, que se ha empleado en la presente Tesis Doctoral como modelo de neurodegeneración selectiva, ya que su mutación resulta en una muerte tardía de poblaciones neuronales muy concretas.

El hecho de que la neurodegeneración del ratón PCD ocurra de forma postnatal, cuando muchos circuitos sinápticos están ya establecidos, constituye una característica muy atractiva, ya que se evitan posibles mecanismos compensatorios prenatales (Fernández-González *et al.*, 2002; Valero *et al.*, 2006). Y aún más interesante es que los procesos degenerativos ocurren en regiones distintas y durante momentos bien definidos (Mullen *et al.*, 1976; Wang y Morgan, 2007). Como consecuencia, el ratón PCD es un excelente modelo para estudiar la muerte neuronal selectiva.

Además, otro punto a favor de investigar con el ratón PCD es que, muy recientemente, se han descubierto mutaciones en el gen correspondiente en seres humanos, que muestran una patología anatómica y clínica muy similar a la de los ratones (Shashi *et al.*, 2018; Karakaya *et al.*, 2019; Sheffer *et al.*, 2019).

## La mutación *pcd*

La mutación *pcd* apareció espontáneamente en la estirpe de ratón C57BR/cdJ en los laboratorios Jackson (Bar Harbor, Maine, EE. UU.) y, posteriormente, se transfirió a la estirpe C57BL/6J (Mullen *et al.*, 1976). Hasta el momento se han identificado 19 alelos distintos de la mutación *pcd* en diferentes cepas de ratón; algunos han surgido espontáneamente, mientras que otros se han generado químicamente o mediante mutagénesis dirigida (<http://www.informatics.jax.org/allele/summary?markerId=MGI:2159437>). La mutación original, que muestra el fenotipo más grave, se denominó *pcd<sup>lJ</sup>* (Fernández-González *et al.*, 2002), y es la que presenta el modelo animal objeto de estudio en este trabajo experimental.

La mutación *pcd* se localiza en el cromosoma 13 del ratón y se define como autosómica recesiva con penetrancia completa (Mullen *et al.*, 1976). El gen afectado se denomina *Ccp1* (también conocido como *Nnal* o *Agtbp1*) y codifica la carboxipeptidasa citosólica 1 (CCP1; Berezniuk *et al.*, 2012). Esta proteína se ha asociado con procesos de diferenciación y regeneración axonal (Harris *et al.*, 2000) y, más recientemente, se ha comprobado que está involucrada directamente en la dinámica del citoesqueleto actuando en la despoliglutamilación de la tubulina (Kalinina *et al.*, 2007; Rodríguez de la Vega *et al.*, 2007; Rogowski *et al.*, 2010): la proteína CCP1 es esencial para la estabilización de los microtúbulos (Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018). El alelo mutante *pcd<sup>lJ</sup>* del gen *Ccp1* no muestra diferencias en la secuencia codificante en relación al alelo silvestre. No obstante, el mRNA que traduce la proteína completa es indetectable en todos los tejidos a excepción del testículo, donde su expresión es mínima, por lo que se ha propuesto que la mutación *pcd* se encuentra en una región reguladora del gen *Ccp1* (Fernández-González *et al.*, 2002; Wang y Morgan, 2007).

## Efectos generales de la mutación *pcd*

El modelo murino PCD (alelo *pcd<sup>lJ</sup>*) se caracteriza por la degeneración selectiva y progresiva de al menos cuatro poblaciones celulares específicas, incluidas las células de Purkinje en el cerebelo, las células mitrales en el bulbo olfativo principal (BO), ciertas neuronas talámicas y los fotorreceptores en la retina (Mullen *et al.*, 1976). Todas estas células presentan una expresión robusta del gen *Ccp1* en los animales silvestres (Fernández-González *et al.*, 2002).

La degeneración de las células de Purkinje es la más temprana y rápida: tiene lugar entre la tercera y la cuarta semana postnatal, de manera que a los 40 días de edad postnatal (P40) ha muerto la práctica totalidad de estas neuronas (Landis y Mullen, 1978). Este hecho provoca una ataxia cerebelosa grave que constituye el rasgo fenotípico más llamativo de los ratones PCD (Landis y Mullen,

1978). De una forma más tardía se produce la degeneración de las células mitrales del BO, entre el segundo y el cuarto mes de vida postnatal, concluyendo en torno a P110 (Greer y Shepherd, 1982; Valero *et al.*, 2006). Este fenómeno conduce al desarrollo de una hiposmia, que se caracteriza por una disminución de la capacidad de detección y de discriminación olfativas (Díaz *et al.*, 2012a). Por su lado, determinadas poblaciones neuronales de los núcleos talámicos comienzan a degenerar a P50, permaneciendo tan solo el 10 % de estas a P90 (O'Gorman, 1985; O'Gorman y Sidman, 1985). Finalmente, la muerte de los fotorreceptores transcurre de manera lenta y gradual a lo largo de un año con características similares a una retinosis pigmentaria (Blanks *et al.*, 1982; LaVail *et al.*, 1982; Marchena *et al.*, 2011). En el presente trabajo nos hemos centrado en los escenarios degenerativos del BO y del cerebelo, puesto que son los mejor caracterizados y los que concluyen más temprano.

Otra característica de esta mutación es que ocasiona esterilidad en los machos, los cuales producen escasos espermatozoides y, además, con una morfología anormal y carentes de movilidad (Handel y Dawson, 1981). A diferencia de estos, las hembras mutantes son fértiles, aunque presentan dificultades en el cuidado de las crías, que son, además, poco numerosas (Mullen *et al.*, 1976). Por todo ello, la cría de los animales PCD se vuelve complicada, puesto que para los cruces solo se pueden emplear animales heterocigotos (+/*pcd*) y estos conciben animales homocigotos para la mutación (*pcd/pcd*) con una probabilidad mendeliana del 25 %. Más aún, el mantenimiento de los homocigotos adultos (*pcd/pcd*) requiere cuidados especiales debido a su ataxia incapacitante.

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

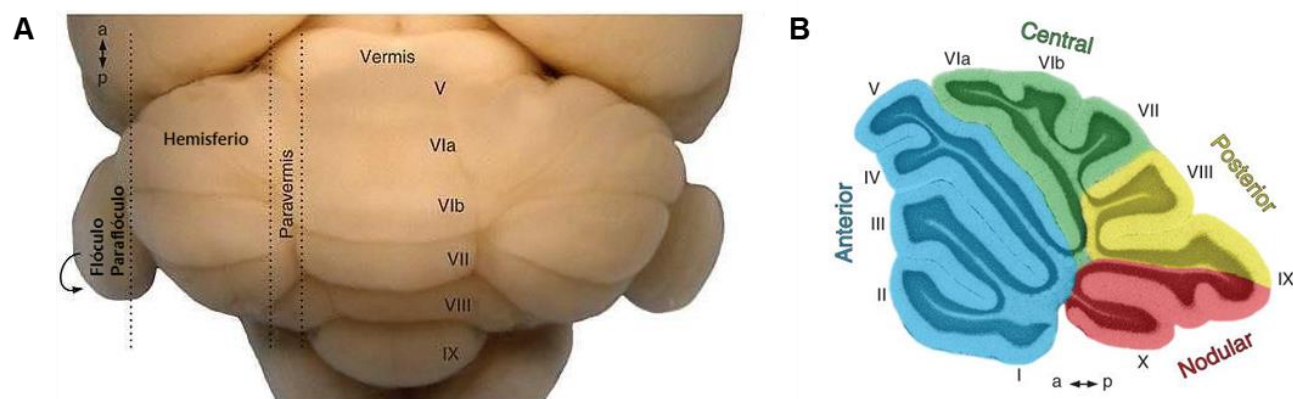
Antes de detallar los efectos concretos de la mutación *pcd* en el cerebelo, es conveniente introducir una serie de conceptos sobre la estructura y organización de esta región encefálica.

### Cerebelo: anatomía e histología generales

El cerebelo (del latín *cerebellum*: cerebro pequeño) es una estructura del SNC localizada en posición dorsal en la parte más caudal del encéfalo de los mamíferos, a excepción del ser humano en el que se sitúa por debajo del cerebro, también en posición caudal. Esta región ha sido concebida tradicionalmente como una estructura motora implicada en la regulación del movimiento más que en su ejecución. En concreto, el cerebelo regula el tono muscular, controla el equilibrio estático y dinámico, y participa en procesos de aprendizaje motor, incluida la memoria procedimental (Sotelo, 2004; Ito, 2006). Actualmente se sabe que el cerebelo no solo está implicado en tareas motoras, sino que también desempeña un papel importante en el procesamiento de funciones cognitivas y sociales (Reeber *et al.*, 2013; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018). De hecho, se ha demostrado que el cerebelo está

implicado en diversas enfermedades mentales o del neurodesarrollo, como trastornos del espectro autista, esquizofrenia y depresión (D'Angelo y Casali, 2012; Reeber *et al.*, 2013).

La organización externa del cerebelo muestra una región central llamada **vermis**, flanqueada por regiones laterales conocidas como **hemisferios cerebelosos**. La parte medial de los hemisferios que está en contacto con el vermis se conoce como **zona intermedia** o **paravermis** (Fig. 8A). En su superficie, el cerebelo presenta una serie de surcos conocidos como fisuras, que dividen la corteza cerebelosa en lóbulos (Sillitoe y Joyner, 2007). De hecho, se distinguen 10 lóbulos en todos los mamíferos, que se designan con números romanos (Beckinghausen y Sillitoe, 2019; Fig. 8B). Sin embargo, debido a las diferencias morfológicas existentes entre los hemisferios y el vermis, únicamente en este último se pueden distinguir correctamente todos los lóbulos en un mismo plano parasagital.

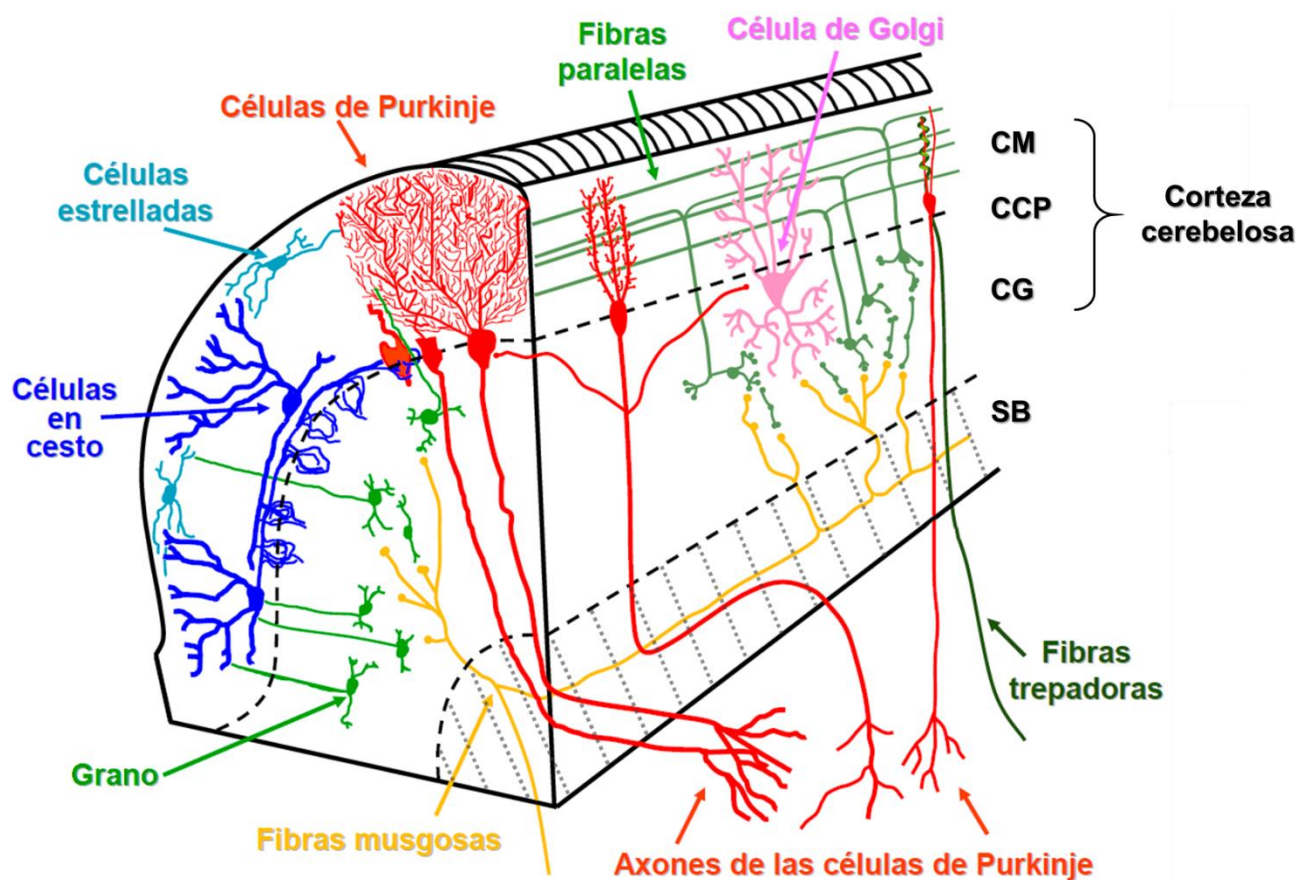


**Figura 8.** A) Cerebelo de un ratón adulto. Se aprecian las tres regiones principales: los hemisferios, la zona intermedia (paravermis) y el vermis. B) Sección sagital del vermis. Se pueden distinguir los 10 lóbulos cerebelosos. Modificado de White y Sillitoe, 2013.

A pesar de su apariencia externa compleja, el cerebelo consta de dos partes bien diferenciadas: la corteza cerebelosa y la sustancia blanca (Fig. 9). La **corteza cerebelosa** está dividida en tres capas perfectamente delimitadas que rodean una región rica en neuropilo, la sustancia blanca, donde a su vez se localizan cuatro pares de núcleos, denominados núcleos cerebelosos profundos. Las tres capas de la corteza cerebelosa resultan según la disposición que adquieren las neuronas más representativas del cerebelo: las células de Purkinje. Los somas de estas neuronas se disponen en forma de monocapa, constituyendo así la **capa de las células de Purkinje**. Por debajo de esta capa se sitúa la **capa de los granos**. El nombre de esta capa se debe a que en ella se localiza el tipo neuronal más numeroso del encéfalo: los granos cerebelosos. Por último, por fuera de la capa de las células de Purkinje se encuentra la **capa molecular**, que está constituida principalmente por neuropilo, aunque también se hallan aquí algunos somas neuronales, correspondientes a las células estrelladas y las células en cesto (Miall, 2013; White y Sillitoe, 2013). Aunque estos son los elementos más representativos de cada

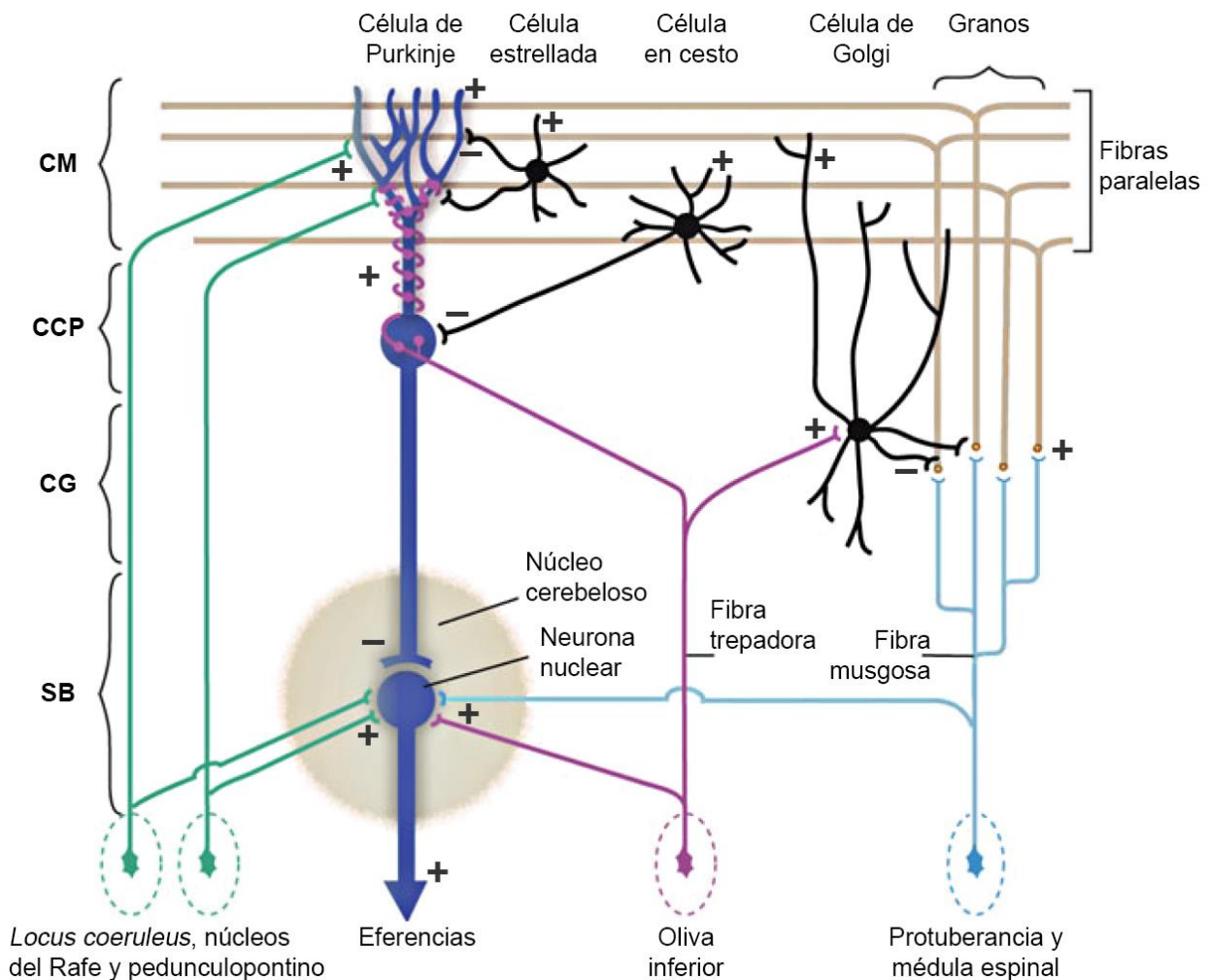
una de las capas de la corteza cerebelosa, la histología y conectividad de esta región encefálica es más compleja, como se puede observar en la Figura 9.

La capa más interna es la **sustancia blanca**, que está formada por axones, astrocitos fibrosos, microglía residente y abundantes oligodendrocitos. Los axones son tanto fibras aferentes y eferentes de la corteza cerebelosa, como axones intrínsecos que conectan diferentes áreas corticales entre sí. La sustancia blanca alberga los **núcleos cerebelosos** profundos que, desde la zona medial a la lateral son: el núcleo fastigial, el núcleo interpósito (globoso + emboliforme) y el núcleo dentado (Glickstein *et al.*, 2011). Estos núcleos son esenciales para la transmisión de información, ya que constituyen el único punto de relevo de las células de Purkinje en el envío de información fuera del cerebelo (Fink *et al.*, 2006).



**Figura 9.** Representación esquemática de la estructura trilaminar de la corteza cerebelosa y de sus tipos neuronales principales. En la capa molecular se localizan las células en cesto y las células estrelladas, junto con un abundante neuropilo, constituido fundamentalmente por las dendritas de las células de Purkinje, los axones de los granos (fibras paralelas) y las fibras trepadoras. A continuación, se localiza la capa de las células de Purkinje formada por los grandes somas de las células de Purkinje. La capa más interna, situada sobre la sustancia blanca, es la capa de los granos, compuesta por numerosos granos, además de otras interneuronas, como las células de Golgi. Las sinapsis entre fibras musgosas, granos y células de Golgi son abundantes y constituyen pequeñas estructuras de neuropilo denominadas “glomérulos cerebelosos”. CCP, capa de las células de Purkinje; CG, capa de los granos; CM, capa molecular; SB, sustancia blanca. Modificado de Recio, 2008.

La conectividad dentro del cerebelo se comprende en un alto grado de detalle, de manera que cada tipo celular forma conexiones estereotípicas con sus vecinas a lo largo de toda esta región encefálica (Beckinghausen y Sillitoe, 2019; Fig. 10). Así, la corteza cerebelosa recibe dos aferencias fundamentales: las fibras musgosas y las fibras trepadoras, ambas excitadoras (White y Sillitoe, 2013). Las **fibras musgosas** se originan en numerosos núcleos situados en el encéfalo y en la médula espinal, llegan a la capa granular y establecen contactos sinápticos sobre las dendritas de los granos (Voogd y Glickstein, 1998; Sillitoe y Joyner, 2007). A su vez, los granos proyectan axones ascendentes que se bifurcan en la capa molecular dando lugar a las fibras paralelas, cada una de las cuales se extiende varios milímetros transversalmente. A lo largo de su trayectoria, cada fibra paralela contacta con dendritas de cientos de células de Purkinje (White y Sillitoe, 2013). Por su parte, las **fibras trepadoras** son proyecciones axonales procedentes del complejo olivar inferior del tronco encefálico



**Figura 10.** Esquema del circuito cerebeloso básico. Se pueden observar las principales aferencias (fibras musgosas y trepadoras), así como los cinco tipos neuronales principales del cerebelo. +, sinapsis excitadora; -, sinapsis inhibitoria. CM, capa molecular; CCP, capa de las células de Purkinje; CG, capa de los granos; SB, sustancia blanca. Modificado de Miall, 2013.



(Ito, 2006). Estas fibras ascienden hasta la capa molecular, donde “trepan” alrededor del soma y las largas dendritas primarias de las células de Purkinje, estableciendo numerosas sinapsis (Miall, 2013).

En resumen, las células de Purkinje reciben información directa de las fibras trepadoras e indirecta de las fibras musgosas. Estos impulsos excitadores están modulados por las interneuronas inhibitorias de la capa molecular (células estrelladas y en cesto) y de la capa granular (células de Golgi). Todas ellas son activadas por las fibras paralelas de los granos (Voogd y Glickstein, 1998). Por un lado, las células estrelladas y las células en cesto envían sus axones a las dendritas y al soma de células de Purkinje vecinas, respectivamente. Por otro lado, las células de Golgi establecen sinapsis inhibitorias sobre los granos. En su conjunto, estos tres tipos de interneuronas inhibitorias afinan la zona de activación que llevan a cabo los granos sobre las células de Purkinje (Miall, 2013).

Además de estas aferencias glutamatérgicas, la corteza también recibe proyecciones difusas de fibras noradrenérgicas procedentes del *locus coeruleus* (Abbott y Sotelo, 2000), fibras serotoninérgicas desde los núcleos del rafe (Strahlendorf y Hubbard, 1983), y fibras colinérgicas del núcleo pedunculopontino (Jaarsma *et al.*, 1997).

Toda la información aferente es integrada por las células de Purkinje, que transmiten la señal a las neuronas de los núcleos cerebelosos profundos a través de sinapsis inhibitorias. Estas últimas son las encargadas de comunicar la información del cerebelo al resto de regiones encefálicas y de la médula espinal (Sillitoe y Joyner, 2007; White y Sillitoe, 2013).

### **Neurodegeneración cerebelosa**

La degeneración de las células de Purkinje comienza durante la tercera semana postnatal (concretamente, se estima que a P18), afectando inicialmente a la zona medial del cerebelo (el vermis) y, además, siendo menos grave en las zonas más ventrales (Landis y Mullen, 1978; Wang y Morgan, 2007). La degeneración avanza rápidamente, de tal manera que a P25 aproximadamente han muerto la mitad de las células de Purkinje (Mullen *et al.*, 1976; Wang y Morgan, 2007). A P30, la gran mayoría de las células de Purkinje ha desaparecido, pero se aprecia una clara supervivencia en la zona nodular (lóbulo X y parte ventral del lóbulo IX), donde la muerte neuronal es más tardía que en el resto de lóbulos del cerebelo. Finalmente, alrededor de P40 concluye la degeneración de las células de Purkinje en el vermis del ratón mutante PCD, aunque puede permanecer alguna aberrante en el lóbulo X (Mullen *et al.*, 1976; Landis y Mullen, 1978; Alcalde, 2003).

La capa molecular sufre una reducción significativa en su espesor, en primera instancia por la pérdida de las dendritas de las células de Purkinje y a edades más tardías por la pérdida de las fibras

paralelas de los granos, aunque continúan presentes las células características de esta capa (células estrelladas y células en cesto) rodeadas por un alto número de células gliales (Mullen *et al.*, 1976).

A pesar de que la pérdida de las células de Purkinje es la manifestación más evidente de la degeneración del cerebelo de los animales PCD, también ocurre una degeneración transneuronal secundaria, que puede ser anterógrada o retrógrada. Por un lado, la degeneración retrógrada afecta a más del 90 % de los granos cerebelosos, que mueren por apoptosis entre los 3 y los 12 meses (Zhang *et al.*, 1997). Teniendo en cuenta la relación temporal entre la pérdida de las células de Purkinje y la de los granos, parece que la muerte de los últimos es una consecuencia de la pérdida de apoyo trófico derivado de su diana sináptica (Triarhou, 1998). Sin embargo, recientemente se ha confirmado que la muerte de los granos es más temprana de lo que se había descrito inicialmente, detectándose desde P22 (Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018), por lo que resulta complicado determinar si esta muerte es o no secundaria a la de las células de Purkinje. Aparte de la pérdida de los granos, también se produce la degeneración retrógrada de las neuronas del complejo olivar inferior, que son el origen de las fibras trepadoras, de manera que a los 10 meses ha desaparecido el 50 % de ellas (Triarhou y Ghetti, 1991).

Por otro lado, la degeneración anterógrada origina una pérdida considerable de las neuronas presentes en los núcleos cerebelosos profundos (Bäurle *et al.*, 1997). En este caso, la pérdida es menor, ya que a los 10 meses solo han muerto el 21 % de estas neuronas (Triarhou *et al.*, 1987). Además, se produce una reducción en el diámetro y una mayor densidad de empaquetamiento de las neuronas supervivientes, lo que se traduce en una disminución del volumen de estos núcleos en un 50 % (Bäurle *et al.*, 1997).

### **Alteraciones preneurodegenerativas en las células de Purkinje**

Las células de Purkinje de los ratones PCD presentan ciertas alteraciones ultraestructurales y morfológicas que aparecen antes de que se produzca la muerte neuronal, concretamente desde P15. Se conoce como **etapa preneurodegenerativa** al periodo comprendido entre la aparición de dichas alteraciones (P15) hasta que comienza la muerte neuronal (P18; Baltanás *et al.*, 2011a; Baltanás *et al.*, 2011b; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018).

En condiciones normales, las células de Purkinje presentan una gran acumulación de ribosomas libres en su parte basal entre P10 y P12. Esta agrupación, denominada masa basal de polisomas, permanece durante varios días, pero se desorganiza hacia las dos semanas de edad y se asocia a endomembranas, dando lugar a cisternas alineadas de retículo endoplasmático rugoso (Landis, 1973). Hacia la tercera semana de vida postnatal las células van adoptado su forma característica y diversos orgánulos se disponen alrededor del núcleo (Landis y Mullen, 1978). Por el contrario, los ratones

PCD aún retienen la masa basal de polisomas a P15, 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 endoplasmático rugoso es normal en las células de Purkinje inmaduras, pero en las células de Purkinje de los ratones PCD se mantiene hasta su completa degeneración (Landis y Mullen, 1978). Estas anomalías observadas en el sistema de endomembranas se han corroborado con posterioridad (Kyuhou *et al.*, 2006; Baltanás *et al.*, 2011b). En estos trabajos más recientes se ha demostrado, por una parte, que el estrés asociado a las alteraciones del retículo endoplasmático está implicado en el proceso neurodegenerativo de las células de Purkinje de los ratones PCD (Kyuhou *et al.*, 2006). Además, estas alteraciones se agravan a medida que la neurodegeneración avanza, de tal modo que los polirribosomas se acaban disociando en ribosomas individuales que, a su vez, son englobados por cisternas de retículo endoplasmático formando autofagosomas (Baltanás *et al.*, 2011b).

Por otro lado, la mutación *pcd* induce daños acumulativos en el DNA de las células de Purkinje que inducen un silenciamiento génico progresivo y heterocromatinización (Baltanás *et al.*, 2011b). Los cambios nucleares son especialmente evidentes en el nucléolo, que presenta una alteración progresiva de los componentes fibrilar y granular (Baltanás *et al.*, 2011b). Esta desestructuración del nucléolo repercute en la síntesis de ribosomas y en la maquinaria de síntesis de proteínas de las células de Purkinje (Baltanás *et al.*, 2011b; Baltanás *et al.*, 2019).

Otras alteraciones que se observan en los somas de las células de Purkinje de animales PCD son los nematosomas, que son inclusiones citoplasmáticas formadas por gruesos filamentos de material fibrilar condensado sobre una matriz menos densa (Grillo, 1970). Los nematosomas se observan ocasionalmente a P15, y con regularidad a partir de P18-P22. Sin embargo, estas inclusiones no se observan en los animales silvestres (Landis y Mullen, 1978). Hoy se desconoce su papel en la neurodegeneración.

Finalmente, también se han detectado alteraciones morfológicas en las células de Purkinje de los animales PCD. Así, los axones de las células de Purkinje presentan unos engrosamientos anormales, los *torpedos*, relacionados con alteraciones en la transmisión sináptica (Baltanás *et al.*, 2013). Asimismo, durante el periodo preneurodegenerativo se han detectado alteraciones morfológicas en la dendrita primaria de las células de Purkinje, que se han relacionado con defectos en el comportamiento exploratorio y social de los ratones PCD (Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018).

## Neuroinflamación cerebelosa

En el cerebelo del ratón mutante PCD ocurre un proceso inflamatorio rápido y agresivo durante el cual mueren la casi totalidad de las células de Purkinje, y se dañan granos y oligodendrocitos. La pérdida de estos últimos podría deberse a la activación exagerada de las células gliales (microglía y astrocitos), ya que en esta región se desencadena una **fuerte gliosis reactiva** (Baltanás *et al.*, 2013). Aunque un proceso inflamatorio puede conferir neuroprotección a las regiones adyacentes a la zona dañada, una reacción glial exacerbada, como ocurre en el cerebelo de este modelo animal, puede producir efectos neurotóxicos en lugar de un ambiente neuroprotector, incrementándose así el daño producido (Garden y Moller, 2006; Milligan y Watkins, 2009).

En el cerebelo de los ratones silvestres la microglía se encuentra dispersa por todas sus capas, aunque preferentemente se localiza en la capa granular y en la sustancia blanca. Las células microgliales presentan un cuerpo celular pequeño y prolongaciones numerosas, finas y alargadas. En cambio, en los ratones PCD, la microglía prolifera y experimenta alteraciones morfológicas importantes a medida que progresa la degeneración de las células de Purkinje (Baltanás *et al.*, 2013). A P15 comienzan a observarse cambios muy tenues, como un engrosamiento ligero de sus ramificaciones. A P20 ya se aprecia una fuerte transformación estructural: los cuerpos celulares aumentan considerablemente de tamaño y las neuritas se acortan y se hacen más gruesas. Finalmente, a P25, las células microgliales alcanzan un grado de hipertrofia excepcional, sin apenas ramificaciones (Baltanás *et al.*, 2013). Asimismo, ocurren cambios en su distribución, que son evidentes desde P20: las células microgliales van delimitando progresivamente la capa molecular y la capa de las células de Purkinje. De hecho, a P25, la microglía llega a constituir una monocapa en la capa de las células de Purkinje, donde exhibe su morfología más reactiva y se dispone englobando a las células de Purkinje en degeneración (Baltanás *et al.*, 2013).

Se ha demostrado que en el cerebelo de los ratones PCD se sobreexpresan genes que codifican proteínas proinflamatorias que están implicadas en la activación glial, tales como IL-1, IL-6, iNOS y MMP-9 (Kyuhou *et al.*, 2006; Baltanás *et al.*, 2013). Dicha sobreexpresión génica se obtuvo a partir de homogeneizados de tejido por lo que no se puede saber el tipo celular responsable. Lo que es cierto es que también se produce una activación astrogliar, que es concomitante con la activación microglial, de manera que los astrocitos también se hipertrofian y se localizan fundamentalmente en la capa de las células de Purkinje, demarcando así la zona dañada (Baltanás *et al.*, 2013).

Finalmente, también se ha estudiado la afectación de los oligodendrocitos en los animales mutantes. En el cerebelo de los animales silvestres los oligodendrocitos se sitúan fundamentalmente en la capa granular y la sustancia blanca. En el ratón mutante PCD los oligodendrocitos mueren por

apoptosis a partir de P25, y también se distingue una reducción significativa de sus precursores desde P20 (Baltanás *et al.*, 2013). Teniendo en cuenta que solo las células de Purkinje y los granos expresan *Ccp1* (Fernández-González *et al.*, 2002), la muerte de los oligodendrocitos no parece ser un efecto directo de la mutación.

En resumen, en el cerebelo del ratón mutante PCD la respuesta glial, tanto de la microglía como de los astrocitos, es desmesurada. Ambos tipos gliales promueven un ambiente proinflamatorio que podría contribuir a la muerte de los oligodendrocitos. Esta gliosis reactiva exacerbada probablemente esté relacionada con la rápida degeneración que sufren las células de Purkinje de los ratones PCD.

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

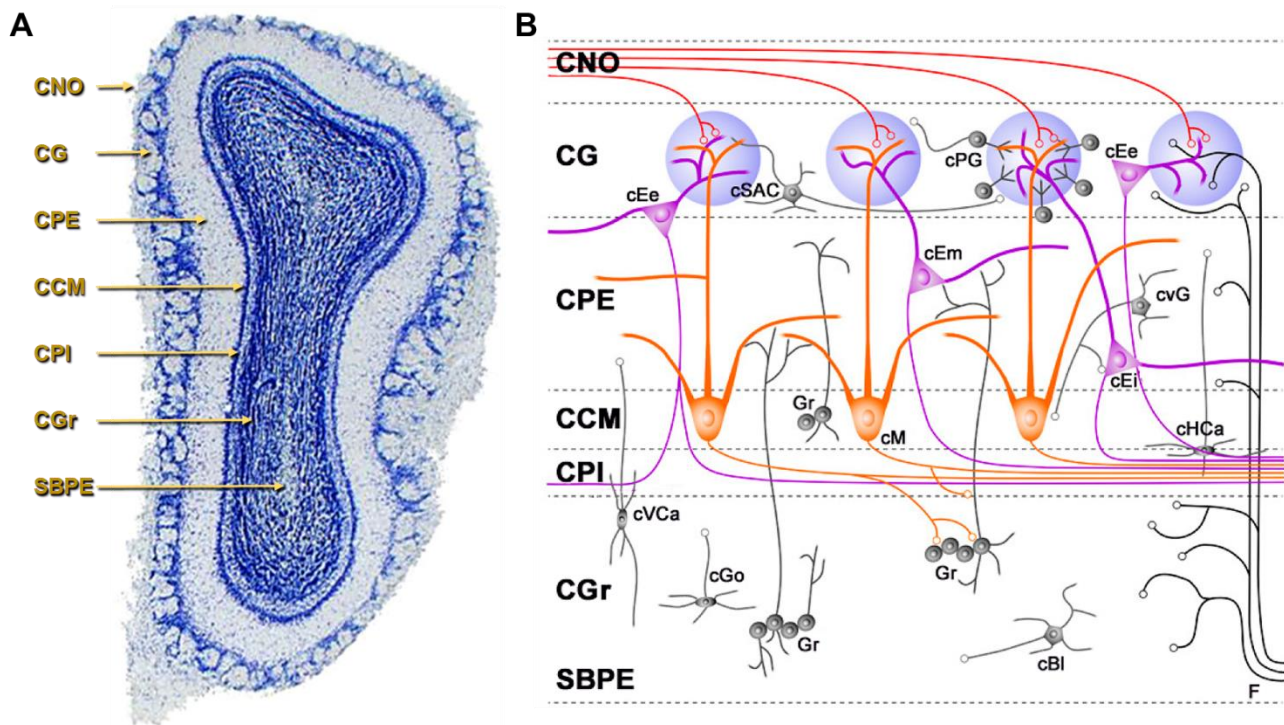
Antes de detallar los efectos concretos de la mutación *pcd* en el BO, se introducirán una serie de conceptos sobre la estructura y organización de esta región.

### **Bulbo olfativo principal: anatomía e histología generales**

El BO es una estructura par y ovoide que se encuentra en la zona más rostral del telencéfalo de los roedores. Al igual que ocurre con el cerebelo, esta región se organiza en láminas donde se disponen de forma ordenada sus tipos neuronales y sus circuitos sinápticos (Greer y Halász, 1987), hecho necesario para el procesamiento y la transmisión de la información. Concretamente, el BO se divide en siete capas concéntricas (Fig. 11), que de exterior a interior son: la capa del nervio olfativo (CNO), la capa glomerular (CG), la capa plexiforme externa (CPE), la capa de las células mitrales (CCM), la capa plexiforme interna (CPI), la capa de los granos (CGr) y la sustancia blanca periependimaria (SBPE; Halász, 1990).

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

Por debajo de la CNO se encuentra la CG, formada por unidades funcionales independientes denominadas glomérulos. Los glomérulos son estructuras esferoidales ricas en neuropilo rodeadas por una cápsula de neuronas pequeñas (células periglomerulares) y células gliales. Dentro de estas estructuras, los axones procedentes de las neuronas receptoras olfativas hacen sinapsis sobre las dendritas de las neuronas yuxtglomerulares (células periglomerulares, células superficiales de axón corto y células empenachadas externas), así como sobre las dendritas apicales de las neuronas de proyección primaria (células mitrales y células empenachadas; Pinching y Powell, 1971).



**Figura 11.** Organización laminar del BO. **A)** Sección coronal teñida con la técnica de Nissl. **B)** Representación esquemática de la estructura laminar del BO y de sus tipos celulares principales. cBl, célula de Blanes; CCM, capa de las 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 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; F, fibras aferentes procedentes de centros superiores; Gr, grano; SBPE, sustancia blanca periependimaria. Esquema modificado de Shipley *et al.*, 2004.

Inmediatamente por debajo de la CG se extiende la CPE, que posee una densidad celular baja con abundancia de neuropilo. Los elementos predominantes en esta capa son las dendritas de las células mitrales, de las células empenachadas (medias e internas) y de los granos, así como los somas de las células empenachadas (medias e internas) y de unas interneuronas conocidas como células de van Gehuchten (Orona *et al.*, 1984; Kosaka *et al.*, 1994; Crespo *et al.*, 2006). Las células empenachadas, junto con las células mitrales, son las encargadas de transmitir la información olfativa a otras regiones encefálicas (Halász, 1990).

Los somas de las células mitrales se disponen formando una monocapa, la CCM, situada a más profundidad que la CPE (Shepherd, 1972). Junto a las células mitrales pueden disponerse algunas células empenachadas internas, llegando en ocasiones a confundirse ambos tipos celulares. En la CCM también pueden encontrarse granos desplazados (Shipley *et al.*, 2004).

Justo por debajo de la CCM se localiza la CPI, que es una delgada capa compuesta mayoritariamente por neuropilo. En concreto, contiene axones de las células mitrales y células empenachadas, dendritas de los granos y axones procedentes de centros superiores (McLean y Shipley, 1987a, b; Crespo *et al.*, 2006).

A continuación, se encuentra la CGr, que es la capa más amplia del BO. El tipo celular mayoritario de esta capa son los granos, que son neuronas pequeñas sin axón, entre las que discurren axones mielínicos de otros tipos celulares del BO. Tanto en esta capa, como en la CPI y la CCM, hay otras interneuronas denominadas células profundas de axón corto, que se pueden dividir en varios tipos de acuerdo a su forma y localización: las células horizontales y verticales de Cajal, las células de Blanes y las células de Golgi son los tipos más abundantes (Pinching y Powell, 1971; Schneider y Macrides, 1978; Kosaka *et al.*, 1994; Crespo *et al.*, 2006).

Por último, y en la parte más profunda del BO, se encuentra la SBPE. Por ella transcurren gran parte de las fibras aferentes y eferentes del BO que convergen para formar el tracto olfativo lateral en la zona caudal de esta región (Price y Sprich, 1975; Recio *et al.*, 2007). A esta capa también se la conoce como la extensión de la corriente migratoria rostral en el BO porque aquí llegan nuevos neuroblastos procedentes de la zona subventricular (Lois *et al.*, 1996; Doetsch *et al.*, 1997; Doetsch, 2003). Desde la SBPE, los neuroblastos migran radialmente y terminan diferenciándose en interneuronas de las CGr y CG (Carleton *et al.*, 2003).

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

Hasta aproximadamente los dos meses de edad, el BO de los ratones PCD exhibe una organización histológica y sináptica normal (Greer y Shepherd, 1982). Sin embargo, aproximadamente a P60 comienzan a morir las células mitrales de forma acelerada hasta P90 (Valero *et al.*, 2006). Durante este periodo mueren más del 75 % de las células mitrales, quedando las células supervivientes dispuestas en pequeños grupos (Valero *et al.*, 2007). El 25 % restante se pierde más lentamente entre P90 y P110 (Greer y Halász, 1987; Baker y Greer, 1990), aunque un pequeño remanente persiste al menos hasta los 8 meses (Greer y Shepherd, 1982). No se han observado efectos directos de la mutación *pcd* 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 similar a la de animales silvestres. Tampoco se han apreciado alteraciones en la distribución de los axones del nervio olfativo, de manera que las neuronas receptoras olfativas son capaces de responder a olores de forma normal (Greer y Shepherd, 1982). Esta integridad del epitelio olfativo en los animales PCD sugiere que las neuronas receptoras olfativas hacen sinapsis con las

células de proyección supervivientes (sobre todo células empenachadas; Greer y Shepherd, 1982). En este sentido, la pérdida de las células mitrales es tan selectiva que no existe una degeneración aparente de las células empenachadas, las cuales aparecen en la CPE de los ratones PCD sin apreciarse alteraciones llamativas ni en su cantidad ni en su morfología (Greer y Shepherd, 1982).

Como consecuencia de este proceso degenerativo, varias poblaciones neuronales en el BO pierden sus conexiones sinápticas con las células mitrales: las células periglomerulares de la CG, las interneuronas de la CPE y los granos de la CGr. Sin embargo, paralelamente, se produce un proceso de reorganización sináptica por el que las células desinervadas establecen nuevos contactos sinápticos con las neuronas de proyección persistentes (Greer y Halász, 1987; Baker y Greer, 1990).

Con respecto a la histología general del BO del ratón PCD, se observan cambios relacionados con el tamaño de sus capas. Así, el tamaño de los glomérulos 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 las células mitrales, que se extienden por dentro del glomérulo (Greer y Shepherd, 1982). El cambio más llamativo se produce en la CPE, donde se aprecia un adelgazamiento considerable en los ratones mutantes. Esto es lógico puesto que las prolongaciones dendríticas de las células mitrales pueden ocupar, en condiciones normales, hasta un 30 % del volumen de la parte más interna de la CPE (Halász *et al.*, 1981). Por el contrario, la CPI de los animales mutantes parece aumentar su grosor. Esto tal vez se deba a la desaparición de la CCM (Greer y Shepherd, 1982). La CGr de los ratones mutantes no parece resultar muy afectada en su parte medial y superficial. Sin embargo, la densidad celular se reduce claramente en su región más profunda (Valero *et al.*, 2007).

Por último, la desaparición de los axones de las células mitrales conlleva una reducción marcada del tracto olfativo lateral, donde los axones remanentes son significativamente más delgados que los de los animales silvestres (Bartolomei y Greer, 1998; Recio *et al.*, 2007). En los centros superiores de integración de la información olfativa de los ratones PCD también se producen alteraciones debido a la pérdida de las células mitrales. Por ejemplo, la capa I de la corteza piriforme experimenta una reducción de un 20-25 % de su grosor (Bartolomei y Greer, 1998).

### **Alteraciones preneurodegenerativas en las células mitrales**

Al igual que ocurría con las células de Purkinje, las células mitrales de los ratones PCD sufren una serie de alteraciones ultraestructurales previas a su muerte (Valero *et al.*, 2006). Se han detectado diversas anomalías nucleares relacionadas con la acumulación de daños en el DNA. En concreto, se produce una heterocromatinización progresiva, que está asociada con una represión transcripcional,



y una reorganización de los compartimentos nucleolares (Valero *et al.*, 2006). Por un lado, la represión transcripcional se considera un mecanismo para prevenir daños en el DNA. Por otro lado, las alteraciones nucleolares ocasionan fallos en la biosíntesis de ribosomas y, por consiguiente, la desestructuración de las cisternas del retículo endoplasmático rugoso (Valero *et al.*, 2006). Este hecho refleja la existencia de una maquinaria de síntesis de proteínas deficiente. Todas estas modificaciones citológicas son similares a las de las células de Purkinje de los ratones PCD (Landis y Mullen, 1978; Baltanás *et al.*, 2011a; Baltanás *et al.*, 2011b).

### **Neuroinflamación en el bulbo olfativo principal**

En el BO también ocurre una reacción inflamatoria, pero, a diferencia de lo que ocurre en el cerebelo, en este caso se desarrolla una **reacción glial moderada** (Baltanás *et al.*, 2013).

En un animal silvestre, la microglía se encuentra repartida uniformemente por todas las capas bulbares. En cuanto al BO de los ratones PCD, existe una activación microglial durante la degeneración de las células mitrales. Sin embargo, dicha activación difiere notablemente de la que se observa en el cerebelo. Así, la hipertrofia de las células microgliales no es tan acusada ni tan frecuente. Más aún, y a diferencia de lo que ocurre en el cerebelo, no se distingue una migración preferencial hacia la CCM; las células de microglía siguen repartidas de forma más o menos homogénea en el BO durante todo el proceso degenerativo (Baltanás *et al.*, 2013).

En cuanto a los astrocitos, estos se sitúan en la CG y la CGr en los animales silvestres, aunque también se pueden ver algunos en la CCM. En el ratón PCD el número de astrocitos aumenta de forma patente desde el inicio de la degeneración. Sin embargo, no se observan cambios llamativos a medida que progresa la degeneración. Al igual que la microgliosis, la astrogliosis es homogénea a lo largo de todas las capas bulbares (Baltanás *et al.*, 2013). El hecho de que los astrocitos se distribuyan uniformemente refleja una respuesta glial más tenue que cuando delimitan específicamente la zona dañada (Escartin y Bonvento, 2008), tal y como ocurre en el cerebelo del ratón PCD. Otro hecho que apunta a que el escenario degenerativo y la activación glial en el BO son diferentes es que, en este caso, no se sobreexpresan genes que codifican mediadores proinflamatorios, tales como IL-1, IL-6, MMP-9 e iNOS (Valero *et al.*, 2006).

Por último, no hay variaciones ni en la distribución ni en la cantidad de oligodendrocitos en el BO de los animales PCD respecto a los silvestres. De hecho, no se ha detectado apoptosis de oligodendrocitos con la técnica TUNEL en esta región (Baltanás *et al.*, 2013).

Resumiendo, durante la degeneración de las células mitrales del BO del ratón PCD se produce una reacción glial más moderada que la detectada en el cerebelo durante la muerte de las células del Purkinje. El hecho de que ni los astrocitos ni la microglía experimenten grandes cambios morfológicos ni delimiten la región afectada, y que los oligodendrocitos bulbares no mueran, sugiere que la respuesta glial es menos dañina, pudiendo ser incluso neuroprotectora. Precisamente esta es una de las razones que podrían explicar por qué la degeneración que ocurre en el BO es más lenta y menos agresiva que el proceso degenerativo que tiene lugar en el cerebelo del ratón PCD.

*“Si hiciésemos todo lo que somos capaces de hacer, nos quedaríamos  
completamente sorprendidos de nosotros mismos.”*

*Thomas A. Edison*

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



El ratón mutante PCD es un modelo idóneo para estudiar la pérdida neuronal y la neuroinflamación, así como para desarrollar diversas estrategias neuroprotectoras. Presenta escenarios degenerativos diversos que muestran desarrollos temporales muy diferentes (Mullen *et al.*, 1976). En particular, en el cerebelo ocurre una pérdida rápida y temprana de las células de Purkinje, mientras que en el BO tiene lugar una degeneración más lenta y tardía de las células mitrales (Wang y Morgan, 2007). Más recientemente, en nuestro laboratorio hemos investigado la inflamación local en estos escenarios, centrándonos en las células gliales (astrocitos, microglía y oligodendrocitos). Encontramos una respuesta glial diferente entre el cerebelo y el BO: la degeneración de las células de Purkinje desencadena una fuerte gliosis reactiva, mientras que la pérdida de las células mitrales provoca una respuesta glial moderada (Baltanás *et al.*, 2013).

En vista de esto, hemos querido dar un paso más para completar el estudio de las reacciones inflamatorias que ocurren en el ratón PCD. Para ello, hemos decidido explorar las células del sistema inmunitario periférico como elementos adicionales que participan en las reacciones inflamatorias, ya que se han visto implicadas en la progresión de diversas enfermedades neurodegenerativas (Boyko *et al.*, 2017; McManus y Heneka, 2017). En particular, hemos querido comprobar si la muerte neuronal selectiva modula la infiltración de leucocitos a nivel del SNC o si altera el fenotipo leucocitario a nivel periférico. Además, comparamos los datos obtenidos con dos modelos de neuroinflamación más estandarizados, uno inducido por radiación gamma (agente físico) y otro inducido por lipopolisacárido (LPS; un agente biológico).

Por tanto, la **primera hipótesis** de la presente Tesis Doctoral es que *“la muerte neuronal selectiva produce alteraciones tanto en la infiltración leucocitaria hacia el SNC, como en el fenotipo de los leucocitos a nivel periférico”*.

Por otro lado, en nuestro laboratorio se están explorando dos aproximaciones metodológicas para combatir la neurodegeneración. Por una parte, se está investigando una terapia farmacológica con efectos neuroprotectores y, por otra parte, se está explorando el potencial terapéutico de las células madre adultas de la médula ósea. Es en esta segunda aproximación donde se encuadra el presente trabajo experimental. Concretamente, se han empleado hMSCs o IMCs monocíticas<sup>12</sup> para tratar de reducir los procesos neurodegenerativos del ratón mutante PCD y la inflamación subyacente.

---

<sup>12</sup> A partir de ahora, cuando aparezcan las siglas IMCs nos referiremos específicamente a las monocíticas.

Así, la **segunda hipótesis** de esta Tesis Doctoral es que “*el trasplante de hMSCs o IMCs en los ratones PCD induce un efecto neuroprotector responsable de favorecer la supervivencia de las neuronas afectadas y de producir mejoras funcionales*”.

Partiendo de las hipótesis descritas, se desglosarán a continuación los objetivos generales y específicos de esta Tesis Doctoral:

1. Analizar la influencia de la neurodegeneración selectiva del ratón mutante PCD sobre el sistema inmunitario periférico.
  - a) Explorar el reclutamiento y la distribución de los leucocitos en el sistema nervioso en degeneración (BO y cerebelo).
  - b) Examinar el fenotipo de los leucocitos en el principal reservorio inmunológico (bazo).
2. Modular la inflamación/degeneración que padece el ratón mutante PCD empleando células derivadas de la médula ósea como agentes terapéuticos.
  - a) Trasplantar hMSCs y analizar su integración en los animales receptores; evaluar posibles mejoras histológicas y comportamentales.
  - b) Cultivar IMCs y evaluar sus propiedades inmunosupresoras bajo condiciones patológicas *in vitro*.
  - c) Trasplantar IMCs y analizar su integración en los animales receptores; evaluar posibles mejoras histológicas y comportamentales.

*“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado.*

*Un esfuerzo total es una victoria completa.”*

*Mahatma Gandhi*

## **MATERIAL Y MÉTODOS**





## ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron ratones (*Mus musculus* L., 1758; Muridae, Rodentia, Mammalia) de las estirpes C57BL/DBA y BALB/C57BL. Dichos ratones se obtuvieron bien a través del cruce entre las estirpes C57BL/6J y DBA/2J, o bien entre las estirpes BALB/cJ y C57BL/6J, todas procedentes de los Laboratorios Jackson (Bar Harbor, EE. UU.).

Los animales se criaron y mantuvieron en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca a temperatura y humedad relativa constantes, y con un fotoperiodo artificial de 12/12 horas. Además, se alimentaron *ad libitum* con agua y pienso compuesto para roedores (Rodent toxicology diet, B&K Universal G.J., S.L., Molins de Rei, España). Todos los animales se manipularon respetando la normativa vigente, tanto europea (Directiva 2010/63/UE y Recomendación 2007/526/CE) como española (RD 53/2013 y Ley 32/2007), y con la aprobación del Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca (referencias: #00291 y #00344).

### Colonia PCD: cría y genotipado

Todos los animales objeto de estudio pertenecieron a la colonia PCD (C57BL/DBA). Teniendo en cuenta las características desfavorables en relación a la fertilidad de los animales homocigotos para la mutación (*pcd/pcd*; ver Introducción), el mantenimiento de la colonia se llevó a cabo mediante cruces entre individuos heterocigotos (*+/pcd*).

Aunque los animales PCD son fácilmente reconocibles por su ataxia cerebelosa, su genotipado es necesario para organizar los experimentos con suficiente antelación. Además, hay que tener en cuenta que los ratones heterocigotos (*+/pcd*) son fenotípicamente indistinguibles de los ratones silvestres (*+/+*). Para la tipificación genética se empleó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR<sup>13</sup>.

La mutación *pcd<sup>IJ</sup>* se encuentra en una región reguladora del gen *Ccp1* que hasta ahora no ha podido ser identificada, por lo que se recurrió al uso de microsatélites para la caracterización genotípica de la colonia PCD. Los microsatélites consisten en secuencias pequeñas de DNA compuestas por repeticiones en tándem de fragmentos de entre uno y seis nucleótidos. Estas pequeñas secuencias de DNA repetitivo son altamente polimórficas, y por este motivo se utilizan como marcadores moleculares intraespecíficos. En nuestro caso, se escogieron dos microsatélites presentes tanto en la estirpe C57BL/6J, portadora de la mutación, como en la estirpe DBA/2J, conocidos como D13Mit250 y

<sup>13</sup> Del inglés *Polymerase Chain Reaction*

D13Mit283. Ambos microsatélites se localizan cerca de la región mutada, por lo que se presupone su transmisión ligada con una alta probabilidad. Además, como se describirá a continuación, difieren lo suficiente en el número de pares de bases (pb) entre las dos estirpes como para distinguirse al separarlos mediante electroforesis en gel de agarosa.

A continuación, se explicará la técnica completa de genotipado dividida en tres pasos.

### Extracción de DNA

Para la identificación de cada ratón se tomó una muestra de tejido de su cola alrededor de P10, tras su correspondiente marcaje individual. Para obtener el DNA genómico, las colas se sumergieron en un tampón de lisis que contiene proteinasa K (6 U/ml), dodecil sulfato sódico (SDS<sup>14</sup>) 0,2 % (p/v), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA<sup>15</sup>) 5 mM pH 8,0, tampón Tris 0,1 M pH 8,0, NaCl 200 mM (Sigma-Aldrich, San Luis, EE. UU.) y agua Elix. Este tratamiento se realizó a 55 °C durante toda la noche. Posteriormente, las muestras se resuspendieron y se centrifugaron a 13.200 rpm durante 2 min, empleando una centrífuga 5415D (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Seguidamente, se recogió el sobrenadante y el DNA se precipitó añadiendo un volumen de isopropanol igual al del tampón. Después, las muestras se volvieron a centrifugar a 13.200 rpm durante 10 min. Finalmente, cada precipitado de DNA se lavó con etanol 70 % (v/v) a 4 °C, se centrifugó de nuevo a 13.200 rpm durante 10 min, se dejó secar y se resuspendió en 20-100 µl de agua Elix.

### Reacción en cadena de la polimerasa

El siguiente paso consistió en amplificar por PCR los marcadores moleculares adecuados para la mutación *pcd<sup>IJ</sup>*: los microsatélites D13Mit250 y D13Mit283. El medio para realizar la PCR contenía lo siguiente: tampón comercial de la Taq polimerasa 1X (Promega, Madison, EE. UU.), Taq polimerasa 0,125 U/µl (Promega), desoxinucleótidos trifosfato 0,2 mM (Promega), dimetilsulfóxido 5 % (v/v), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, cebadores 2,5 µM (cada uno), DNA 100-500 ng y agua Elix. En la Tabla 1 se recogen las secuencias de los cuatro cebadores utilizados, dos para cada microsatélite.

D13Mit250	Secuencias	D13Mit283	Secuencias
Cebador 1	5'-ACACTCATTTCATGCACGA-3'	Cebador 1	5'-GGAAGCAGTCTCCTGCCTC-3'
Cebador 2	5'-AGGTCCTCAAATCTCACAAAGTAGG-3'	Cebador 2	5'-GAGAGGTGGCACATGAGGT-3'

**Tabla 1.** Cebadores empleados para la amplificación de las regiones D13Mit250 y D13Mit283.

<sup>14</sup> Del inglés *Sodium Dodecyl Sulphate*

<sup>15</sup> Del inglés *EthyleneDiamineTetraacetic Acid*

Como control positivo se incluyó una muestra de DNA de cada uno de los tres genotipos posibles (+/+, +/*pcd* y *pcd/pcd*), mientras que como control negativo se utilizó el medio anterior sustituyendo el volumen de DNA por agua Elix.

La PCR se llevó a cabo en un termociclador (Veriti 96-Well Thermal Cycler, Applied Biosystems, Foster City, EE. UU.) con los ciclos de temperatura detallados a continuación en la Tabla 2:

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 2. Programa de la PCR para genotipar la mutación *pcd*<sup>1J</sup>.

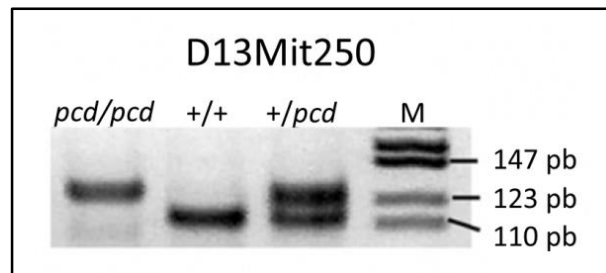
### Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de PCR correspondientes a las regiones microsatélites tienen distintos tamaños dependiendo de la estirpe. En el caso del microsatélite D13Mit250, el producto de PCR es un fragmento de 130 pb en los ratones de la estirpe C57BL/6J, mientras que en la estirpe DBA/2J consta de 116 pb. En el caso del microsatélite D13Mit283, el producto de PCR es un fragmento de 114 pb y 136 pb en las estirpes C57BL/6J y DBA/2J, respectivamente.

En definitiva, la diferencia en tamaño permitió separar los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa MS-8 (Condalab, Madrid, España) al 3 % (p/v) en tampón Tris-Borato-EDTA 0,5X (ver Apéndice I: soluciones de uso común). Al gel se le añadió RedSafe (iNtRON Biotechnology, Seongnam, Corea del Sur), un agente intercalante del DNA, para poder visualizar las bandas del DNA amplificado con ayuda de una lámpara de luz ultravioleta (Gel Doc XR, Bio-Rad Laboratories, Hercules, EE. UU.).

Aquellos carriles en los que aparece una sola banda de 130 pb para D13Mit250 o de 114 pb para D13Mit283, respectivamente, corresponden con animales homocigotos para la mutación (*pcd/pcd*); al contrario, en los que aparece una única banda de 116 pb para D13Mit250 o de 136 pb para D13Mit283, corresponden con animales homocigotos silvestres (+/+). Por último, los animales heterocigotos (+/*pcd*) se caracterizan por la formación de dos bandas en el gel: 130 y 116 pb para D13Mit250, o bien 114 y 136 pb para D13Mit283 (Fig. 12). El marcador de peso molecular empleado fue el pBR322 DNA-MspI Digest (New England Biolabs, Ipswich, EE. UU.).

**Figura 12.** Genotipado de la mutación *pcd<sup>1J</sup>* para el microsatélite D13Mit250. Las bandas simples corresponden a animales homocigotos (*pcd/pcd* y *+/+*); las bandas dobles a animales heterocigotos (*+/pcd*). M: marcador de peso molecular en pb.



## Colonia GFP: cría e identificación

Todos los animales donantes de médula ósea pertenecieron a la colonia BALB/C57BL. Se trata de ratones que expresan de forma constitutiva el gen de la proteína fluorescente verde o GFP, que fue originariamente aislado de la medusa *Aequorea victoria* (Murbach y Shearer, 1902; Aequoreidae, Leptothecata, Hydrozoa; Shimomura, 2005). La proteína GFP emite fluorescencia verde, lo que permitió visualizar las células trasplantadas en el animal receptor.

El mantenimiento de la colonia se llevó a cabo mediante cruce entre individuos heterocigotos para la GFP (*+/gfp*) con individuos silvestres (*+/+*). De este modo, la mitad de la descendencia expresarán la proteína GFP. Para identificar los ratones GFP, simplemente se expusieron brevemente a una fuente de luz ultravioleta de 312 nm (VL-6.MC, Vilber Lourmat, Collégien, Francia) y se observó cuáles emitían fluorescencia verde.

## Reparto de los animales para los experimentos

Dada la diversidad de experimentos realizados en esta Tesis Doctoral, a continuación se desglosará la repartición de los animales empleados:

1. Para realizar el análisis de la infiltración leucocitaria se emplearon 30 ratones silvestres y 30 ratones PCD, repartidos en grupos de 5 para las siguientes edades: P15, P20, P25, P30, P40 y P70. Además, se usaron otros 15 ratones silvestres a P25 a los que se les administró LPS ( $n = 5$ ) o radiación a dos edades diferentes ( $n = 5$  cada una).
2. Para explorar posibles alteraciones fenotípicas en los leucocitos debidas a la neurodegeneración cerebelosa de los ratones PCD, se tomó el bazo de 16 ratones silvestres y 16 ratones PCD, repartidos en grupos de 4 para las siguientes edades: P15, P20, P30 y P40.
3. Para realizar el trasplante intravenoso de las hMSCs se emplearon 5 animales silvestres y 5 animales PCD como receptores a la edad de P20, y se sacrificaron al día siguiente.
4. Para evaluar las propiedades inmunosupresoras de las IMCs derivadas de la médula ósea se usaron 4 ratones silvestres como donantes de linfocitos T y 4 ratones silvestres como donantes de IMCs.

5. Para realizar el trasplante intravenoso de las IMCs se emplearon 6 ratones GFP como donantes de médula ósea y 6 ratones PCD como receptores, de los que 3 fueron trasplantados por la vena lateral de la cola y 3 por el seno retroorbital. Los ratones donantes tenían entre dos y tres meses de edad, y los ratones PCD se trasplantaron a P20 y se sacrificaron al día siguiente.
6. Para los experimentos relacionados con la inyección intracerebelosa de IMCs se emplearon 6 ratones GFP como donantes de médula ósea y 8 ratones PCD como receptores. Además, se emplearon 8 ratones PCD sin tratamiento y 8 ratones PCD *Sham*<sup>16</sup>. Al igual que antes, los ratones GFP tenían entre dos y tres meses de edad. En este caso, los ratones PCD se operaron a P20 (excepto los PCD sin tratamiento), pasaron el test del RotaRod a P25 y P30, y se perfundieron a P30.

## ADMINISTRACIÓN DE LIPOPOLISÁCARIDO Y DE RADIACIÓN GAMMA

El LPS se administró 1 día antes del sacrificio (P24), mientras que la radiación se aplicó bien 7 días o bien 1 día antes del sacrificio de los ratones (P18 o P24). El LPS (*Escherichia coli* O26:B6, Sigma-Aldrich) se disolvió en solución salina y se inyectó intraperitonealmente a una dosis de 2 mg/kg, como en otros estudios (Cazareth *et al.*, 2014; Fu *et al.*, 2014). Por otro lado, los animales expuestos a radiación gamma recibieron una única dosis de cuerpo completo de 3 Gy, que fue aplicada con una fuente de <sup>137</sup>Cs para ratones (Gammacell 1000 Elite, 243 cGy/min, 0.662 MeV, MDS Nordion, Ottawa, Canadá) en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca.

## ANÁLISIS DE POBLACIONES ESPLÉNICAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Para explorar las células del sistema inmunitario periférico se analizaron las poblaciones mieloides y linfoides del bazo de ratones silvestres y PCD por citometría de flujo. En primer lugar, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, se diseccionaron sus bazos y se sumergieron en medio Hibernate (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.) hasta su procesamiento posterior. Las muestras se llevaron a una campana de flujo laminar para disgregarlas sobre un tamiz celular de 40 µm de tamaño de poro (BD Biosciences, San José, EE. UU.), colocado sobre un tubo Falcon de 50 ml. Durante la disociación de los bazos, se iba pasando medio de lavado (Tabla 3) a través del tamiz para recoger el mayor número posible de células. Seguidamente, el filtrado con las células disociadas se centrifugó a 1.500 rpm durante 5 min a 4 °C. Se retiró el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en un tampón de lisis para destruir los eritrocitos (Tabla 3), durante 1 min y en hielo. La reacción de lisis se paró añadiendo tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,4 (PBS<sup>17</sup>) hasta un volumen

<sup>16</sup> Sham: simulacro de operación quirúrgica

<sup>17</sup> Del inglés *Phosphate Buffered Saline*

de 50 ml. En este momento, se tomó una alícuota para estimar el número de esplenocitos extraídos con ayuda de una cámara de Neubauer (Brand, Wertheim, Alemania). Se empleó azul de tripán (Gibco) como marcador de células muertas.

Medio	Composición
Medio de lavado	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; Suero bovino fetal 10 % (v/v; Gibco)</li> <li>&gt; Penicilina/estreptomicina 100x 1 % (v/v; Sigma-Aldrich)</li> <li>&gt; Medio RPMI 1640 (Gibco)</li> </ul>
Medio IMDM suplementado	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; Suero bovino fetal 10 % (v/v)</li> <li>&gt; L-glutamina 2 mM (Gibco)</li> <li>&gt; β-mercaptoetanol 50 μM (Sigma-Aldrich)</li> <li>&gt; Penicilina/estreptomicina 100x 1 % (v/v)</li> <li>&gt; Medio IMDM (BioWest, Francia)</li> </ul>
Medio RPMI suplementado	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; Suero bovino fetal 10 % (v/v)</li> <li>&gt; HEPES 25 mM (Gibco)</li> <li>&gt; L-glutamina 2 mM</li> <li>&gt; β-mercaptoetanol 50 μM</li> <li>&gt; Penicilina/estreptomicina 100x 1 % (v/v)</li> <li>&gt; Medio RPMI 1640</li> </ul>
PBS suplementado	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; Suero bovino fetal 10 % (v/v)</li> <li>&gt; HEPES 25 mM</li> <li>&gt; EDTA 1 mM (Panreac Química)</li> <li>&gt; Penicilina/estreptomicina 100x 2 % (v/v)</li> <li>&gt; PBS</li> </ul>
Suero suplementado	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; HEPES 25 mM</li> <li>&gt; Penicilina/estreptomicina 100x 1 % (v/v)</li> <li>&gt; Suero bovino fetal</li> </ul>
Tampón de lisis de eritrocitos	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; NH<sub>4</sub>Cl 0,83 % (p/v; Panreac Química)</li> <li>&gt; KHCO<sub>3</sub> 0,1 % (p/v; Panreac Química)</li> <li>&gt; EDTA 1 mM</li> <li>&gt; Ajustar el pH a 7,4 y enrasar con agua destilada</li> </ul>

**Tabla 3.** Medios empleados para procesar o cultivar las células. IMDM, Iscove's Modified Dulbecco's Medium; RPMI, Roswell Park Memorial Institute.

Después, se resuspendieron 10<sup>6</sup> esplenocitos en una solución de bloqueo que contenía anticuerpos anti-CD16/CD32 (Tabla 4) diluidos en 50 μl de PBS suplementado (Tabla 3), y se dejaron en agitación a 4 °C durante 10 min. De este modo, se bloquearon las posibles uniones inespecíficas entre los receptores Fc<sup>18</sup> (CD16 y CD32) y los anticuerpos empleados posteriormente. A continua-

<sup>18</sup> Receptores Fc: proteínas presentes en la membrana de las células del sistema inmunitario que reconocen el fragmento cristalizante o fracción constante de las inmunoglobulinas.

ción, se añadieron 50 µl de solución de marcaje sobre la solución de bloqueo y las células se incubaron a 4 °C durante 30 min en oscuridad. La solución de marcaje estaba compuesta por los anticuerpos correspondientes (ver más abajo) diluidos en PBS suplementado. Finalmente, se volvieron a centrifugar las células, se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado con PBS suplementado. Para el análisis de las poblaciones linfoides se usaron los siguientes anticuerpos enlazados a fluoróforos: CD3~PB, CD4~PE, CD8~FITC, CD25~PE-Cy5.5 y CD69~APC (Tabla 4). Para el análisis de las poblaciones mieloides se repitió el mismo procedimiento, pero haciendo uso de los siguientes anticuerpos: CD11b~PerCP-Cy5.5, CD11c~APC, F4/80~eFluor 450, Ly-6C~FITC, Ly-6G~PE y MHC-II~PE-Cy7 (Tabla 4).

El análisis se llevó a cabo por el Servicio de Citometría del Hospital Nacional de Parapléjicos de Toledo en un citómetro analizador FACSCanto™ II (BD Biosciences) empleando el software FACSDiva 6.1 (BD Biosciences) y FlowJo 7.6.4 (TreeStar Inc., Ashland, EE. UU.). Se evaluó tanto el porcentaje de varias poblaciones esplénicas como la intensidad media de fluorescencia (MFI<sup>19</sup>) de varios marcadores linfoides y mieloides. La MFI es un parámetro que refleja el nivel de expresión de una molécula marcada en la superficie celular. En otras palabras, cuanto mayor es la MFI de un marcador dentro de una población celular, más número de moléculas de ese marcador se están expresando. Se usaron 4 bazos por grupo experimental (un total de 32 bazos).

Anticuerpo~fluoróforo	Especie	Diana	Casa comercial	Dilución
CD3~PB	Hámster sirio	Linfocitos T	BD Biosciences	4 µg/ml
CD4~PE	Rata	Linfocitos T CD4 <sup>+</sup>	BD Biosciences	2 µg/ml
CD8~FITC	Rata	Linfocitos T CD8 <sup>+</sup>	BD Biosciences	5 µg/ml
CD11b~PerCP-Cy5.5	Rata	Células mieloides	BD Biosciences	4 µg/ml
CD11c~APC	Hámster armenio	Células dendríticas	eBioscience	4 µg/ml
CD16/CD32	Rata	Receptores Fc de los leucocitos	BD Biosciences	10 µg/ml
CD25~PE-Cy5.5	Rata	Linfocitos T activados	eBioscience	4 µg/ml
CD69~APC	Hámster armenio	Linfocitos T activados	eBioscience	4 µg/ml
F4/80~eFluor 450	Rata	Macrófagos	eBioscience	4 µg/ml
Ly-6C~FITC	Rata	IMCs/MDSCs monocíticas	BD Biosciences	10 µg/ml
Ly-6G~PE	Rata	IMCs/MDSCs polimorfonucleares	BD Biosciences	4 µg/ml
MHC-II~PE-Cy7	Rata	Células presentadoras de antígeno	eBioscience	4 µg/ml

**Tabla 4.** Anticuerpos empleados para el análisis de poblaciones esplénicas ordenados por orden alfabético. Abreviaturas de los fluoróforos: APC, allophycocyanin; Cy, cyanine; FITC, fluorescein isothiocyanate; PB, Pacific Blue; PE, phycoerythrin; PerCP, peridinin-chlorophyll-protein complex.

<sup>19</sup> Del inglés *Mean Fluorescence Intensity*

## CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS MIELOIDES INMADURAS

Uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral es averiguar si las IMCs aisladas de la médula ósea de ratones silvestres pueden suprimir la inflamación y/o la neurodegeneración del ratón PCD. Para ello, en primer lugar, tuvimos que comprobar si dichas IMCs son capaces de adquirir propiedades inmunosupresoras bajo condiciones patológicas, es decir, si se comportan como MDSCs, antes de llevar a cabo su trasplante en ratones PCD. Más concretamente, se analizó su capacidad para suprimir la proliferación e inducir la apoptosis de linfocitos T mediante el cocultivo de ambos tipos celulares. Para caracterizar las IMCs se siguió el procedimiento indicado en la Figura 13:



**Figura 13.** Esquema de los pasos seguidos para caracterizar las IMCs.

A continuación se detallará todo el proceso de caracterización de forma ordenada atendiendo a los días de trabajo.

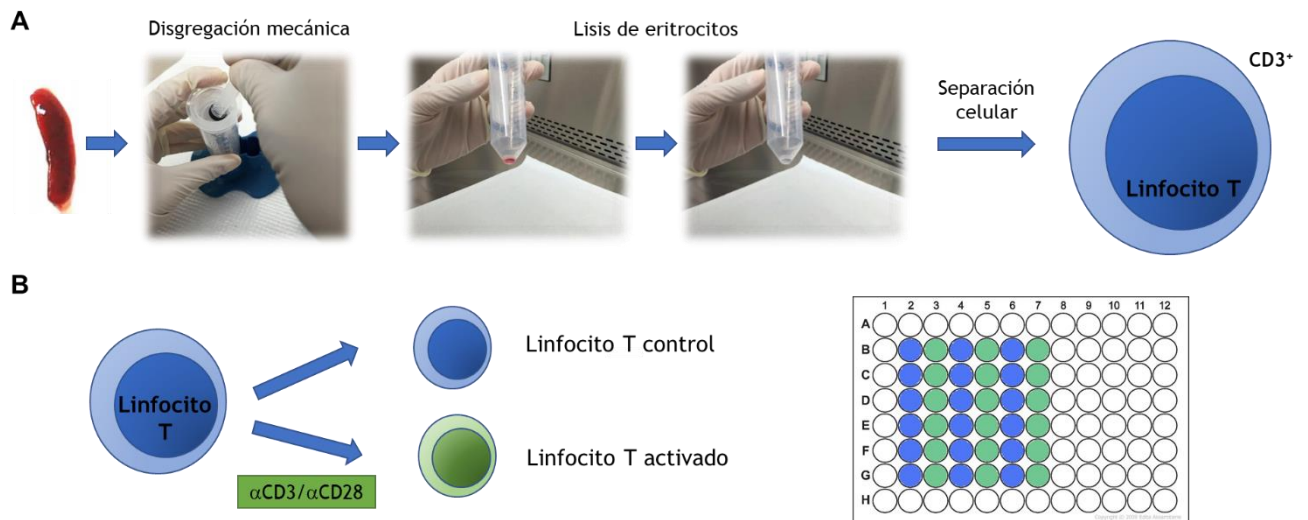
### Día 1. Aislamiento y activación de linfocitos T

#### *Extracción de esplenocitos y aislamiento de linfocitos T*

Los linfocitos T se obtuvieron a partir de bazos de ratones silvestres C57BL/6J de 7 semanas (Fig. 14A). En primer lugar, los animales donantes se sacrificaron por dislocación cervical, se diseccionaron sus bazos y se extrajeron los esplenocitos siguiendo el protocolo descrito en el apartado anterior. Una vez aislados, los esplenocitos se resuspendieron en 200  $\mu$ l de solución de bloqueo (con anticuerpos anti-CD16/CD32; Tabla 4), y se dejaron en agitación a 4  $^{\circ}$ C durante 10 min. A continuación, se añadieron 200  $\mu$ l de solución de marcaje de linfocitos T que contenía anticuerpos anti-CD3~PB (Tabla 4) diluidos en PBS suplementado, y las células se incubaron a 4  $^{\circ}$ C durante 30 min en oscuridad. Después, se volvieron a centrifugar las células, se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado con PBS suplementado. Finalmente, los linfocitos T se separaron como células CD3<sup>+</sup>.



La separación celular también se llevó a cabo por el Servicio de Citometría del Hospital Nacional de Parapléjicos de Toledo, pero en este caso empleando un citómetro separador FACSaria™ (BD Biosciences). Los linfocitos T aislados se recogieron en un tubo Falcon de 15 ml que contenía suero suplementado (Tabla 3).



**Figura 14.** Aislamiento, siembra y activación de los linfocitos T. **A)** Representación esquemática del aislamiento de linfocitos T por citometría de flujo a partir del bazo. **B)** Representación esquemática de la activación de los linfocitos T mediante el uso de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, y de su distribución alternada con linfocitos T sin activar en columnas tras su siembra.

### Siembra y activación de linfocitos T

Tras aislar los linfocitos T, se sembraron en una placa de 96 pocillos (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania) siguiendo una relación de 200.000 linfocitos/pocillo y usando medio RPMI suplementado (Tabla 3). Algunos pocillos se cubrieron previamente durante 3 horas y a 37 °C con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (Tabla 5) a una concentración de 1 µg/ml en PBS. Dichos anticuerpos sirven para inducir la activación policlonal de los linfocitos T mediante la estimulación del complejo del receptor de linfocitos T y de la molécula coestimuladora CD28, respectivamente. Por lo tanto, en unos pocillos tuvimos linfocitos T control y en otros linfocitos T activados (Fig. 14B). Los linfocitos T se mantuvieron a 37 °C con 5 % CO<sub>2</sub> durante 24 horas.

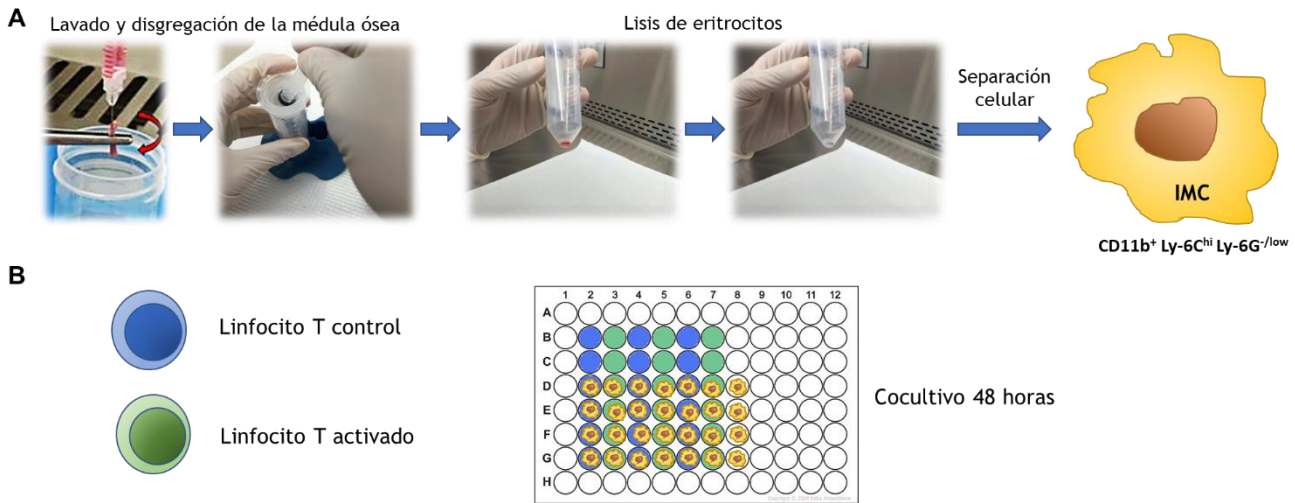
Anticuerpos	Especie	Diana	Casa comercial	Dilución
CD3	Hámster sirio	Receptor CD3 de linfocitos T	BD Biosciences	1 µg/ml
CD28	Hámster sirio	Receptor CD28 de linfocitos T	BD Biosciences	1 µg/ml

**Tabla 5.** Anticuerpos empleados para la activación de los linfocitos T.

## Día 2. Cocultivo de IMCs con linfocitos T

### Extracción de médula ósea y aislamiento de IMCs

Las IMCs se obtuvieron de la médula ósea de ratones silvestres C57BL/6J un día después de la siembra de los linfocitos T (Fig. 15A). En primer lugar, los animales donantes se sacrificaron por dislocación cervical. A continuación, cada animal se diseccionó con el fin de extraer sus fémures, tibias y húmeros. Los huesos íntegros se llevaron al interior de una campana de flujo laminar para extraer la médula ósea de su interior en condiciones asépticas. Después, se perforaron las dos epífisis de cada hueso con una jeringuilla de insulina de 1 ml Omnifix (B. Braun, Melsungen, Alemania) acoplada a una aguja de calibre de 26 G FINE-JECT (Henke-Sass, Wolf, Tuttlingen, Alemania). Seguidamente, y con dicha jeringuilla, se inyectó medio de lavado (Tabla 3) tres veces por cada epífisis. La médula ósea resultante se recogió sobre un tamiz celular de 40  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro colocado en un tubo Falcon de 50 ml. A partir de aquí el procedimiento fue el mismo que para la extracción de esplenocitos y el aislamiento de linfocitos T, a excepción de la solución de marcaje, que en este caso contenía anti-CD11b~PerCP-Cy5.5, anti-Ly-6C~FITC y anti-Ly-6G~PE (Tabla 4). Así, las IMCs se separaron por citometría de flujo como células  $\text{CD11b}^+/\text{Ly-6C}^{\text{high}}/\text{Ly-6G}^{-/\text{low}}$ .



**Figura 15.** Aislamiento de las IMCs y cocultivo con linfocitos T. **A)** Representación esquemática de la extracción de médula ósea a partir de huesos largos y de su procesamiento para aislar IMCs por citometría de flujo, como células  $\text{CD11b}^+ \text{Ly-6C}^{\text{hi}} \text{Ly-6G}^{-/\text{low}}$ . **B)** Representación esquemática del cultivo entre los linfocitos T aislados anteriormente y las IMCs recién aisladas. Nótese que algunos pocillos quedan solo con linfocitos T (ya sea control o activados), mientras que otros quedan solo con IMCs.

### Siembra de las IMCs con los linfocitos T

Tras aislar las IMCs, se sembraron junto a los linfocitos T en una proporción 1:4 con respecto a estos, es decir, 50.000 IMCs/pocillo (Fig. 15B). Para ello, se empleó el medio de cultivo que ya contenían los pocillos con los linfocitos T. Las IMCs no se sembraron en todos los pocillos, de manera que quedaron algunos pocillos con solo linfocitos T control y otros con solo linfocitos T activados. Además, se dejaron algunos pocillos con solo IMCs usando, en este caso, IMDM suplementado como medio de cultivo (Tabla 3). La placa sembrada se dejó en la incubadora a 37 °C con 5 % CO<sub>2</sub> durante 48 horas.

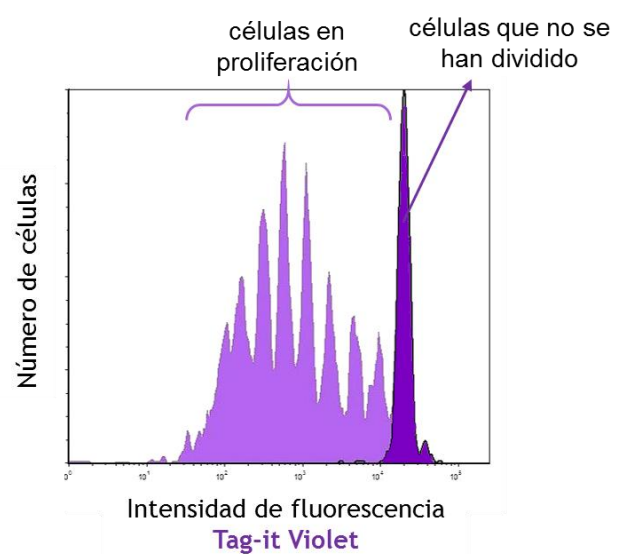
### Día 4. Análisis por citometría de flujo

Tras dos días de cocultivo, se recogieron las células y se analizaron en un citómetro de flujo FACSCanto™ II empleando el software FACSDiva 6.1 y FlowJo 7.6.4. Se evaluaron dos atributos en pocillos diferentes: la proliferación y el ciclo celular.

#### Análisis de la proliferación celular

La proliferación se evaluó utilizando un fluorocromo llamado Tag-it Violet (BioLegend, San Diego, EE. UU.), que difunde pasivamente al interior de las células. Una vez allí, se une covalentemente a proteínas intracelulares. Los linfocitos T se incubaron con este fluorocromo antes de sembrarlos. Concretamente, se expusieron a Tag-it Violet 2 μM diluido en PBS suplementado con albúmina sérica bovina 0,1 % (p/v) a 37 °C durante 20 min en agitación y oscuridad.

El análisis con Tag-it Violet origina gráficos como el de la Figura 16. En caso de que aparezca un único pico a la derecha (con una alta intensidad de fluorescencia) quiere decir que las células no se han dividido. En cambio, si aparecen varios picos hacia la izquierda significa que las células han proliferado. Esto es así porque cuando se divide una célula el fluorocromo se reparte uniformemente entre las células hijas, de manera que en cada división la intensidad de fluorescencia se reduce a la mitad. En definitiva, los picos que aparecen más a la izquierda corresponden a células que han sufrido más divisiones.

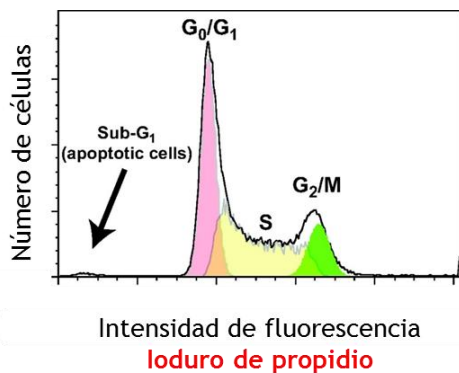


**Figura 16.** Ejemplo de un análisis por citometría de flujo de células marcadas con Tag-it Violet.

### Análisis del ciclo celular

El ciclo celular se evaluó usando ioduro de propidio, que es un fluorocromo que se intercala en el DNA. De este modo se puede averiguar en qué fase del ciclo celular se encuentran las células atendiendo a su contenido en DNA. Tras el cocultivo de linfocitos T con IMCs, se recogieron las células, se resuspendieron en 300  $\mu$ l de PBS frío y se pasaron a un tubo Falcon de 15 ml. Luego se añadió etanol al 70 % (v/v) a -20 °C lentamente por la pared del tubo, bajo agitación suave con ayuda de un vórtex para fijar y permeabilizar las células. Las muestras se guardaron a -20 °C y al día siguiente se marcaron con ioduro de propidio con ribonucleasas siguiendo las instrucciones del fabricante (Immunostep, Salamanca, España).

Este análisis origina gráficos como el de la Figura 17. Aparte de proporcionarnos información sobre el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular, lo interesante de estos gráficos es que nos muestran el porcentaje de células en apoptosis, que se corresponden con la región sub-G1 (Fig. 17).



**Figura 17.** Ejemplo de un análisis por citometría de flujo de células marcadas con ioduro de propidio.

## TRASPLANTE

En este apartado se explicará cómo se obtuvieron los diferentes tipos celulares utilizados para tratar de reducir los procesos neurodegenerativos del ratón mutante PCD y, posteriormente, las diferentes técnicas para su trasplante.

### Obtención de las células

#### Células mesenquimales humanas

Las hMSCs fueron proporcionadas por la Unidad de Producción Celular del Hospital Universitario de Salamanca (responsable: Prof. Fermín Sánchez-Guijo; Villarón *et al.*, 2004; Carrancio *et al.*, 2008). Se obtuvieron de la médula ósea de pacientes sanos tras haber obtenido su consentimiento informado, y de acuerdo con el Comité de Bioética del Hospital. Las muestras de médula ósea se

tomaron por aspiración de las crestas ilíacas bajo los efectos de anestesia local. A continuación, las células mononucleares se separaron por centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Paque (GE Healthcare Life Sciences, Marlborough, EE. UU.) y se sembraron a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/cm<sup>2</sup> en medio DMEM Low Glucose (Gibco) suplementado con suero bovino fetal 10 % (v/v) y penicilina/estreptomicina 1 % (v/v). Las células se mantuvieron en una atmósfera humidificada a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 %. Dos veces por semana se reemplazó el medio de cultivo, y al mismo tiempo se eliminaron las células no adherentes. Cuando las células adherentes alcanzaron una confluencia del 80 %, se separaron del frasco de cultivo con tripsina y se volvieron a sembrar a una densidad de  $5 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup>. Este proceso se repitió tres veces para asegurarse de que todas las células hematopoyéticas habían sido completamente descartadas. Tras el tercer pase, se tomaron alícuotas para comprobar que las células cumplían los criterios recomendados por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (Dominici *et al.*, 2006), evaluando tanto su fenotipo como su capacidad de diferenciación (Carrancio *et al.*, 2011).

### **Células mieloides inmaduras monocíticas**

Las IMCs se extrajeron siguiendo el mismo protocolo indicado previamente (ver Extracción de médula ósea y aislamiento de IMCs). La diferencia fue que, en este caso, el fluorocromo asociado al anticuerpo Ly-6C fue PE-Cy7 en vez de FITC. No se pudo usar FITC como fluorocromo ya que las células se aislaron de ratones GFP, y hay que tener en cuenta que FITC y GFP son fluorocromos similares.

La separación celular se llevó a cabo por el Servicio de Separación Celular de la Universidad de Salamanca empleando un citómetro separador FACS Aria™ III (BD Biosciences).

## **Inyección intravenosa**

### **A través de la vena lateral de la cola**

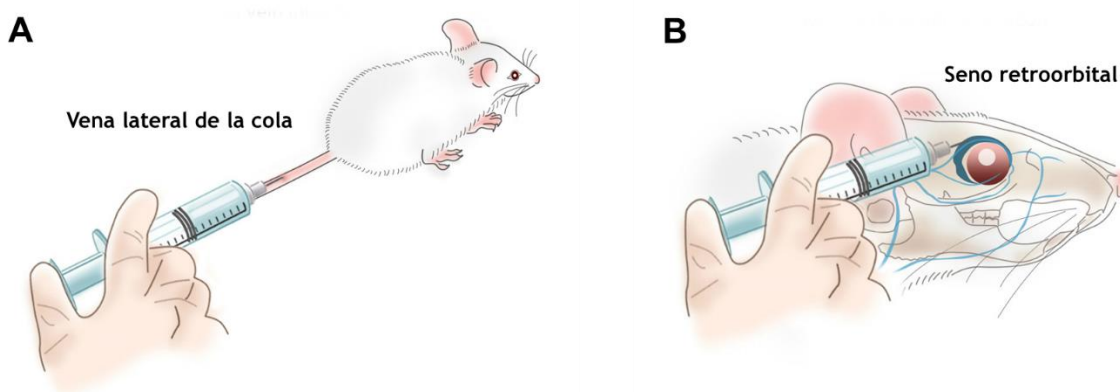
El método más común para inyectar sustancias o células por vía intravenosa en roedores consiste en utilizar una de las dos venas laterales de la cola (Fig. 18A; Hirota y Shimizu, 2012). Previamente al trasplante, cada animal se introdujo en un dispositivo de inmovilización para ratones (LE5016, PanLab, Barcelona, España) que dispone de un orificio para la cola, de manera que esta queda accesible. Después, la cola del animal se expuso a una fuente de calor (InfraCare HP3621, Philips Ibérica, Madrid, España) para producir una vasodilatación periférica, favoreciendo así la visualización de los vasos sanguíneos y la consiguiente inyección de las células. Una vez identificadas

las venas, el trasplante se realizó introduciendo muy superficialmente la aguja de una jeringuilla de insulina de 1 ml de calibre 30 G en el interior de una de ellas, en dirección distal-proximal y con el bisel hacia arriba. Cuando la aguja alcanza la vena, el émbolo disminuye su resistencia considerablemente, permitiendo la liberación de las células al torrente sanguíneo del animal receptor. Se inyectaron 150.000 células por animal en un volumen de 100-150  $\mu$ l de PBS.

### Por vía retroorbital

La inyección retroorbital es una técnica alternativa de administración intravenosa que, aunque puede resultar estéticamente desagradable, es más sencilla, rápida y reproducible. Se basa en la introducción de la aguja en el seno venoso retroorbital, que es una zona amplia situada por detrás del globo ocular en la que confluyen varios vasos sanguíneos (Fig. 18B; Yardeni *et al.*, 2011). Se ha demostrado que la vía retroorbital puede ser usada de forma equivalente a la vena lateral de la cola para la administración intravenosa de anticuerpos, compuestos químicos y células, sin diferencias significativas entre ambas metodologías (Steel *et al.*, 2008; León-Rico *et al.*, 2015).

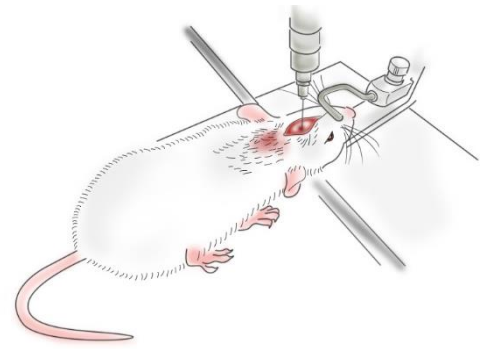
Para realizar esta técnica, en primer lugar, se indujo la anestesia de los ratones con isoflurano (Provesa, Murcia, España). A continuación, cada animal se colocó en posición de decúbito lateral izquierdo sobre una superficie plana y con la cabeza hacia la derecha. Seguidamente, se protruyó su ojo derecho aplicando una presión leve en la piel por encima y por debajo, y se introdujo la aguja cuidadosamente a través del canto medial con un ángulo de aproximadamente 30°. En este caso, el bisel debe mirar hacia abajo para evitar dañar el globo ocular. Una vez inyectada la solución celular, la aguja se retiró lentamente para que se distribuyera el contenido. La rapidez del procedimiento asegura la rápida recuperación de los ratones de la anestesia.



**Figura 18.** Rutas de inyección intravenosa practicadas en los ratones. **A)** Esquema de la inyección a través de la vena lateral de la cola del ratón. **B)** Esquema de la inyección por vía retroorbital. Imágenes tomadas de <https://www.clodrosome.com/routes-of-administration/>.

## Cirugía estereotáctica e inyección intracerebelosa

Para introducir las células directamente en el cerebelo fue necesario realizar cirugía estereotáctica (Fig. 19). Con dicho fin se utilizó un aparato estereotáctico (Just for Mouse Stereotaxic Instrument, Stoelting, Wood Dale, EE. UU.) que tiene incorporado un brazo manipulador de 3 ejes, y un sistema de fijación de animales con una barra para los dientes y barras para las orejas. Además, a la barra de los dientes se le acopló una mascarilla anestésica (Stoelting).



**Figura 19.** Esquema de la inyección intracerebelosa. Imagen tomada de <https://www.clodrosome.com/routes-of-administration/>.

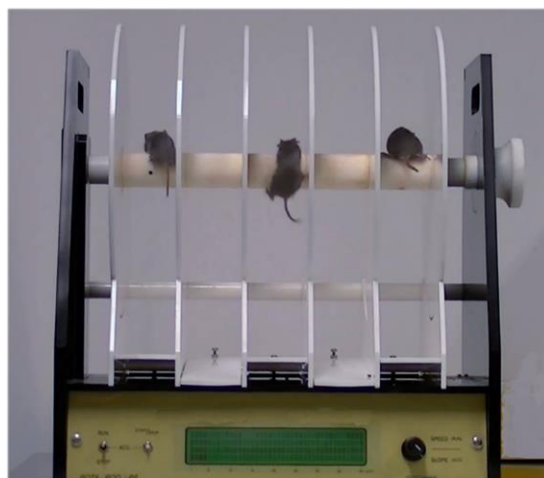
En primer lugar, se indujo la anestesia de cada ratón con isoflurano para posicionarlo adecuadamente sobre el aparato estereotáctico. Este es el paso más importante, ya que no solo es necesario para poder realizar la cirugía sino también para que las coordenadas sean consistentes entre animales. Una vez colocado correctamente y bajo los efectos de la anestesia, se aplicó a cada animal gel oftálmico (Bausch & Lomb, Rochester, EE. UU.) para evitar la desecación de los ojos y se procedió con la cirugía. Primero, se afeitó la zona de la cabeza y se aplicó bupivacaína 0,25 % (B. Braun), que es un anestésico local. A continuación, se practicó una pequeña incisión en la línea media de la parte posterior de la cabeza. Después, se apartó la piel hacia los lados, se retiró el periostio y se limpió la superficie del cráneo. Con ayuda del brazo manipulador se localizó la zona de interés en la línea media del hueso occipital (2,2 mm posterior a lambda). Seguidamente, se creó un pequeño agujero empleando un torno dental (W&H, Bürmoos, Austria) con una broca de 0,7 mm de diámetro (Fine Science Tools, Heidelberg, Alemania) y se eliminó el sangrado con un bastoncillo de algodón. Una vez expuesto el cerebelo, se empleó una jeringuilla Hamilton de 5  $\mu$ l modelo 75 RN (Hamilton, Reno, EE. UU.) acoplada al brazo manipulador para inyectar las células en el caso de los ratones trasplantados (130.000 IMCs en 2  $\mu$ l de PBS), o solo el vehículo en los animales Sham (2  $\mu$ l de PBS). Se inyectó todo el volumen lentamente durante 4 min (0,5  $\mu$ l/min) y se esperaron 2 min antes de retirar la aguja. Las coordenadas de la inyección fueron 2,2 mm posterior a lambda en la línea media y 2,5 mm ventral a lambda (profundidad). A continuación, se selló el agujero utilizando cera de hueso (Stoelting) con ayuda de una espátula. Finalmente, se suturó la piel con suturas estériles de seda trenzada no absorbible 5/0 (Stoelting). Al terminar, se inyectó a cada animal una mezcla de dos analgésicos postoperatorios por vía subcutánea, meloxicam 2 mg/kg (Metacam, Boehringer Ingelheim,

Ingelheim am Rhein, Alemania) y buprenorfina 0,1 mg/kg (Buprecare, Divasa-Farmavic, S.A., Barcelona, España). Los ratones se introdujeron en una jaula situada sobre una manta eléctrica hasta su recuperación de la anestesia para evitar la hipotermia de los animales.

**Nota:** las coordenadas se determinaron empíricamente, ya que los ratones utilizados tenían 20 días y los atlas existentes son fundamentalmente de encéfalos adultos. En nuestro caso, se utilizó lambda (y no bregma) como punto de referencia con el fin de que la incisión fuese lo más pequeña posible.

## ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO MOTOR: TEST DE ROTAROD

Con el fin de analizar una posible mejora funcional derivada del trasplante, se evaluó la capacidad motora de los animales de experimentación utilizando el test de la varilla giratoria o RotaRod. La prueba consiste en una barra giratoria dispuesta horizontalmente con discos separadores que permiten colocar varios ratones a la vez sin que puedan interactuar (Fig. 20). Se sometió al ensayo a ocho ratones PCD sin tratamiento, ocho ratones PCD trasplantados con IMCs por vía intracerebelosa y ocho ratones PCD Sham, cinco y diez



**Figura 20.** Ratones realizando el test de RotaRod.

días después de la cirugía estereotáctica, es decir, a P25 y a P30. Para esta prueba no se evaluaron los ratones trasplantados por vía intravenosa ya que no se encontraron células derivadas del trasplante en el encéfalo (ver Resultados).

El test se realizó siempre en las mismas condiciones, entre las 16:00 y las 18:00 horas, y en silencio para evitar falsas medidas debidas al reflejo de sobresalto. Todos los ratones se colocaron en la barra moleteada horizontal del dispositivo con una velocidad de rotación de 4 rpm (Rotarod LE8200, Panlab). Cuando todos ellos caminaban sobre la barra a velocidad constante, se accionó el dispositivo para que imprimiese una aceleración de 3,6 rpm/min, pasando de 4 a 40 rpm en 10 min. Cuando un ratón se cae, desplaza una plataforma basculante, lo que permite detectar el momento de su caída. En cada caso, se apuntó la velocidad máxima y el tiempo que tardaron en caerse de la barra (latencia). La prueba se repitió 7 veces con intervalos de descanso de 15 min. Tanto al inicio como al final de cada sesión se lavó el aparato con etanol al 96 % (v/v) para minimizar la posible influencia de olores. Para el análisis estadístico se tomó la mejor de las 7 medidas (latencia más alta) como valor que mejor representa la habilidad motora de cada ratón.



## OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DEL TEJIDO

### Perfusión y disección

Los ratones se anestesiaron mediante una inyección intraperitoneal de hidrato de cloral al 5 % (p/v; Sigma-Aldrich) a una dosis de 10  $\mu$ l/g. A continuación, se administraron 100  $\mu$ l de heparina sódica (1.000 U/ml; Sigma-Aldrich) en el ventrículo izquierdo, y los animales se perfundieron por vía intracardiaca con NaCl 0,9 % (p/v; Sigma-Aldrich) durante 1 min, seguido de una solución fijadora (Somogyi sin glutaraldehído) compuesta por paraformaldehído al 4 % (p/v; Panreac Química, Barcelona, España) y ácido pícrico saturado al 15 % (v/v; Panreac Química) en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4 (PB<sup>20</sup>), durante 15 min.

Posteriormente se extrajo el encéfalo de cada animal y se dividió en tres bloques (rostral, medial y caudal). El tejido permaneció en postfijación en la misma solución fijadora durante 2 horas a temperatura ambiente, y se lavó con PB durante otras dos horas como mínimo en agitación y a temperatura ambiente. A continuación, los bloques se sumergieron en una solución crioprotectora de sacarosa al 30 % (p/v; Panreac Química) en PB y se mantuvieron en agitación a 4 °C hasta que se hundieron. Por último, los bloques se congelaron rápidamente empleando N<sub>2</sub> líquido y se conservaron a -80 °C hasta el momento de su procesamiento.

### Seccionamiento

Para el presente estudio se realizaron secciones parasagitales del vermis o coronales del BO, de 40  $\mu$ m de espesor, mediante un micrótopo de deslizamiento (Jung SM 2000, Leica Instruments, Alemania) acoplado a una unidad de congelación “Frigomobil” (Leica Instruments), a una temperatura que osciló entre -22 y -16 °C. Las secciones obtenidas se recogieron en PB en 6 series consecutivas en placas de 24 pocillos (VWR International, Radnor, EE. UU.). Posteriormente, se realizaron lavados en PB (3 x 10 min) para eliminar los restos de fijador y sacarosa. Finalmente, y hasta su procesamiento histológico, se almacenaron a -20 °C en mezcla congeladora, que está compuesta por glicerol al 30 % (v/v) y polietilenglicol al 30 % (v/v) en PB.

---

<sup>20</sup> Del inglés *Phosphate Buffer*

## ANÁLISIS HISTOLÓGICO

### Marcaje de células mesenquimales humanas en suspensión

Previamente al trasplante de las hMSCs, quisimos optimizar su marcaje con el fin de identificarlas adecuadamente en las muestras de tejido de los ratones trasplantados por vía intravenosa. Para ello, se emplearon dos anticuerpos (Tabla 6) y dos fijadores diferentes: a) Somogyi, utilizado habitualmente en nuestro laboratorio, y b) Carnoy, empleado por el personal del Hospital Universitario. El fijador Carnoy se compone de metanol 75 % (v/v) y ácido acético 25 % (v/v).

Anticuerpos primarios	Especie	Origen	Diluciones ensayadas	Anticuerpos secundarios (burro)
Mitocondria humana	Ratón	Merk Millipore	1:50, 1:100, 1:500, 1:1.000	Anti-IgG de ratón Cy2
Mitocondria humana	Conejo	Abcam	1:50, 1:100, 1:500, 1:1.000	Anti-IgG de conejo Cy2

**Tabla 6.** Relación de los anticuerpos primarios utilizados para el marcaje de hMSCs en suspensión, así como su anticuerpo secundario correspondiente.

En primer lugar, las células se fijaron con una de las dos posibles soluciones fijadoras (Carnoy o Somogyi) durante 15 min. Después, se eliminó el fijador y se añadió PBS. A continuación, las células se adhirieron sobre portaobjetos SuperFrost UltraPlus (Thermo Fisher Scientific), se lavaron con PBS (3 x 10 min) y se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 6), diluido en PBS junto con suero normal de burro 5 % (v/v) y Tritón X-100 0,2 % (v/v), durante 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron con PBS (3 x 10 min), para más tarde incubarse con el anticuerpo secundario oportuno (Tabla 4; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, EE. UU.), diluido en PBS, durante 1 hora y media. Después, se añadió DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato; Sigma-Aldrich) a una dilución de 1:10.000 para contrateñir los núcleos celulares. Finalmente, las secciones se lavaron con PBS (3 x 10 min) en ausencia de iluminación directa y se cubrieron con medio antidesvanecimiento (ver Apéndice I: soluciones de uso común).

### Inmunohistoquímica

Las secciones procedentes de los encéfalos de los ratones perfundidos se lavaron con PBS (3 x 10 min) y se incubaron en agitación constante con los anticuerpos primarios correspondientes (ver Tabla 7) diluidos en PBS con suero normal de burro al 5 % (v/v) y Tritón X-100 al 0,2 % (v/v), durante 72 horas a 4 °C. Posteriormente, se lavaron con PBS (3 x 10 min), para más tarde incubarse con los anticuerpos secundarios correspondientes (ver Tabla 7; Jackson ImmunoResearch Laboratories) diluidos a 1:500 en PBS durante una hora y media a temperatura ambiente. Diez minutos antes

de que finalizase la incubación, se añadió DAPI a una dilución de 1:10.000 para obtener una contra-tinción nuclear. Finalmente, las secciones se lavaron con PBS (3 x 10 min), se montaron sobre portaobjetos gelatinizados y se cubrieron usando un medio antidesvanecimiento.

Anticuerpos primarios	Especie	Origen	Dilución	Anticuerpos secundarios (burro)
Calbindina	Ratón	Swant	1:2.000	Anti-IgG de ratón Cy3
CD3	Conejo	Abcam	1:200	Anti-IgG de conejo Cy3
CD45	Rata	Bio-Rad Laboratories	1:1.000	Anti-IgG de rata Cy2
GFP	Cabra	Abcam	1:2.000	Anti-IgG de cabra Cy2
Iba1	Conejo	Wako Pure Chemical Industries	1:1.000	Anti-IgG de conejo Cy3
Mitocondria humana	Ratón	Merk Millipore	1:500	Anti-IgG de ratón Cy2
Mitocondria humana	Conejo	Abcam	1:500	Anti-IgG de ratón Cy2

**Tabla 7.** Relación de los anticuerpos primarios utilizados para la técnica inmunohistoquímica, así como su anticuerpo secundario correspondiente.

## Controles de especificidad

Para comprobar la especificidad de los anticuerpos se han utilizado los siguientes controles:

- Omisión de los anticuerpos primarios, para detectar uniones inespecíficas de los anticuerpos secundarios al tejido.
- Omisión de los anticuerpos secundarios, para detectar fluorescencia inespecífica.
- En el caso de doble inmunofluorescencia, se incubaron las secciones con uno de los dos anticuerpos primarios y se añadió el anticuerpo secundario correspondiente al anticuerpo primario omitido para detectar reacciones cruzadas.
- Como control negativo de los anticuerpos para la proteína GFP, se emplearon secciones de ratones que no habían sido trasplantados con células GFP<sup>+</sup>.

## Técnicas de recuperación antigénica

En algunos casos, se aplicaron distintos tratamientos previamente a la inmunohistoquímica para desenmascarar los epítomos de interés y, de esta manera, mejorar la inmunoreactividad de las

moléculas buscadas. Las técnicas de recuperación antigénica utilizadas en esta Tesis Doctoral se detallan a continuación. Todas ellas se emplearon para intentar conseguir inmunomarcaje de las hMSCs en tejido empleando los anticuerpos antimitocondriales.

### **SDS 1%**

Consiste en incubar las secciones durante 5 min a temperatura ambiente en una solución de PBS con SDS al 1 % (v/v; Brown *et al.*, 1996).

### **SDS-EDTA**

Consiste en incubar las secciones durante 30 min a temperatura ambiente en una solución de SDS 0,2 % (v/v), NaCl 30 mM, EDTA 1,5 mM y Tris-base 20 mM pH 7,4.

### **Choques térmicos en tampón citrato**

Este tratamiento consistió en someter las secciones a dos choques térmicos de 4 min cada uno en un microondas a 500 W. Las secciones se sumergieron previamente en un tampón citrato 0,1 M pH 6,0, compuesto por una mezcla de ácido cítrico 0,1 M y citrato trisódico 0,1 M. El tampón citrato se cambió entre ambos choques térmicos. Se dejaron atemperar las secciones durante 30 min. Este tratamiento también se aplicó para optimizar la detección de CD3.

### **Técnica TUNEL**

La técnica TUNEL<sup>21</sup> se empleó para detectar células en apoptosis. Este método se basa en el marcaje de los extremos 3'-OH libres que se generan en el DNA por acción de endonucleasas durante el proceso de muerte celular programada (Gavrieli *et al.*, 1992). Para ello, se utiliza la transferasa terminal, una enzima que se une específicamente a los extremos 3'-OH libres y que añade desoxinucleótidos al azar. En esta técnica se utilizan nucleótidos de dUTP biotiniliado, que se pueden detectar con moléculas que se unen a la biotina, como puede ser la estreptavidina empleada en nuestros experimentos.

En primer lugar, las secciones se lavaron con PBS (3 x 10 min). A continuación, se fijó de nuevo el tejido con una solución de etanol:ácido acético 2:1 (v/v) a -20 °C durante 5 min, para seguidamente lavarse con PBS (3 x 10 min). Posteriormente, se permeabilizó el tejido durante 15 min con una solución compuesta por Tritón X-100 0,2 % (v/v) y citrato sódico 0,1 % (p/v) preparada en el momento. Las secciones se lavaron de nuevo con PBS (2 x 10 min), tras lo cual se incubaron en

---

<sup>21</sup> Del inglés *Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling*

tampón TUNEL durante 30 min (ver Apéndice I: soluciones de uso común). Después, se añadió transferasa terminal (2  $\mu\text{l/ml}$ ; Roche, Basilea, Suiza) y dUTP biotinilado (1  $\mu\text{l/ml}$ ; Roche) durante 1 hora y media a 37 °C, en tampón TUNEL. La reacción se paró con tampón SSC<sup>22</sup> (2 x 10 min; ver Apéndice I: soluciones de uso común) y, después, se lavaron las secciones con PBS (3 x 10 min). Seguidamente, las secciones se incubaron con estreptavidina conjugada con Cy3 (1:200; Jackson ImmunoResearch Laboratories) diluida en PBS. Finalmente, los núcleos se contratiñeron con DAPI, las secciones se lavaron con PBS (3 x 10 min) y se montaron como se ha descrito anteriormente en el apartado de Inmunohistoquímica.

## VISUALIZACIÓN AL MICROSCOPIO Y RECUENTO CELULAR

Las secciones se observaron con un microscopio de epifluorescencia Olympus Provis AX70 acoplado a una cámara digital Olympus DP70 (Olympus, Tokio, Japón). Posteriormente, las imágenes se procesaron digitalmente con el programa Adobe Photoshop CC 2015 (Adobe Inc., San José, EE. UU.) para ajustar ligeramente el contraste, el brillo y el balance de color.

Los leucocitos se pudieron contar manualmente tras observar todas las secciones estudiadas, gracias a que su número no fue demasiado alto. Tanto el BO como el cerebelo de los ratones PCD sufren una reducción considerable (Mullen *et al.*, 1976; Baker y Greer, 1990), hecho que complicaría las comparaciones de densidad celular ( $\text{n}^\circ$  de células /  $\text{mm}^2$ ) para los análisis. Por tanto, se eligió el número de células por sección como medida a la hora de comparar los distintos grupos experimentales. Para los análisis histológicos del cerebelo, se tomaron 3 secciones de vermis por cada animal, región en la cual todos los lóbulos cerebelosos se aprecian claramente y donde la degeneración comienza antes (Wang y Morgan, 2007). Con respecto al BO, se analizaron secciones coronales centrales comparables, donde tanto la capa glomerular como la capa de las células mitrales se observaron claramente (Weruaga *et al.*, 1999).

Los resultados del recuento de células de Purkinje se dieron con respecto a la longitud de la capa de las células de Purkinje, teniendo en cuenta todo el vermis y también el lóbulo X por separado, por ser la región donde sobreviven la mayoría de las células de Purkinje a P30 (Wang y Morgan, 2007). Los resultados del recuento de células en apoptosis se calcularon respecto al área del vermis completo y también respecto al área del lóbulo IV-V, que es el que albergó una lesión producida por la aguja tras realizar la inyección de IMCs (o PBS) directamente en el cerebelo. En estos casos, como

---

<sup>22</sup> Del inglés *Saline Sodium Citrate*

solo se emplearon animales PCD, se pudieron comparar datos de densidades sin que existiesen complicaciones adicionales. Tanto la longitud de la capa de las células de Purkinje como las áreas se midieron con los programas NeuroLucida y NeuroExplorer (MBF Bioscience, Williston, EE. UU.)

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Todos los datos se representaron proporcionando la media  $\pm$  el error estándar de la media (ESM). En todos los casos, se comprobó la normalidad con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. El nivel de significación se estableció en  $*p < 0,05$  y  $**p < 0,01$ . Todos los análisis se efectuaron con el programa IBM SPSS Statistical 25 (IBM, Armonk, EE. UU.).

### **Recuento y análisis fenotípico de leucocitos**

Por un lado, se empleó el test ANOVA de dos factores para comparar ratones silvestres y PCD a diferentes edades. Una vez que se descartó la existencia de interacción entre los dos factores (edad y genotipo; ver Resultados), se realizó la prueba *t* de Student para evaluar posibles diferencias entre ratones silvestres y PCD dentro de cada edad, o bien el test ANOVA de un factor y el test *post hoc* de Bonferroni para evaluar diferencias entre edades. Por otro lado, se realizó el test ANOVA de un factor para comparar varios grupos experimentales (ratones silvestres, PCD, tratados con LPS o expuestos a radiación) dentro de la misma edad. En este segundo caso, se usó el test *post hoc* de Dunnett para comparar todos los grupos respecto al control (ratones silvestres o PCD).

### **Test de RotaRod**

Para realizar el análisis estadístico se empleó el test ANOVA de dos factores, lo que nos permitió comparar ratones PCD con diferentes tratamientos (sin tratamiento, Sham y trasplante intracerebeloso) a diferentes edades. Una vez descartada la existencia de interacción entre los dos factores (ver Resultados), se aplicó el test ANOVA de un factor para cada edad y el test *post hoc* de Bonferroni para ver posibles diferencias entre los tres grupos experimentales.

### **Densidad de células de Purkinje y de células en apoptosis**

En este caso, se empleó el test ANOVA de un factor y el test *post hoc* de Bonferroni para ver posibles diferencias entre los tres grupos experimentales de ratones PCD (sin tratamiento, Sham y trasplante intracerebeloso).

*“En medio de la dificultad yace la  
oportunidad.”*

*Albert Einstein*

*“No te preocupes por los fracasos,  
preocúpate con las posibilidades que  
pierdes cuando ni siquiera lo intentas.”*

*Jack Canfield*

## **RESULTADOS**





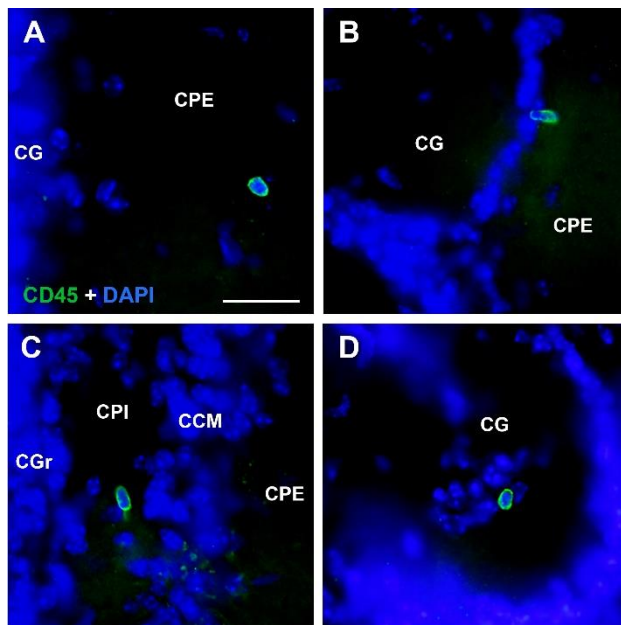
## ALTERACIONES LEUCOCITARIAS ANTE MUERTE NEURONAL SELECTIVA

Los procesos neurodegenerativos, así como la respuesta inflamatoria local de la microglía y de la astroglia en el ratón PCD ya se han estudiado previamente (Mullen *et al.*, 1976; Wang y Morgan, 2007; Baltanás *et al.*, 2013). Para esta Tesis Doctoral nos propusimos ampliar los conocimientos sobre la respuesta inflamatoria a nivel periférico, con especial énfasis en los leucocitos, estudiando tanto su infiltración el SNC como su perfil fenotípico en el bazo.

### Análisis del número de leucocitos en el bulbo olfativo principal de animales silvestres y PCD

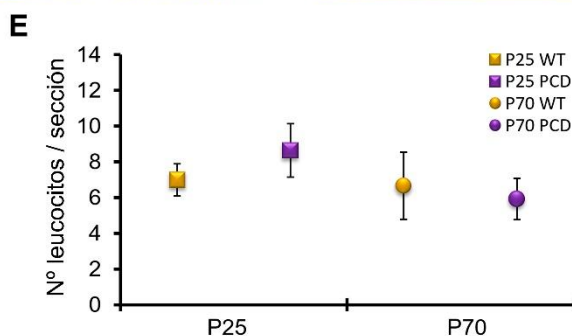
En primer lugar, investigamos el efecto de la muerte selectiva de las células mitrales sobre la infiltración leucocitaria. Para ello, se analizó el número de leucocitos en secciones de BO de ratones silvestres y PCD a P25, cuando la degeneración de las células mitrales no ha comenzado, y a P70, cuando la muerte de estas neuronas está en pleno progreso (Valero *et al.*, 2006).

Los leucocitos (células CD45<sup>+</sup>) se encontraron en todas las capas bulbares tanto de animales



silvestres como PCD, aunque de forma escasa, y presentaron una morfología redondeada u ovalada (Fig. 21A-D). Una vez realizado su recuento, no se detectaron diferencias significativas en el número de leucocitos por sección entre ratones silvestres y PCD ni a P25 ( $p = 0,154$ ) ni a P70 ( $p = 0,747$ ; Fig. 21E).

**Figura 21.** Infiltración leucocitaria en el BO de ratones silvestres y PCD. **A-D**) Inmunomarcaje de leucocitos con CD45 (verde) en diferentes capas del BO; los núcleos se contratiñeron con DAPI (azul). **E**) Gráfica que muestra la cuantificación de los leucocitos por sección de BO a P25, cuando la muerte de las células mitrales no ha comenzado en los ratones PCD, y a P70, cuando la pérdida de las células mitrales está en progreso. En este caso, no se detectaron diferencias entre los grupos experimentales. Los datos están expresados como la media  $\pm$  ESM. CCM, capa de las células mitrales; CG, capa glomerular; CGr, capa de los granos; CPE, capa plexiforme externa; CPI, capa plexiforme interna; WT, wild-type. Barra de escala: 25  $\mu$ m.



Por lo tanto, parece que el ambiente neurodegenerativo en el BO de los ratones PCD no desencadena la infiltración de leucocitos.

## **Análisis del número y de la distribución de los leucocitos en el cerebelo de ratones silvestres y PCD**

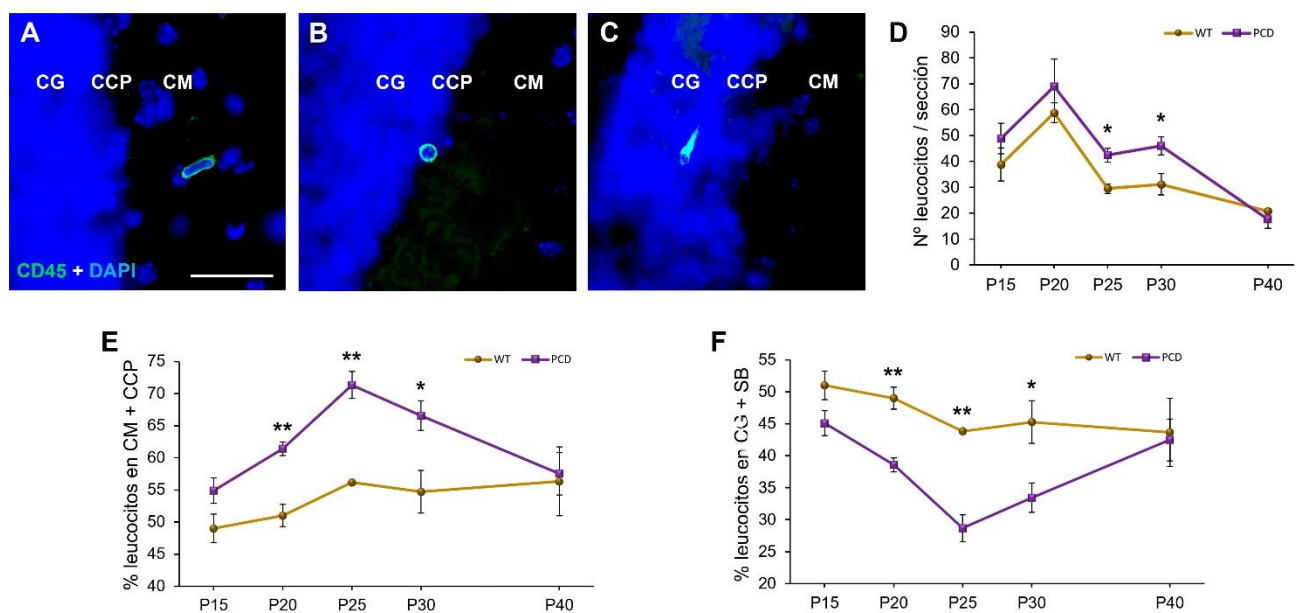
A continuación, quisimos comprobar si la intensidad del proceso degenerativo/inflamatorio es importante para el reclutamiento leucocitario. Para ello, se analizó el número de leucocitos en el cerebelo, región que presenta un ambiente neurodegenerativo e inflamatorio exacerbado (Baltanás *et al.*, 2013). En este caso, se emplearon ratones silvestres y PCD a P15, P20, P25, P30 y P40, teniendo en cuenta la progresión temporal de la degeneración de las células de Purkinje en los ratones PCD (ver Introducción).

Al igual que ocurrió en el BO, se encontraron células CD45<sup>+</sup> en todas las capas de la corteza cerebelosa tanto en los animales silvestres como en los PCD (Fig. 22A-C), siendo particularmente escasas en la sustancia blanca. Asimismo, la mayoría de los leucocitos mostraron una morfología redondeada u ovalada (Fig. 22A y B), y solamente algunas de estas células presentaron un extenso proceso citoplasmático (Fig. 22C). Sin embargo, en este caso se detectó un incremento estadísticamente significativo en el número de leucocitos en los ratones PCD a P25 ( $p = 0,017$ ) y a P30 ( $p = 0,027$ ), en relación a los ratones silvestres (Fig. 22D). Ambas edades se corresponden con estadios avanzados de neurodegeneración en los animales PCD. Esto es indicativo de que la gravedad del proceso degenerativo en un área encefálica determinada está implicada en el reclutamiento leucocitario hacia el SNC.

Además, a P20 se pudo observar un pico llamativo en el número de leucocitos tanto en los animales silvestres como en los PCD (Fig. 22D), que además fue estadísticamente superior en relación a las demás edades en los animales silvestres ( $p = 0,038$  entre P20 y P15,  $p = 0,002$  entre P20 y P25,  $p = 0,004$  entre P20 y P30, y  $p < 0,001$  entre P20 y P40). Pensamos que este hecho está conectado con procesos del desarrollo que están ocurriendo en el cerebelo a esa edad, como discutiremos posteriormente.

Dado que el número de leucocitos en el cerebelo no fue tan reducido como en el BO, consideramos oportuno evaluar su distribución dentro de las diferentes capas de la corteza cerebelosa y de la sustancia blanca subyacente. Para ello, se agruparon por una parte la capa molecular y la capa de las células de Purkinje –donde se localizan los árboles dendríticos y los somas de estas neuronas de proyección– y, por otra, la capa de los granos y la sustancia blanca. Esta agrupación se hizo porque

la capa molecular y la capa de las células de Purkinje son las regiones más afectadas por la muerte de las células de Purkinje, y porque es donde tienden a situarse las células gliales en los ratones PCD durante la degeneración cerebelosa (Baltanás *et al.*, 2013). El porcentaje de leucocitos fue notablemente más alto en las capas molecular y de las células de Purkinje de los ratones PCD en relación a los silvestres a P20 ( $p = 0,003$ ), P25 ( $p = 0,002$ ) y P30 ( $p = 0,019$ ), es decir, durante todo el proceso degenerativo (Fig. 22E). Los resultados respecto al porcentaje de leucocitos en la capa de los granos y la sustancia blanca fueron los opuestos (Fig. 22F). Todos estos datos apuntan a que la pérdida de las células de Purkinje modifica el patrón de infiltración de las células inmunitarias periféricas. Por este motivo, decidimos centrar el resto de nuestro estudio en relación a la degeneración cerebelosa.



**Figura 22.** Infiltración y distribución leucocitaria en el cerebelo de ratones silvestres y PCD. **A-C)** Inmunomarcaje de leucocitos con CD45 (verde) en las diferentes capas de la corteza cerebelosa; los núcleos se contratiñeron con DAPI (azul). **D)** Gráfica que representa los resultados de la cuantificación de leucocitos por sección de vermis. **E-F)** Gráficas que muestran el porcentaje de leucocitos en el conjunto de las capas molecular y de las células de Purkinje (E) o en la capa de los granos más la sustancia blanca subyacente (F). Nótese las diferencias existentes en la cuantificación y en la distribución cuando la degeneración de las células de Purkinje está en progreso (desde P20 hasta P30). Los datos vienen dados como la media  $\pm$  ESM. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . CCP, capa de las células de Purkinje; CG, capa de los granos; CM, capa molecular; SB, sustancia blanca; WT, wild-type. Barra de escala: 25  $\mu$ m.

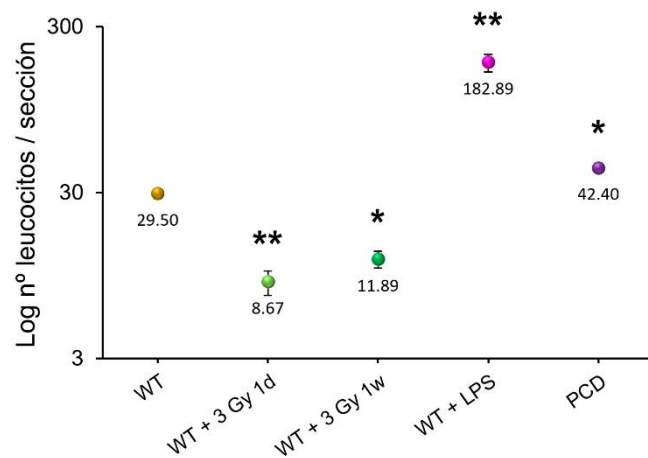
## Análisis del número y la distribución de leucocitos en el cerebelo de distintos modelos de neuroinflamación

Seguidamente, quisimos caracterizar mejor los resultados obtenidos en el cerebelo de los ratones PCD comparándolos con modelos estandarizados de neuroinflamación. Para ello, se empleó

LPS o radiación gamma para generar dos escenarios inflamatorios en los que se ha descrito una mayor infiltración de células sanguíneas (Cazareth *et al.*, 2014; Morganti *et al.*, 2014; Moravan *et al.*, 2016). El LPS se administró un día antes del sacrificio, mientras que la radiación se aplicó bien un día, bien una semana antes del sacrificio (ver Material y Métodos). En concreto, se compararon los siguientes paradigmas experimentales: ausencia de inflamación (silvestre), inflamación asociada a muerte neuronal selectiva (PCD), inflamación inducida por LPS (2 mg/kg) e inflamación inducida por radiación gamma (3 Gy). Todos los grupos se estudiaron a P25, porque esta es la edad a la que se apreció una mayor diferencia tanto en la infiltración como en la distribución de los leucocitos entre los animales silvestres y PCD (ver resultados anteriores). Además, a esta edad la degeneración cerebelosa está en pleno apogeo (Mullen *et al.*, 1976).

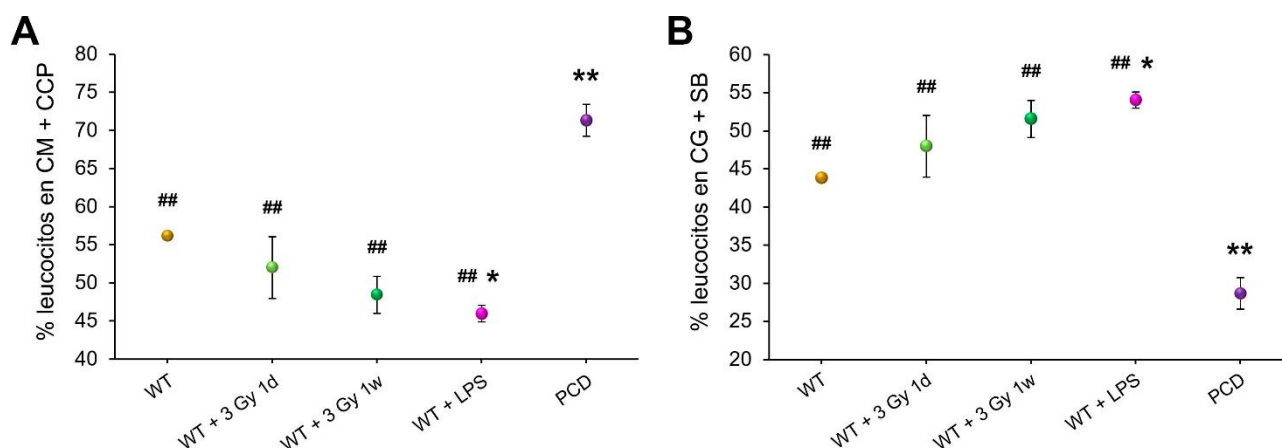
Nuestros resultados demostraron un descenso evidente en el número de leucocitos en el cerebelo de los animales irradiados respecto a los animales silvestres, independientemente del momento en el que recibieron la radiación, ya sea 1 día ( $p = 0,002$ ) o 1 semana ( $p = 0,017$ ) antes del sacrificio (Fig. 23). En cambio, la infiltración leucocitaria aumentó drásticamente en los animales tratados con LPS ( $p < 0,001$ ; Fig. 23). Estos resultados parecen indicar que la radiación de cuerpo completo o el LPS pueden ser agentes potenciales para dificultar o facilitar la extravasación de células inmunitarias hacia el cerebelo, respectivamente.

Como se vio anteriormente, en los ratones PCD los leucocitos tendieron a localizarse claramente en aquellas capas de la corteza cerebelosa más afectadas por la degeneración de las células de Purkinje, en relación a los animales silvestres (Fig. 24A y B). Curiosamente, este fenómeno no se observó ni en los animales tratados con LPS ni en los animales irradiados, que experimentaron una inflamación generalizada. De hecho, el tratamiento con LPS incluso indujo un efecto opuesto, aunque más ligero, sobre los leucocitos, que se posicionaron en mayor medida hacia las capas más internas del cerebelo ( $p = 0,032$ ). Si analizamos los ratones PCD con respecto a los demás grupos, es incluso



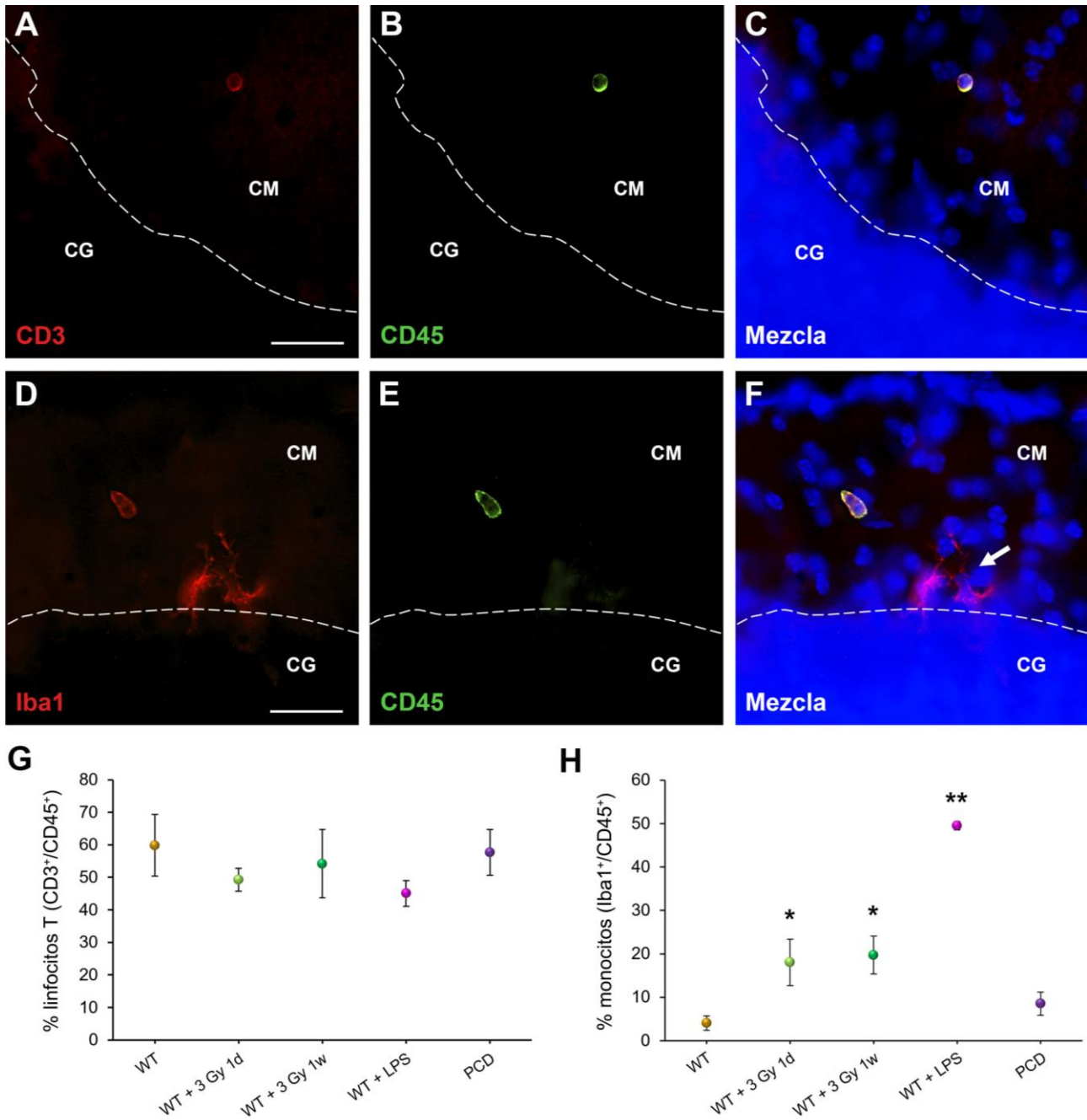
**Figura 23.** Cuantificación de los leucocitos en el cerebelo ante distintos escenarios neuroinflamatorios a P25. Los datos se muestran en escala logarítmica para proporcionar una visualización más clara, ya que el número de leucocitos en los animales tratados con LPS fue mucho mayor que en el resto de grupos. Los datos vienen dados como la media  $\pm$  ESM. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . Todas las comparaciones estadísticas se hicieron respecto al grupo de ratones silvestres (WT).

más evidente el efecto diferencial que ejerce la degeneración cerebelosa sobre la distribución leucocitaria ( $p = 0,002$  respecto a los ratones silvestres,  $p < 0,001$  respecto tanto a los ratones irradiados como a los tratados con LPS; Fig. 24 A y B). En conjunto, estos hallazgos ratifican que la degeneración selectiva de las células de Purkinje desencadena un efecto atrayente específico sobre las células sanguíneas.



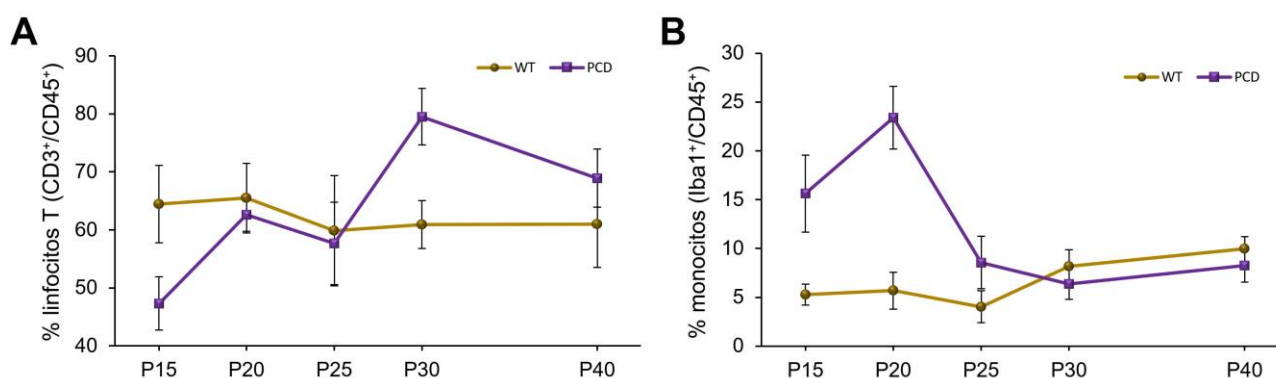
**Figura 24.** Distribución leucocitaria en el cerebelo de distintos modelos animales de neuroinflamación a P25. **A)** Porcentaje de leucocitos en el conjunto de las capas molecular y de las células de Purkinje. **B)** Porcentaje de leucocitos en el conjunto de la capa granular y la sustancia blanca subyacente. Nótese la distribución claramente diferencial en los ratones PCD. Los datos vienen dados como la media  $\pm$  ESM. \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$ , respecto a los ratones silvestres; ## $p < 0,01$ , respecto a los ratones PCD. Todas las comparaciones estadísticas se hicieron respecto al grupo de ratones silvestres. CCP, capa de las células de Purkinje; CG, capa de los granos; CM, capa molecular; SB, sustancia blanca; WT, wild-type.

Además, quisimos caracterizar con más profundidad los leucocitos en todos estos grupos experimentales. En particular, estudiamos el porcentaje de linfocitos T (células  $CD3^+ / CD45^+$ ; Fig. 25A-C) y el porcentaje de monocitos (células  $Iba1^+ / CD45^+$ ; Fig. 25D-F), ya que se ha descrito que estas son las poblaciones principales de leucocitos que ingresan en el sistema nervioso dañado (González y Pacheco, 2014; Solleiro-Villavicencio y Rivas-Arancibia, 2018). Con respecto al porcentaje de linfocitos T, no se encontraron cambios significativos entre los grupos experimentales ( $p$ -valor del ANOVA de un factor = 0,476; Fig. 25G). En relación a la población monocítica, se detectó un incremento significativo en el porcentaje de monocitos en ambos grupos irradiados en comparación con los animales silvestres ( $p = 0,025$  y  $p = 0,032$  para 1 día y 1 semana tras la radiación, respectivamente), que fue incluso mayor en los animales tratados con LPS ( $p < 0,001$ ; Fig. 25H). Por el contrario, no se detectaron diferencias entre los animales silvestres y PCD ( $p = 0,465$ ; Fig. 25H). Estos resultados sugieren que la degeneración de las células de Purkinje no altera ni la proporción de linfocitos T infiltrados ni la proporción de monocitos en el parénquima cerebeloso, a diferencia de lo que ocurre en otros contextos inflamatorios.



**Figura 25.** Caracterización de los leucocitos en el cerebelo bajo distintos escenarios neuroinflamatorios a P25. **A-C)** Inmunomarcaje de un linfocito T en la capa molecular con anticuerpos contra CD3 (rojo) y CD45 (verde). **D-F)** Inmunomarcaje de un monocito en la capa molecular con anticuerpos contra Iba1 (rojo) y CD45 (verde); flecha: células de microglía Iba1<sup>+</sup>, marcadas negativamente para CD45. Los núcleos se contratiñeron con DAPI (azul). Las imágenes han sido tomadas de un animal tratado con LPS. La línea discontinua delimita la capa de las células de Purkinje. **G)** Porcentaje de linfocitos T en el cerebelo. **H)** Porcentaje de monocitos en el cerebelo. Nótese que la inflamación inducida por LPS o por radiación desencadenó la infiltración de monocitos, que fue muy reducida tanto en los animales silvestres como PCD. Los datos están expresados como la media ± ESM. Todas las comparaciones estadísticas se realizaron respecto al grupo de ratones silvestres. \**p* < 0,05; \*\**p* < 0,01. CG, capa de los granos; CM, capa molecular; WT, wild-type. Barra de escala: 25 μm.

Aunque no identificamos variaciones en el porcentaje de linfocitos T y de monocitos en el cerebelo de ratones PCD en comparación con los silvestres, quisimos ultimar este estudio investigando posibles variaciones temporales a lo largo del proceso degenerativo de los animales mutantes (Fig. 26). En ambos casos hubo interacción entre los dos factores analizados (edad y genotipo; ANOVA de dos factores;  $p = 0,090^{23}$  en el caso de los linfocitos T, y  $p = 0,003$  en el caso de los monocitos); en los casos en los que se produce esta interacción, no se recomienda analizar cada factor por separado dada la relación compleja entre ambos. Por este motivo, nos limitamos a describir los resultados obtenidos haciendo referencia a su representación gráfica. En los animales silvestres, los porcentajes de linfocitos T y de monocitos se mantuvieron constantes a lo largo del tiempo (Fig. 26). Por el contrario, en los ratones PCD el porcentaje de linfocitos T presentó algunas fluctuaciones a P15 y a P30 (Fig. 26A). Respecto al porcentaje de monocitos, se identificó un incremento llamativo en los animales PCD entre P15 y P20, que revirtió rápidamente (Fig. 26B). Ello parece indicar que los estadios iniciales del proceso degenerativo inducen una atracción puntual de monocitos hacia el cerebelo mutante. En conjunto, estos resultados reflejan ciertas variaciones en dos de los principales tipos leucocitarios que se pueden encontrar en el SNC, antes y durante la degeneración de las células de Purkinje en los animales PCD.



**Figura 26.** Estudio temporal del porcentaje de linfocitos T y de monocitos en el cerebelo de ratones silvestres y PCD. **A)** Gráfica que muestra el porcentaje de linfocitos T. **B)** Gráfica que muestra el porcentaje de monocitos. El cruce de líneas en ambas gráficas es indicativo de la interacción entre los factores analizados. Nótese cómo en los animales PCD hubo fluctuaciones a lo largo del tiempo, mientras que los animales silvestres mostraron un porcentaje de linfocitos T y de monocitos relativamente constante durante todo el periodo estudiado. Los datos vienen dados como la media  $\pm$  ESM. WT, wild-type.

<sup>23</sup> Para la interacción entre dos factores en pruebas como la usada en este estudio se recomienda incrementar el nivel de significación a 0,1, dada la relevancia de dicha interacción en un análisis estadístico. De esta manera, aunque la prueba resulte más laxa, se asegura una mayor sensibilidad de detección de este efecto matemático.

## Análisis fenotípico de los leucocitos a nivel periférico

Finalmente, quisimos explorar si los leucocitos a nivel periférico presentaban alteraciones fenotípicas durante la degeneración de las células de Purkinje. Para ello, se evaluó el porcentaje de varias poblaciones esplénicas por citometría de flujo, además de la MFI de varios marcadores linfoides y mieloides (ver Material y Métodos). Las células analizadas se obtuvieron de los bazos de ratones silvestres y PCD a P15, P20, P30 y P40. Dada la gran cantidad de datos obtenidos en este experimento y para facilitar su comprensión, solo se mostrarán los resultados significativos, que además se ciñen al **linaje mieloide** (células CD11b<sup>+</sup>). En consecuencia, todos los porcentajes se proporcionarán con respecto a la población de células CD11b<sup>+</sup>.

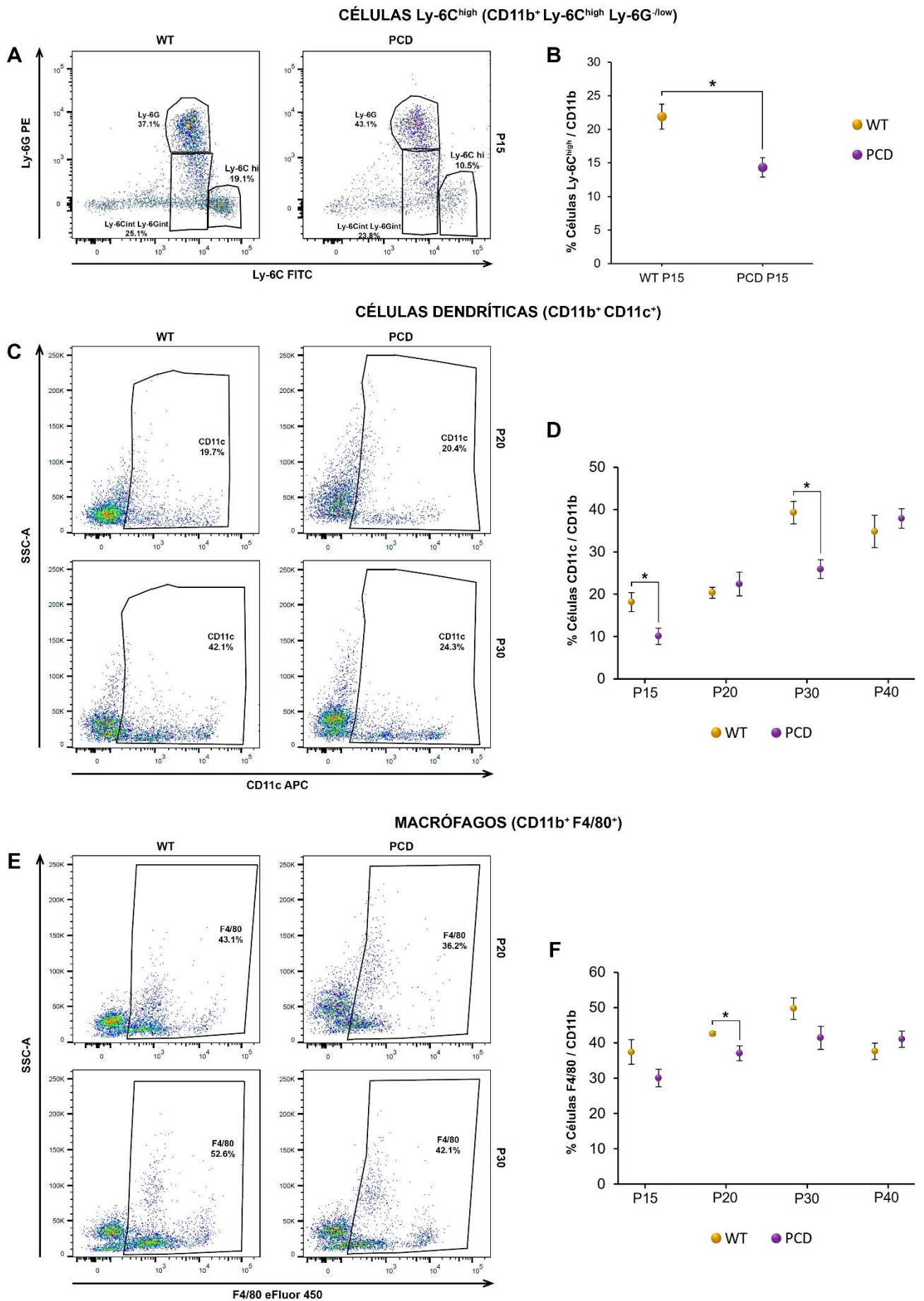
Por un lado, encontramos un menor porcentaje de varios subconjuntos mieloides. Por ejemplo, una población mieloide específica, conocida como **Ly-6C<sup>high</sup>** (CD11b<sup>+</sup> Ly-6G<sup>-/low</sup> Ly-6C<sup>high</sup>), presentó una reducción significativa en los ratones PCD a P15 ( $p = 0,015$ ; Fig. 27A y B), antes de que la muerte neuronal hubiese comenzado. Curiosamente, no se detectaron diferencias en las otras edades estudiadas, por lo que el porcentaje de células Ly-6C<sup>high</sup> podría servir como un indicador temprano de la degeneración cerebelosa en los ratones PCD. Asimismo, el porcentaje de **células dendríticas** (CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup>) y de **macrófagos** (CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup>) también se redujo en los animales PCD. En el caso de las células dendríticas, la reducción fue estadísticamente significativa a P15 ( $p = 0,034$ ) y a P30 ( $p = 0,011$ ; Fig. 27C y D), mientras que los macrófagos presentaron una reducción generalizada desde P15 hasta P30, aunque solo fue estadísticamente significativa a P20 ( $p = 0,033$ ; Fig. 27E y F).



Figura 27

**Figura 27** (página siguiente). Análisis por citometría de flujo del porcentaje de diferentes subpoblaciones mieloides en el bazo de ratones silvestres y PCD. **A, C, E:** Diagramas de dispersión representativos que muestran el contenido de células Ly-6C<sup>high</sup> (A), células dendríticas (C), y macrófagos (E) dentro de la población mieloide. **B, D, F:** Gráficas que muestran el porcentaje de células Ly-6C<sup>high</sup> (B), células dendríticas (D) y macrófagos (F) dentro de la población mieloide. Nótese que los ratones PCD presentaron una reducción global en el porcentaje de todas estas poblaciones mieloides en distintos momentos del proceso degenerativo cerebeloso. Los datos vienen dados como la media  $\pm$  ESM. \* $p < 0,05$ . WT, wild-type.





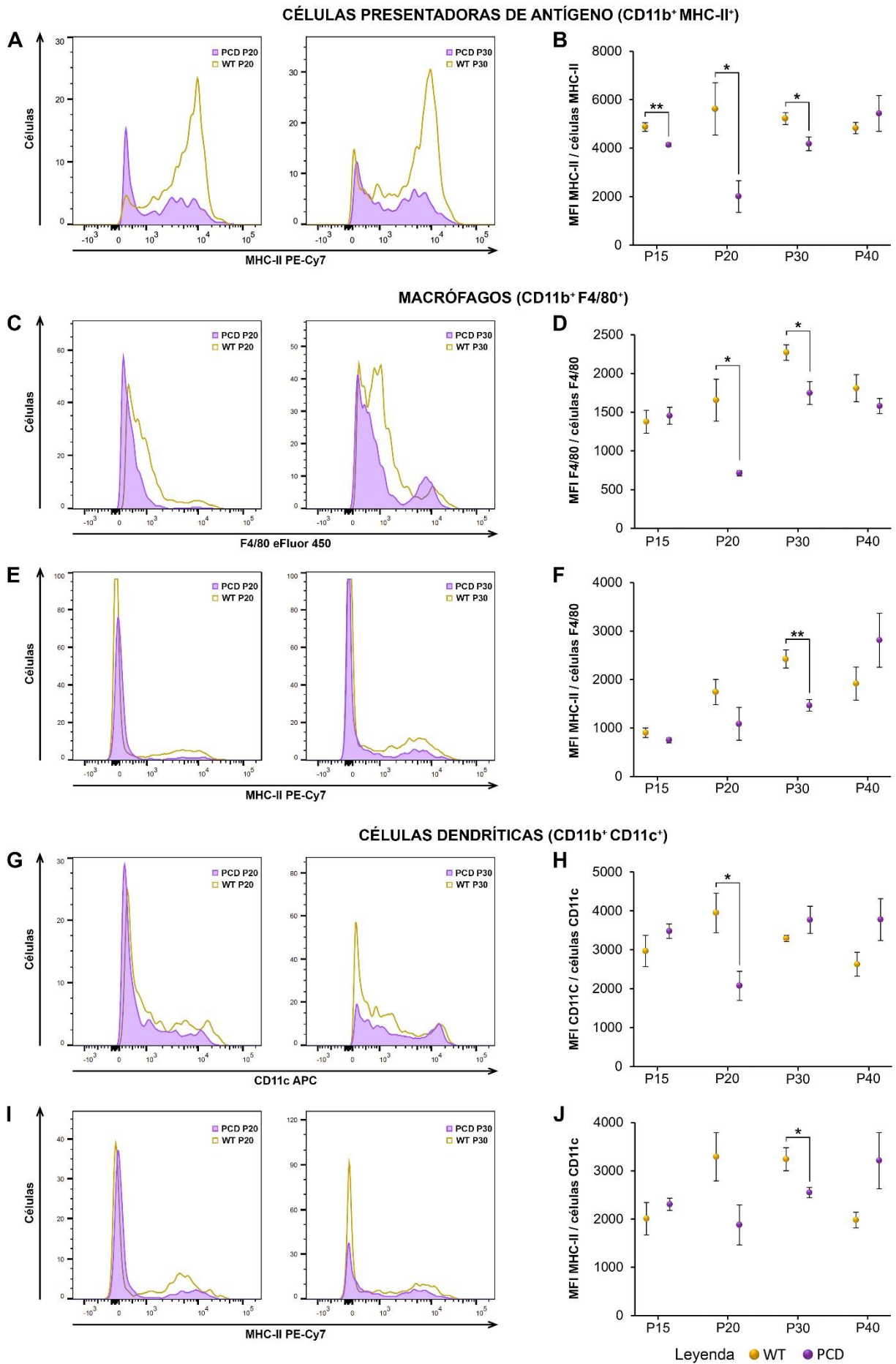
Por otro lado, se observó una disminución general de la MFI de marcadores mieloides relacionados con la presentación antigénica (MHC-II) y con la madurez funcional (F4/80 y CD11c) en los animales PCD respecto a los silvestres. De este modo, las **células presentadoras de antígeno** (CD11b<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup>) mostraron una expresión reducida en su superficie de MHC-II en los ratones PCD desde P15 hasta P30 ( $p = 0,009$  a P15,  $p = 0,048$  a P20,  $p = 0,045$  a P30; Fig. 28A y B). Además, los **macrófagos** también expresaron menos F4/80 y menos MHC-II en su superficie. Más concretamente, dicha reducción fue estadísticamente significativa a P20 ( $p = 0,033$ ) y P30 ( $p = 0,042$ ) para F4/80 (Fig. 28C y D), y a P30 para MHC-II ( $p = 0,006$ ; Fig. 28E y F). También se detectó un descenso significativo de la MFI tanto de CD11c como MHC-II en las **células dendríticas** a P20 ( $p = 0,040$ ) y P30 ( $p = 0,032$ ), respectivamente (Fig. 28G-J).

En conjunto, todos estos datos reflejan alteraciones en el linaje mieloides durante la degeneración de las células de Purkinje o incluso antes, observándose una reducción generalizada tanto en el porcentaje como en la MFI de varias poblaciones y marcadores mieloides, respectivamente.



Figura 28

**Figura 28** (página siguiente). Análisis por citometría de flujo de la MFI de diferentes marcadores mieloides en el bazo de ratones silvestres y PCD. La MFI refleja el nivel de expresión del marcador correspondiente en la superficie celular. **A, C, E, G, I:** histogramas representativos que muestran la distribución de la intensidad de fluorescencia de varios marcadores mieloides: MHC-II respecto a las células presentadoras de antígeno (A), F4/80 y MHC-II respecto a los macrófagos (C y E), y CD11c y MHC-II respecto a las células dendríticas (G e I). **B, D, F, H, J:** gráficas que muestran la MFI de los marcadores y las poblaciones descritas en A, C, E, G, I. Nótese que las células mieloides de los ratones PCD exhibieron una reducción generalizada de la MFI de diversos marcadores mieloides en distintos momentos del proceso degenerativo cerebeloso. Los datos están expresados como la media  $\pm$  ESM. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . WT, wild-type.



## TERAPIA CELULAR CON CÉLULAS MESENQUIMALES HUMANAS

El primer tipo celular empleado en esta Tesis Doctoral fueron las hMSCs, que se trasplantaron con el fin de paliar los procesos neurodegenerativos del ratón PCD y la inflamación subyacente. A continuación, se detallarán los resultados obtenidos en relación con el marcaje y trasplante de las hMSCs.

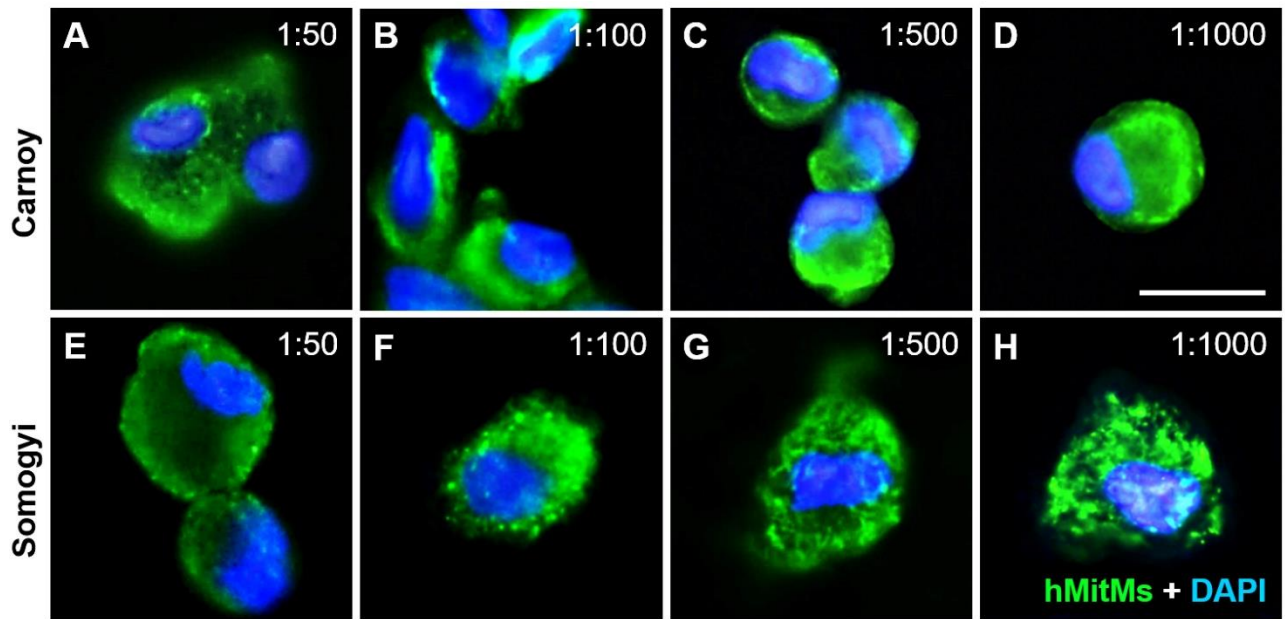
### Inmunomarcaje de células mesenquimales humanas

Antes de trasplantar las hMSCs y analizarlas en el tejido de los animales receptores, quisimos poner a punto su detección inmunohistoquímica. Para ello, se utilizaron dos anticuerpos que marcan específicamente mitocondrias humanas (ver Tabla 4 en Material y Métodos), a distintas diluciones: 1:50, 1:100, 1:500 o 1:1.000. Además, se emplearon dos fijadores diferentes: el fijador de Carnoy y el fijador de Somogyi. El fijador de Carnoy se utiliza rutinariamente en el Hospital Universitario de Salamanca para fijar y conservar las hMSCs. Este fijador tiene un pH bastante bajo por su contenido en ácido acético, y preserva la integridad de frotis hematológicos y cultivos celulares de manera óptima. Por otra parte, el fijador de Somogyi se emplea comúnmente para fijar tejido animal en nuestro laboratorio y preserva mejor la antigenicidad de muchos epítomos. Se han empleado los dos, separadamente, para compararlos y decidir cuál de ellos es el que pone de manifiesto la proteína buscada de manera más óptima en suspensión celular, para luego usarlo en el tejido de los animales trasplantados.

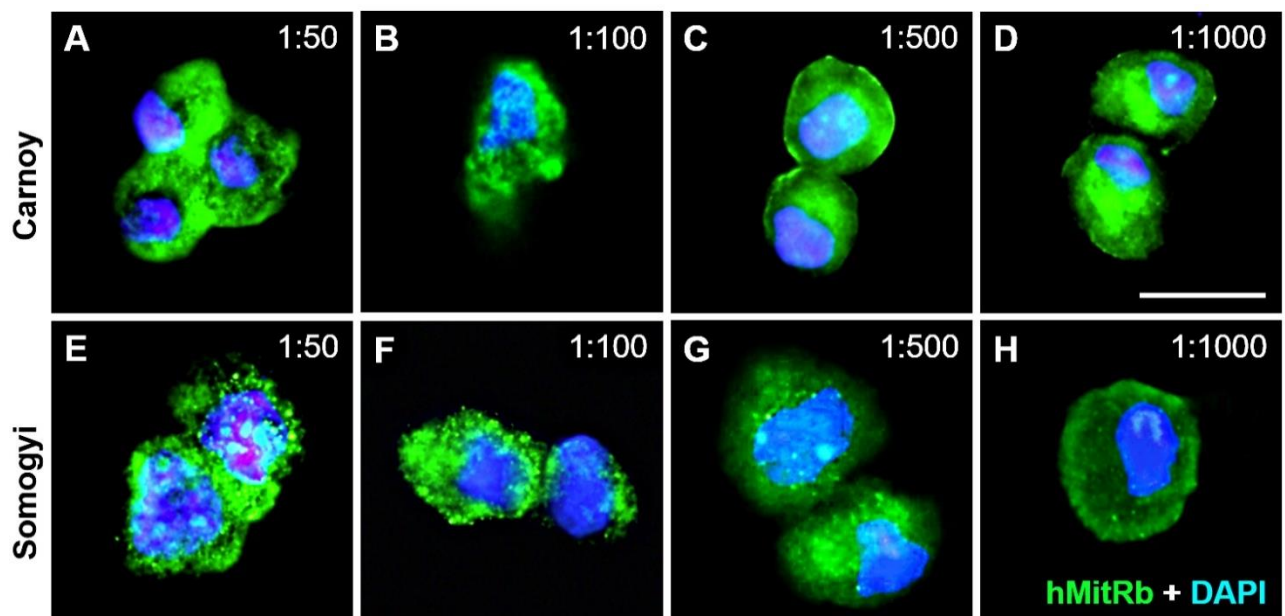
Los resultados relacionados con el anticuerpo monoclonal de ratón se pueden visualizar en la Figura 29. Se puede apreciar que las células se marcaron con todas las diluciones empleadas y con ambos fijadores. En este caso, el marcaje más nítido se logró para las diluciones mayores (1:500 y 1:1.000) y utilizando el fijador de Somogyi, distinguiéndose el patrón punteado característico del marcaje de mitocondrias (Martinez-Outschoorn *et al.*, 2012), que sería el óptimo tal y como aparece indicado por la casa comercial (MAB1273, Millipore).

Por otro lado, los resultados obtenidos para el anticuerpo policlonal de conejo se pueden observar en la Figura 30. Al igual que en el caso anterior, las hMSCs se marcaron en todas las condiciones. En este caso, el marcaje más nítido se logró para las diluciones 1:50 y 1:100 y cuando las células se fijaron con Somogyi, manifestándose un patrón punteado por todo el citoplasma.

El hecho de que con el fijador de Carnoy el marcaje fuese más difuso demuestra que, al menos en este caso, el fijador de Somogyi conservó mejor la estructura subcelular. Por ello, se decidió utilizar este fijador para perfundir a los ratones trasplantados y detectar las hMSCs en su tejido.



**Figura 29.** Inmunomarcaje de hMSCs con el anticuerpo monoclonal de ratón contra mitocondrias humanas (hMitMs; verde). Los núcleos se contratiñeron con DAPI (azul). El fijador utilizado fue Carnoy (A-D) o Somogyi (E-H). La dilución utilizada fue 1:50 (A y E), 1:100 (B y F), 1:500 (C y G) o 1:1.000 (D y H). Barra de escala: 25  $\mu$ m.



**Figura 30.** Inmunomarcaje de hMSCs con el anticuerpo policlonal de conejo contra mitocondrias humanas (hMitRb; verde). Los núcleos se contratiñeron con DAPI (azul). El fijador utilizado fue Carnoy (A-D) o Somogyi (E-H). La dilución utilizada fue 1:50 (A y E), 1:100 (B y F), 1:500 (C y G) o 1:1.000 (D y H). Barra de escala: 25  $\mu$ m.

## **Análisis de la integración de las células mesenquimales humanas en el tejido de los animales receptores**

Una vez comprobado que los anticuerpos permitían un buen inmunomarcaje de las hMSCs, se procedió a realizar su trasplante y analizar su llegada al cerebelo. Las hMSCs se trasplantaron de forma intravenosa a través de una de las venas laterales de la cola en 5 ratones silvestres y 5 ratones PCD a P20. Se escogió esa edad porque la degeneración de las células de Purkinje ya ha comenzado, pero no está muy avanzada (Mullen *et al.*, 1976), hecho que puede favorecer la migración de las células trasplantadas hacia el cerebelo (Johansson *et al.*, 2008; Recio *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2012a). Puesto que se desconoce cómo es la migración y la posible integración de las hMSCs en los ratones PCD, se decidió analizar su llegada a las 24 horas de ser trasplantadas. Para ello, los animales se perfundieron para posteriormente identificar las hMSCs mediante la técnica de inmunofluorescencia previamente optimizada.

Desafortunadamente, no conseguimos detectar las hMSCs en el tejido analizado de los animales receptores: ni en el cerebelo, ni tampoco en el hígado o el pulmón, órganos en los cuales se ha descrito que las células trasplantadas intravenosamente se pueden quedar estancadas en gran medida (Kraitchman *et al.*, 2005; Eggenhofer *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015; Leibacher y Henschler, 2016; Zheng *et al.*, 2016; Salvadori *et al.*, 2019). Se probaron varios métodos de recuperación antigénica, así como variaciones en la concentración del suero, del detergente o del propio anticuerpo, e incluso reduciendo tanto el porcentaje del fijador como el tiempo de fijación, pero en ningún caso logramos detectar las hMSCs.

## **TERAPIA CELULAR CON CÉLULAS MIELOIDES INMADURAS MONOCÍTICAS**

Debido a los problemas encontrados con la inmunodetección de las hMSCs, decidimos dedicarnos completamente al estudio del segundo tipo celular, las IMCs. A continuación, se detallarán los resultados obtenidos en relación a su caracterización y su trasplante.

### **Caracterización de las células mieloides inmaduras monocíticas**

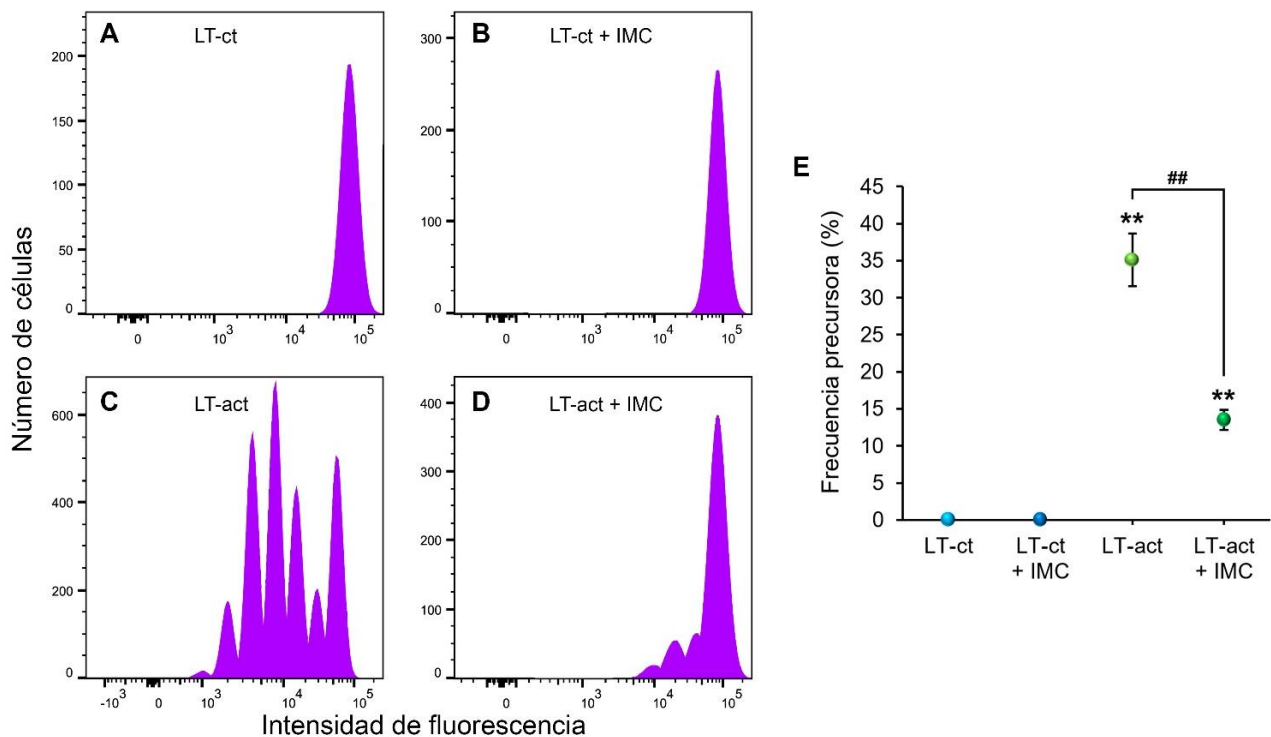
El hecho de que para este trabajo se hayan aislado las células de la médula ósea de ratones silvestres (sanos) implica que no se trate de verdaderas MDSCs, sino de IMCs (ver Introducción y Discusión). Por lo tanto, lo primero que tuvimos que hacer fue caracterizarlas para averiguar si se comportan como MDSCs ante condiciones patológicas, es decir, si son capaces de adquirir propiedades inmunosupresoras y, en caso afirmativo, proceder a trasplantarlas.

Para llevar a cabo la caracterización, se cultivaron las IMCs tanto con linfocitos T sin activar (control) como activados, y se comprobó si las primeras eran capaces de suprimir la proliferación y/o inducir la apoptosis de los últimos (ver Material y Métodos). Tras dos días de cocultivo se recogieron las células y se evaluaron dos pruebas funcionales distintas por citometría de flujo: la proliferación y el ciclo celular.

### **Análisis de la proliferación celular**

Una prueba importante para evaluar la función celular consiste en analizar la capacidad proliferativa de las células bajo diferentes condiciones. Para evaluar la proliferación, los linfocitos T se marcaron con el fluorocromo Tag-it Violet, cuya intensidad de fluorescencia es inversamente proporcional al porcentaje de células divididas (ver Material y Métodos). La variable empleada para hacer las comparaciones entre grupos fue la “frecuencia precursora”, que representa la fracción de células al inicio del cultivo que han sufrido al menos una división. Es decir, indicaría la proporción de linfocitos T que han respondido al estímulo proliferando. Esta variable refleja las propiedades biológicas intrínsecas de las células, ya que no depende del número de células que proliferan ni del tiempo de cultivo (Roederer, 2011).

Cuando los linfocitos T control se cultivaron solos o junto con IMCs no proliferaron (Fig. 31A y B). En cambio, los linfocitos T activados se dividieron considerablemente (Fig. 31C). Sin embargo, cuando los linfocitos T activados se cultivaron con las IMCs, el porcentaje de células divididas disminuyó en gran medida (Fig. 31D). Ciñéndonos al análisis estadístico en relación a los linfocitos T activados, se puede comprobar cómo la frecuencia precursora se redujo considerablemente cuando se cultivaron con IMCs ( $p < 0,001$ ; Fig. 31E). Por tanto, podemos afirmar que las IMCs fueron capaces de suprimir la proliferación de los linfocitos T.



**Figura 31.** Análisis de la proliferación de los linfocitos T tras su cultivo en solitario o junto con IMCs. **A-D)** Histogramas representativos del análisis por citometría de flujo en el caso del cultivo de linfocitos T control solos (A), linfocitos T control más IMCs (B), linfocitos T activados solos (C) y linfocitos T activados más IMCs (D). **E)** Gráfica que muestra la frecuencia precursora para las cuatro condiciones mencionadas en A-D. Como puede observarse, el cultivo con IMCs redujo la proliferación de los linfocitos T activados. Los datos vienen dados como la media  $\pm$  ESM.  $**p < 0,01$ , respecto al grupo de linfocitos T control solos;  $##p < 0,01$ , efecto de las IMCs sobre los linfocitos T activados. LT-ct, linfocitos T control; LT-act, linfocitos T activados.

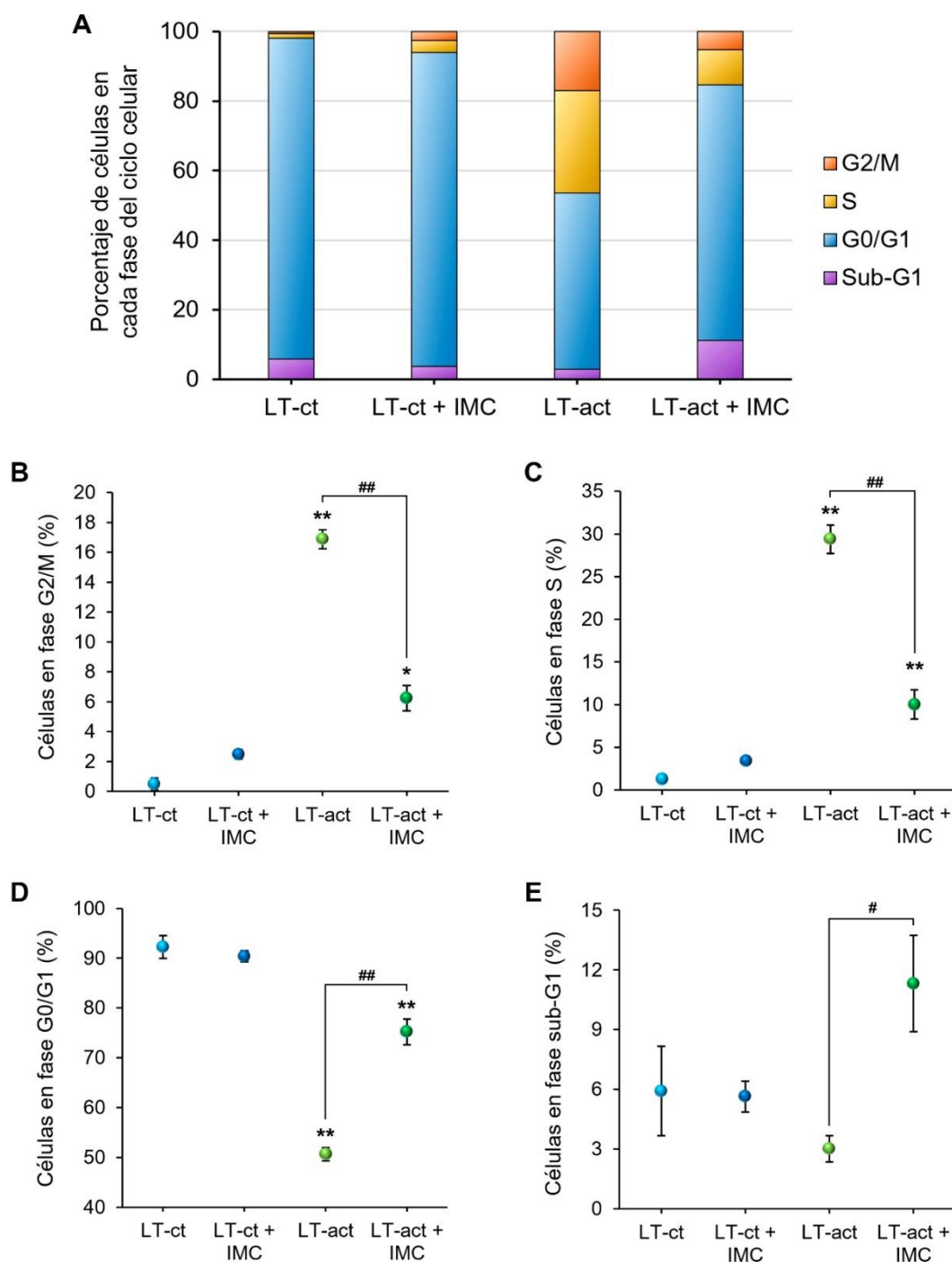
### Análisis del ciclo celular

Para evaluar la fase del ciclo celular en la que se encontraban las células, su DNA se marcó con yoduro de propidio. En la siguiente imagen se puede apreciar un resumen de estos resultados (Fig. 32A), así como su análisis estadístico (Fig. 32B-E). En ambos grupos con linfocitos T control, la fase G0/G1 fue muy predominante, indicando que virtualmente no hubo proliferación. En cambio, en el grupo de linfocitos T activados solos, el porcentaje de células en fase G0/G1 disminuyó, a la par que aumentó el porcentaje de células en fase S y en fase G2/M, indicando que hubo proliferación. Finalmente, cuando los linfocitos T activados se cultivaron con las IMCs, disminuyó la proporción tanto de la fase S como de la fase G2/M, lo que indica una reducción de la proliferación de los linfocitos T. Hasta aquí, toda la información corrobora los resultados del análisis de la proliferación celular.

Además, lo interesante de analizar el ciclo celular es que podemos identificar las células en apoptosis (fase sub-G1). De este modo, se pudo observar un incremento en la fase sub-G1 de los



linfocitos T activados cuando se cultivaron con IMCs ( $p = 0,031$ ; Fig. 32E). Este hecho apunta a que las IMCs indujeron la apoptosis de los linfocitos T activados.

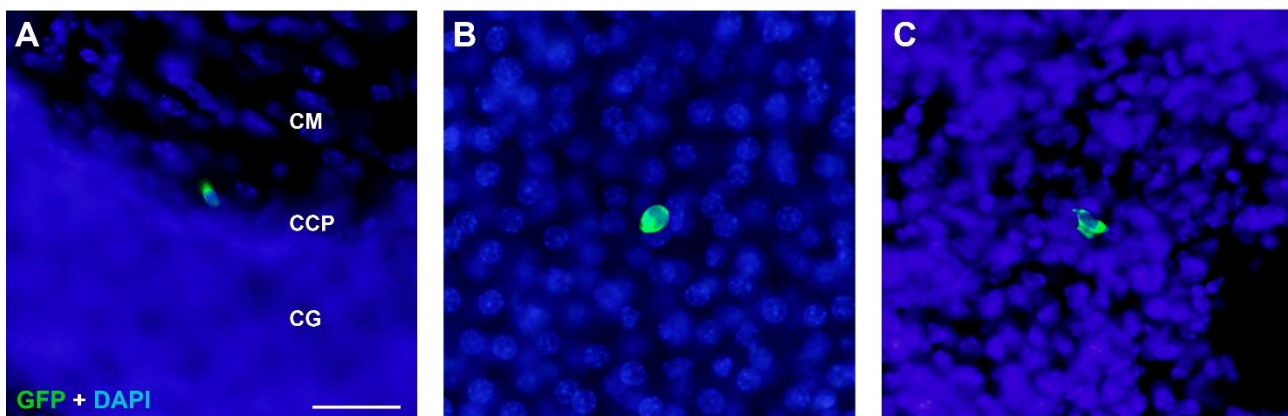


**Figura 32.** Análisis del ciclo celular de los linfocitos T tras su cultivo en solitario o junto con IMCs. **A)** Gráfica de barras que representa el porcentaje de los linfocitos T en cada fase del ciclo celular en cada uno de los grupos experimentales. **B-E)** Gráficas que muestran la información representada en A por separado: fase G2/M (B), fase S (C), fase G0/G1 (D) y fase sub-G1 (E). Puede apreciarse como las IMCs no solo redujeron la proliferación de los linfocitos T activados, sino que también indujeron su apoptosis. Los datos vienen dados como la media  $\pm$  ESM.  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ , respecto al grupo de linfocitos T control solos;  $\#p < 0,05$ ,  $\#\#p < 0,01$ , efecto de las IMCs sobre los linfocitos T activados. LT-ct, linfocitos T control; LT-act, linfocitos T activados.

## Análisis de la integración de las células mieloides inmaduras monocíticas tras su trasplante intravenoso

Después de comprobar las propiedades inmunosupresoras de las IMCs, se procedió a trasplantarlas. Primero, se extrajo la médula ósea de ratones GFP. Después, se aislaron las IMCs por citometría de flujo y se trasplantaron en ratones PCD a P20, cuando la degeneración de las células de Purkinje ya ha comenzado. El trasplante se realizó en 3 ratones PCD a través de la vena lateral de la cola y en otros 3 ratones PCD por vía retroorbital.

La presencia de células GFP<sup>+</sup> se analizó en el cerebelo a las 24 horas tras su trasplante para comprobar su llegada, al igual que con las hMSCs. Desafortunadamente, solo se encontraron dos células GFP<sup>+</sup> en todas las secciones examinadas (Fig. 33A). En este caso, también analizamos los hígados y los pulmones de estos ratones y, en ambos tejidos, se encontraron numerosas células GFP<sup>+</sup>, especialmente en los pulmones, tal y como se ha descrito por varios estudios (Kraitchman *et al.*, 2005; Eggenhofer *et al.*, 2012; Leibacher y Henschler, 2016; Fig. 33B y C).



**Figura 33.** Identificación de las IMCs derivadas del trasplante intravenoso en los animales receptores. **A-C)** Inmunomarcado de células GFP<sup>+</sup> (verde) en secciones de cerebelo (A), hígado (B) o pulmón (C). Los núcleos se contratiñeron con DAPI (azul). CCP, capa de las células de Purkinje; CG, capa de los granos; CM, capa molecular. Barra de escala: 25  $\mu$ m.

Teniendo en cuenta esta escasa llegada de células al tejido de interés, nos planteamos inyectar las IMCs directamente en el cerebelo.

## Evaluación de la inyección intracerebelosa de las células mieloides inmaduras monocíticas

Para inyectar las IMCs directamente en el cerebelo se practicó una cirugía estereotáctica en 16 ratones PCD. A 8 de ellos se les inyectaron 130.000 IMCs en el lóbulo IV-V, mientras que a los otros 8 solo se les administró el vehículo (PBS) en el mismo lóbulo (ratones Sham). Además, para

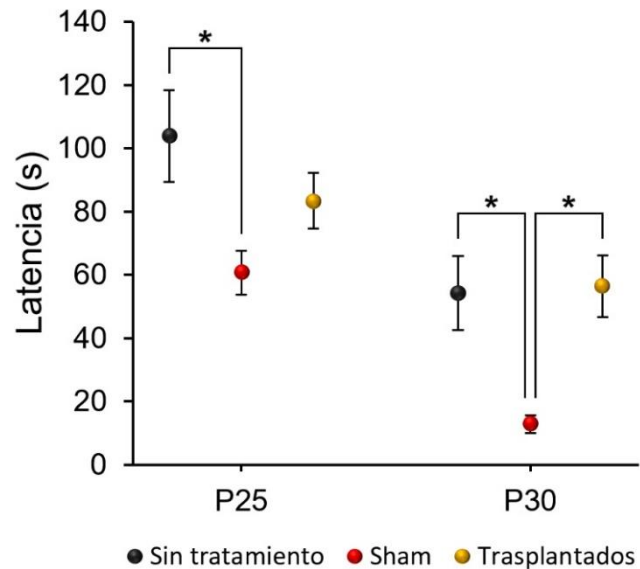
estudiar los posibles efectos tanto del trasplante como de la propia cirugía se emplearon otros 8 animales PCD a los que no se les aplicó ningún tratamiento, es decir, no fueron operados. Los ratones se trasplantaron a P20 y se analizó su comportamiento motor a P25 y a P30, tras lo que se perfundieron (también a P30) para analizar sus cerebelos. En particular, se exploró la presencia de células GFP<sup>+</sup>, la supervivencia de las células de Purkinje y la densidad de células apoptóticas. En este caso, el procesamiento histológico se realizó más tarde porque con este método de trasplante la llegada de células al cerebelo estaba asegurada.

### Análisis del comportamiento motor

La capacidad motora de los animales se evaluó con el test de RotaRod (ver Material y Métodos). Tras realizar el test ANOVA de dos factores se detectaron diferencias tanto entre grupos experimentales ( $p = 0,001$ ) como entre edades ( $p < 0,001$ ), sin que hubiese interacción entre ambos factores ( $p = 0,456$ ). En lo que respecta a la edad, todos los grupos mostraron una peor coordinación motora a P30 como resultado del avance de la degeneración cerebelosa. Sin embargo, los datos más interesantes se hallaron tras comparar los distintos grupos experimentales entre sí para cada edad. Así, en la gráfica de la derecha se puede observar cómo los animales Sham exhibieron un peor comportamiento, tanto a P25 ( $p = 0,046$ ) como a P30 ( $p = 0,029$ ), respecto a los ratones PCD sin tratamiento (Fig. 34). Este hecho no se observó en los animales trasplantados con IMCs ( $p = 0,494$  a P25 y  $p = 1,000$  a P30; Fig. 34), que exhibieron un comportamiento similar al de los animales sin tratamiento. Es más, a P30 los animales trasplantados también mostraron diferencias respecto a los animales Sham ( $p = 0,016$ ). Todo ello indica que el trasplante intracerebeloso de IMCs, aunque no mejoró la habilidad motora de los animales PCD, sí redujo el efecto dañino de la cirugía estereotáctica.

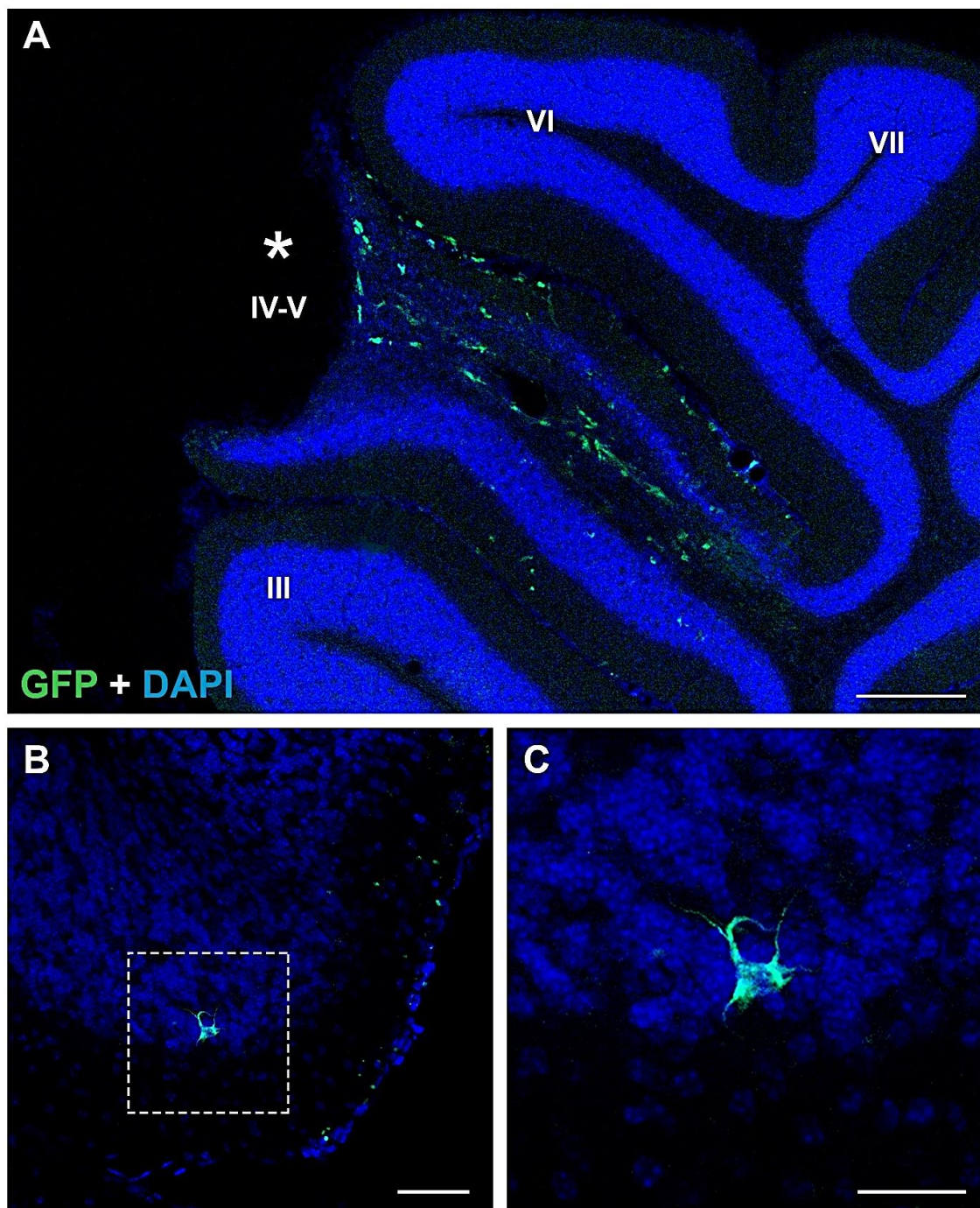
### Análisis histológico

El siguiente paso consistió en analizar la integración de las células derivadas del trasplante en el cerebelo de los animales receptores. Se pudieron observar células GFP<sup>+</sup> principalmente en el lóbulo



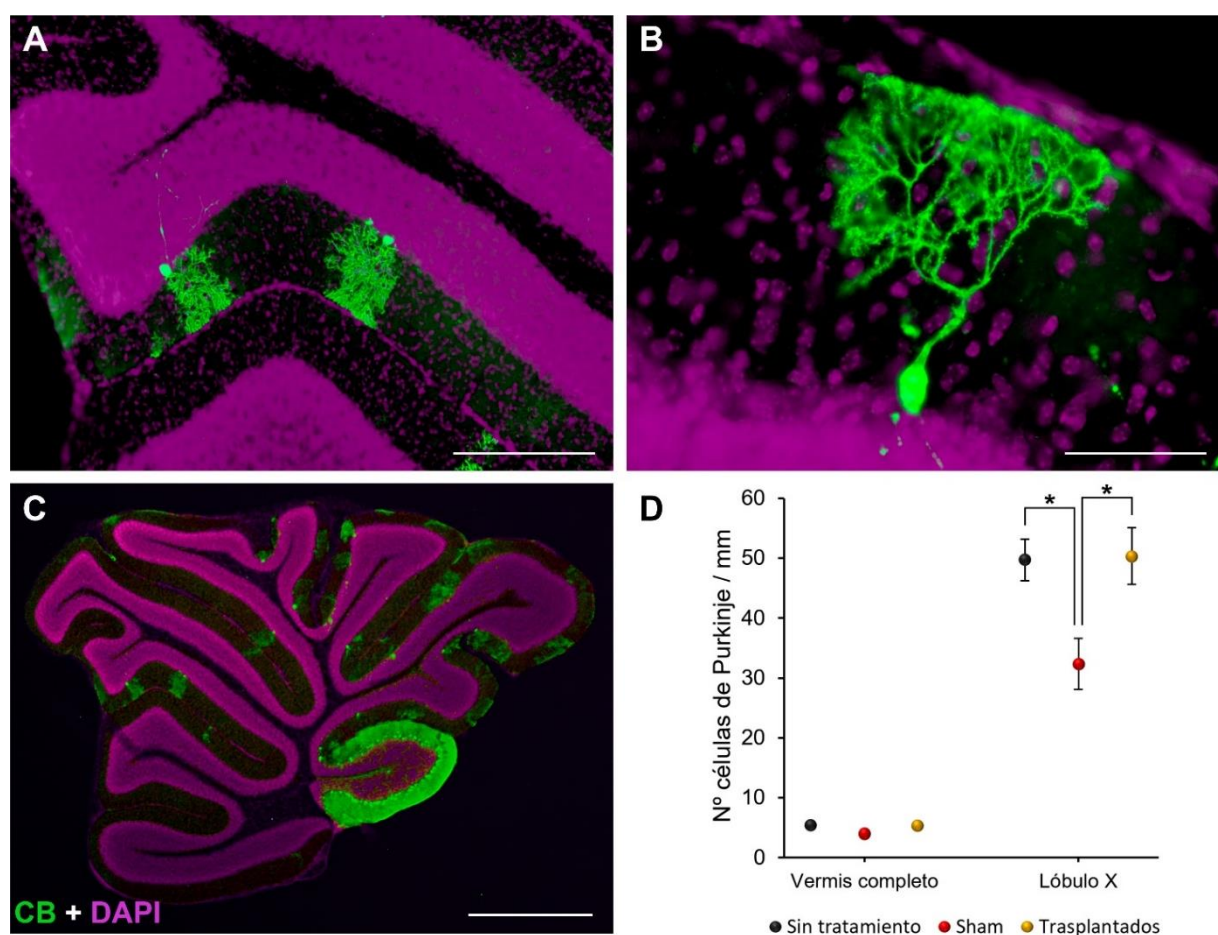
**Figura 34.** Análisis del comportamiento motor de los ratones PCD sin tratamiento, Sham y trasplantados con IMCs. Se evaluó la latencia a la caída. Nótese cómo los animales Sham mostraron un empeoramiento general en su coordinación motora, que se evitó al trasplantar IMCs. Los resultados vienen dados como la media  $\pm$  ESM. \* $p < 0,05$ .

IV-V donde se practicó la inyección; dichas células, por lo general, presentaron una morfología redondeada (Fig. 35A). También se pudieron advertir algunas células más alejadas, de forma más aislada y con algunas ramificaciones (Fig. 35B y C).



**Figura 35.** Identificación de las IMCs trasplantadas mediante cirugía estereotáctica en el cerebelo de los animales receptores. **A)** Inmunomarcaje de IMCs GFP<sup>+</sup> (verde) en el cerebelo de un ratón PCD trasplantado; nótese cómo las células trasplantadas se sitúan principalmente en el lóbulo IV-V, el que recibió la inyección (asterisco). **B)** Inmunomarcaje de una célula GFP<sup>+</sup> (verde) aislada y más alejada del sitio de la inyección. **C)** Amplificación de la zona enmarcada en (B); nótese la morfología ramificada de dicha célula. Los núcleos se contratiñeron con DAPI (azul). Barra de escala: 200  $\mu$ m (A), 50  $\mu$ m (B), 25  $\mu$ m (C).

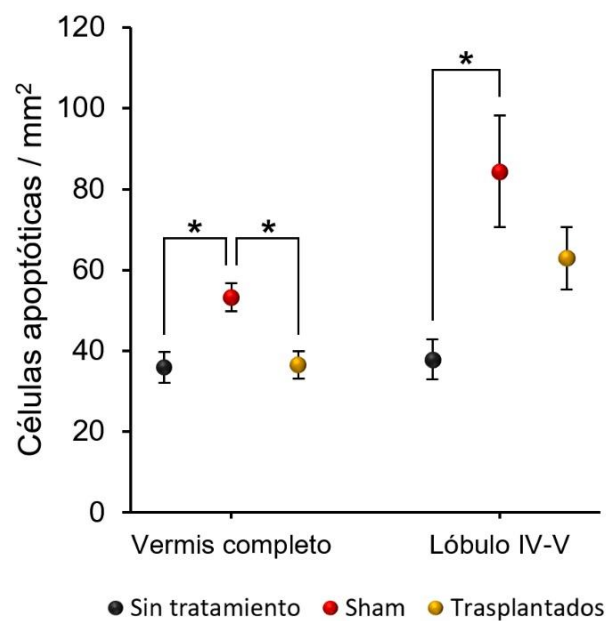
A continuación, comprobamos un posible efecto neuroprotector del trasplante analizando la supervivencia de las células de Purkinje, que es la principal población afectada en el cerebelo de los ratones PCD. Para ello, se emplearon anticuerpos contra calbindina, una proteína que en el cerebelo de roedores se detecta exclusivamente en estas células (Bastianelli, 2003; Fig. 36A-C). La densidad de células de Purkinje (nº de células / mm) se calculó, por un lado, respecto a todo el vermis y, por otro lado, respecto al lóbulo X, que es la región donde sobreviven la mayoría de las células de Purkinje a P30 (Wang y Morgan, 2007; Fig. 36C y D). Respecto a todo el vermis no se apreciaron diferencias entre los tres grupos experimentales, pero analizando el lóbulo X por separado, se detectó una mayor muerte de células de Purkinje en los animales Sham con respecto a los ratones PCD sin tratamiento ( $p = 0,038$ ) y a los ratones trasplantados ( $p = 0,031$ ; Fig. 36D). En cambio, no se detectaron diferencias entre los animales PCD sin tratamiento y los trasplantados ( $p = 1,000$ ; Fig. 36D).



**Figura 36.** Identificación y recuento de las células de Purkinje en el cerebelo de ratones PCD a P30. **A-C)** Inmunomarcaje de células de Purkinje positivas para calbindina (verde); los núcleos se contratiñeron con DAPI (morado). Nótese cómo a P30 las células de Purkinje supervivientes se localizan fundamentalmente en el lóbulo X (C). **D)** Gráfica que muestra el recuento de las células de Purkinje tanto en el vermis completo como solo en el lóbulo X. Nótese la reducción significativa en la densidad de células de Purkinje en el lóbulo X de los animales Sham, así como el efecto neuroprotector del trasplante intracerebeloso de IMCs. Los resultados vienen dados como la media  $\pm$  ESM.  $*p < 0,05$ . CB, calbindina. Barra de escala: 200  $\mu$ m (A), 50  $\mu$ m (B) y 1 mm (C).

Aunque no se apreció una mayor supervivencia de células de Purkinje en los animales trasplantados, estos datos vuelven a poner de manifiesto que el trasplante de IMCs parece reducir los efectos adversos provocados por la cirugía estereotáctica, incluso en una región alejada del trasplante como es el lóbulo X.

Finalmente, realizamos un análisis de apoptosis, para lo cual se empleó la técnica TUNEL (ver Material y Métodos), que permite marcar roturas en la cadena de DNA que se generan durante el proceso de muerte celular programada. En este caso se determinó la densidad de células apoptóticas ( $n^{\circ}$  células /  $mm^2$ ) respecto al vermis completo y, por otro lado, respecto al lóbulo IV-V, lugar en el que se practicó la inyección celular. Teniendo en cuenta todo el vermis, los animales Sham mostraron más células en apoptosis respecto a los animales sin tratamiento ( $p = 0,014$ ) y a los animales trasplantados ( $p = 0,018$ ; Fig. 37). En cambio, no se hallaron diferencias entre los animales sin tratamiento y los trasplantados ( $p = 1,000$ ; Fig. 37). En cuanto al lóbulo IV-V, también se encontraron diferencias entre los animales Sham y los animales sin tratamiento ( $p = 0,015$ ; Fig. 37). Sin embargo, en este caso los ratones trasplantados estuvieron en un nivel intermedio entre los animales sin tratamiento y Sham, no detectándose diferencias estadísticamente significativas con ninguno de ellos (Fig. 37). Estos resultados sugieren que la cirugía estereotáctica induce una mayor muerte de células por apoptosis y ponen en evidencia que el trasplante de IMCs reduce, al menos parcialmente, estos eventos de muerte celular programada.



**Figura 37.** Análisis de la densidad de células apoptóticas en los animales PCD sin tratamiento, Sham y trasplantados con IMCs. Nótese la mayor densidad de células apoptóticas en los animales Sham, así como el efecto protector del trasplante intracerebeloso de IMCs. Los resultados vienen dados como la media  $\pm$  ESM. \* $p < 0,05$ .

*“En la vida no hay cosas  
que temer, solo hay cosas  
que comprender.”*

*Marie Curie*

## **DISCUSIÓN**





## LA MUERTE SELECTIVA DE LAS CÉLULAS DE PURKINJE INDUCE ALTERACIONES LEUCOCITARIAS ESPECÍFICAS

El primer objetivo de esta Tesis Doctoral consistió en investigar cómo la neurodegeneración selectiva en el SNC y su inflamación asociada influyen sobre las células del sistema inmunitario periférico. Para ello, analizamos la presencia y la distribución de los leucocitos en el SNC de ratones silvestres y PCD, además de su fenotipo a nivel periférico (bazo). Asimismo, se emplearon dos modelos de daño cerebral generalizado, uno inducido por un agente físico (radiación gamma) y el otro por un agente biológico (LPS), con el objetivo de comparar la inflamación de los ratones PCD (debida a la muerte neuronal selectiva) con otros escenarios neuroinflamatorios estandarizados.

### Alteraciones leucocitarias en el sistema nervioso central en degeneración

En primer lugar, nuestra investigación puso de manifiesto la importancia de la gravedad de un proceso neurodegenerativo y su estado inflamatorio asociado sobre el reclutamiento de leucocitos hacia el SNC. Por un lado, no se encontraron diferencias en la cantidad de leucocitos entre el BO de animales silvestres y PCD, hecho que puede estar relacionado con el proceso degenerativo relativamente lento y la reacción glial moderada que ocurre en los animales mutantes (Baltanás *et al.*, 2013). En cambio, se detectó una cantidad mayor de leucocitos en el cerebelo de los ratones PCD en comparación con los animales silvestres, posiblemente debido a la gliosis reactiva exacerbada de los animales mutantes que, además, va acompañada por la apoptosis de oligodendrocitos (Baltanás *et al.*, 2013). Todo esto concuerda perfectamente con muchos estudios sobre diversas patologías neurodegenerativas, donde una mayor infiltración de leucocitos (linfocitos T y/o monocitos) se correlaciona con una inflamación más intensa y con un daño nervioso mayor (Brochard *et al.*, 2009; Frischer *et al.*, 2009; Ajami *et al.*, 2011; Browne *et al.*, 2013; Correale *et al.*, 2019; Williams *et al.*, 2020). Por otra parte, dejando de lado la neurodegeneración, en los animales silvestres observamos una mayor presencia de leucocitos en el cerebelo que en el BO, lo que demuestra la existencia de diferencias regionales en lo que respecta a la infiltración de leucocitos en el SNC. Quizá esto podría deberse a que el cerebelo está íntimamente ligado al plexo coroideo del cuarto ventrículo, que constituye una de las vías de entrada de células inmunitarias (Ransohoff *et al.*, 2015).

Tras profundizar nuestro estudio en el cerebelo, comprobamos que la muerte de las células de Purkinje en los ratones PCD indujo un efecto atrayente específico sobre los leucocitos, que se dirigieron preferentemente hacia las capas cerebelosas donde se hallan las dendritas y los somas de estas neuronas, es decir, la capa molecular y la capa de las células de Purkinje. Estos datos concuerdan con

la distribución adoptada por las células microgliales en la corteza cerebelosa de los ratones PCD a lo largo de su proceso degenerativo. Así, la microglía se encuentra principalmente en los estratos mencionados anteriormente, exhibiendo su morfología más reactiva en la capa de las células de Purkinje (Kyuhou *et al.*, 2006; Baltanás *et al.*, 2013). Por el contrario, un daño/inflamación más generalizado no alteró la distribución leucocitaria (en el caso de los animales irradiados), o incluso provocó un efecto opuesto (en el caso de los animales tratados con LPS). El hecho de que haya más leucocitos hacia las capas interiores de los animales tratados con LPS podría deberse a que dichas capas se encuentran más densamente pobladas por las células microgliales (Vela *et al.*, 1995), que constituyen la fuente principal de mediadores inflamatorios. Es decir, en este caso se trata de una inflamación generalizada y sin que se produzca una muerte neuronal evidente y selectiva (como es el caso de las células de Purkinje en los ratones PCD), de manera que la microglía no presenta una migración preferencial.

Sorprendentemente, a P20 se advirtió un aumento marcado en el número de leucocitos tanto en los ratones silvestres como en los PCD. Aunque dicho incremento se observó en ambos genotipos, no fue estadísticamente significativo en los animales PCD. Esta particularidad puede ser el resultado de una mayor infiltración general de leucocitos durante todo el periodo degenerativo (y especialmente relevante durante sus fases más acentuadas), la cual puede encubrir el aumento tan llamativo a P20 que acabamos de resaltar. Por lo tanto, este fenómeno no parece estar conectado con la neurodegeneración, sino que probablemente está asociado con procesos de neurodesarrollo postnatal. En efecto, alrededor de esta edad ocurre un fuerte proceso de remodelación sináptica en el cerebelo murino, que afecta tanto a las fibras musgosas como trepadoras (principales aferencias de la corteza cerebelosa), así como a las sinapsis que establecen las células de Purkinje con las fibras paralelas y otras interneuronas (van Welie *et al.*, 2011; White y Sillitoe, 2013; Kano *et al.*, 2018). Curiosamente, se ha descrito que los leucocitos están implicados en numerosas funciones durante el desarrollo del sistema nervioso (Tanabe y Yamashita, 2018). Específicamente, los linfocitos T promueven el establecimiento de sinapsis inhibitoras (Filiano *et al.*, 2016), las cuales son particularmente numerosas en el cerebelo (Beckinghausen y Sillitoe, 2019), a través de la acción de  $\text{INF-}\gamma$  (Filiano *et al.*, 2016). Además, también se han encontrado variaciones tanto histológicas como comportamentales en los ratones PCD alrededor de P20 (más precisamente a P22; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018). En concreto, los animales PCD mostraron un grosor de la dendrita primaria de las células de Purkinje menor y una conducta exploratoria inferior respecto a los ratones silvestres, antes y durante la degeneración de las células de Purkinje, excepto a esa edad (Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018), lo que podría ser el resultado de dicha remodelación sináptica.

Con respecto a los efectos de la radiación, la exposición cerebral a este fenómeno desencadena reacciones inflamatorias caracterizadas por una rápida activación endotelial y glial, la sobreexpresión de múltiples citocinas proinflamatorias y la ruptura de la barrera hematoencefálica (Moravan *et al.*, 2011; Sándor *et al.*, 2014; Lumniczky *et al.*, 2017). Como consecuencia, ocurre una mayor infiltración de células sanguíneas, específicamente en aquellas áreas expuestas directamente al haz de radiación (Burrell *et al.*, 2012; Morganti *et al.*, 2014; Moravan *et al.*, 2016). Por el contrario, nosotros encontramos un descenso significativo en la cantidad de leucocitos presentes en los ratones irradiados. Sin embargo, estos resultados aparentemente discrepantes se pueden explicar fácilmente si se consideran las diferencias en la metodología de la radiación. Mientras que en las investigaciones que demostraron una infiltración incrementada únicamente se irradió la cabeza de los sujetos de estudio, nosotros usamos radiación de cuerpo completo. Esta diferencia experimental tiene importantes repercusiones, ya que se ha demostrado que dosis de radiación similares a la usada en la presente Tesis Doctoral causan la apoptosis de las células sanguíneas, siendo los linfocitos la población más sensible (Bogdándi *et al.*, 2010). Por consiguiente, proponemos que la radiación indujo la apoptosis de las células inmunitarias en los ratones irradiados, causando el descenso observado de leucocitos presentes en el cerebelo. Es más, se ha descrito una recuperación parcial de las células sanguíneas 7 días tras la radiación (Bogdándi *et al.*, 2010) y, precisamente, en nuestro caso la reducción en el número de leucocitos fue menor a los 7 días que 1 día después de la radiación.

Por otro lado, el tratamiento con LPS nos permitió estudiar el grado de infiltración leucocitaria desde otro punto de vista. El LPS es un componente embebido en la membrana externa de la pared celular de bacterias gramnegativas (Fu *et al.*, 2014; Lopes, 2016). Una vez reconocido por el sistema inmunitario, el LPS desencadena una respuesta inflamatoria sistémica que incluye el SNC (Lopes, 2016). Por este motivo, se ha usado frecuentemente para generar modelos murinos de neuroinflamación (Catorce y Gevorkian, 2016; Zhao *et al.*, 2019). En concreto, se ha demostrado que la administración sistémica de LPS no solo induce la liberación de citocinas proinflamatorias en el SNC, tales como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y CCL-2 (Qin *et al.*, 2007; Cazareth *et al.*, 2014; Fu *et al.*, 2014; Catorce y Gevorkian, 2016; Lopes, 2016), sino que también facilita la apertura de la barrera hematoencefálica (Zhou *et al.*, 2014; Banks *et al.*, 2015; Varatharaj y Galea, 2017). En este sentido, el ambiente neurodegenerativo del cerebelo de los ratones PCD no pareció causar una ruptura significativa de la barrera hematoencefálica, considerando el ligero incremento en los leucocitos infiltrados en comparación con los animales tratados con LPS. Asimismo, hubo muy pocos monocitos infiltrados en el cerebelo de los ratones PCD, al menos durante las fases avanzadas de la degeneración cerebelosa. Este hecho apoya nuestra hipótesis, puesto que los monocitos infiltrados se observan únicamente

cuando la barrera hematoencefálica está alterada (Prinz *et al.*, 2017), y no bajo condiciones fisiológicas o situaciones neuropatológicas que no la afectan (Ajami *et al.*, 2007; Gómez-Perdiguerro *et al.*, 2015). Así, al contrario de lo que ocurre en los animales silvestres y PCD, en los ratones tratados con LPS aproximadamente la mitad de los leucocitos detectados en el cerebelo fueron monocitos, como resultado de la neuroinflamación inducida por este agente biológico (Cazareth *et al.*, 2014). Los animales irradiados también exhibieron un incremento significativo en el porcentaje de monocitos, lo que refleja una alteración de su barrera hematoencefálica como consecuencia de la exposición a la radiación (Moravan *et al.*, 2016; Prinz *et al.*, 2017), independientemente de la reducción general del número de leucocitos discutido en el párrafo anterior. Además, la exposición a radiación también induce la sobreexpresión de CCL-2, una quimiocina esencial para la infiltración de monocitos (Morganti *et al.*, 2014; Moravan *et al.*, 2016).

Por último, tras analizar la infiltración temporal de los linfocitos T y los monocitos, pudimos comprobar que en los animales silvestres –sin ningún tipo de degeneración– el porcentaje de ambos tipos celulares se mantiene constante a lo largo del tiempo. Por el contrario, la muerte neuronal de los ratones PCD provocó fluctuaciones evidentes tanto en los linfocitos T como en los monocitos. En ambos casos, dichas fluctuaciones parecieron estabilizarse hacia las fases finales de la neurodegeneración cerebelosa.

Con respecto a los linfocitos T, se han descrito alteraciones en su infiltración en varios modelos de neurodegeneración (Brochard *et al.*, 2009; Browne *et al.*, 2013; Evans *et al.*, 2013; Lopes Pinheiro *et al.*, 2016; Sommer *et al.*, 2017; Solleiro-Villavicencio y Rivas-Arancibia, 2018; Correale *et al.*, 2019; Williams *et al.*, 2020). Sin embargo, el papel de los linfocitos T infiltrados es muy heterogéneo, ya que su perfil fenotípico y funcional depende tanto del tipo como de la etapa de la enfermedad neurodegenerativa en cuestión (González y Pacheco, 2014; Sommer *et al.*, 2017). Además, existen diversos subtipos de linfocitos T implicados en la fisiopatología de estas enfermedades. Así, por ejemplo, los linfocitos T helper (Th) 1 y los Th17 parecen contribuir a la neuroinflamación, perpetuando los procesos neurodegenerativos, mientras que los linfocitos Th2 y Treg atenúan la respuesta neuroinflamatoria y promueven un ambiente neuroprotector (González y Pacheco, 2014; Solleiro-Villavicencio y Rivas-Arancibia, 2018). Por lo tanto, los efectos que pueden ejercer los linfocitos T llegan a ser diametralmente opuestos y, por ende, su respuesta conjunta resulta muy compleja. Dado que en el presente trabajo no se ha llevado a cabo una distinción entre las diferentes subpoblaciones, sino que se han marcado en su totalidad, la interpretación del comportamiento del conjunto de linfocitos T se vuelve extremadamente complicada. A ello hay que añadir que las posibles diferencias entre la infiltración cerebelosa de linfocitos T en ratones silvestres y PCD no se analizaron

estadísticamente debido a la interacción encontrada entre la edad y el genotipo. En todo caso, resulta evidente que el comportamiento de este tipo de leucocitos resulta afectado por la neurodegeneración cerebelosa. Para poder desentrañar las particularidades del comportamiento de las distintas subpoblaciones de linfocitos T en este contexto se necesitarían otros estudios más detallados.

En el caso de los monocitos se hizo patente un incremento a P15 y a P20 en los animales PCD respecto a los silvestres. Este hecho sugiere que, en caso de haber alguna alteración en la barrera hematoencefálica de los ratones PCD, esta ocurriría de forma transitoria en las etapas iniciales de la muerte de las células de Purkinje o incluso antes. Curiosamente, ya se había observado un suceso similar en el mismo modelo animal, pero en relación al ambiente neurodegenerativo del BO (Recio *et al.*, 2011). En este estudio se detectó un incremento en la integración de células Iba1<sup>+</sup> derivadas de la médula ósea (originadas de monocitos; Prinz *et al.*, 2017) en el BO de ratones PCD a P60 –cuando comienza la muerte de las células mitrales–, en comparación con animales silvestres. Sin embargo, dicho incremento desapareció en estadios de neurodegeneración más avanzados. Por tanto, aunque sería necesario una investigación detallada sobre la barrera hematoencefálica de los ratones PCD, parece que de presentar algún tipo de alteración en el cerebelo ocurriría de manera temprana y transitoria, puesto que la cantidad de monocitos disminuye rápidamente a P25. En relación con estos resultados, en pacientes con esclerosis lateral amiotrófica se ha detectado un menor número de monocitos en sangre periférica que parece corresponderse con el reclutamiento de estas células hacia el SNC, el cual precisamente se vuelve patente en la fase inicial de la enfermedad (Zondler *et al.*, 2016; Baufeld *et al.*, 2018). Dicha invasión monocítica podría desempeñar una función protectora, al menos durante el comienzo de esta patología (Zondler *et al.*, 2016). No podemos saber si en nuestro caso el incremento de monocitos que ocurre en las fases iniciales de la degeneración de las células de Purkinje está ejerciendo alguna función, pero puede estar relacionado con la variación periférica de las células Ly-6C<sup>high</sup> (ver más adelante).

En conjunto, todos los hechos detallados anteriormente confirmaron el efecto atrayente específico sobre los leucocitos causado por la degeneración de las células de Purkinje.

### Alteraciones leucocitarias en el bazo

Se ha comprobado que la neurodegeneración y la neuroinflamación son capaces de alterar las respuestas del sistema inmunitario fuera del SNC (Lucin y Wyss-Coray, 2009; Gupta *et al.*, 2018; Fuzzati-Armentero *et al.*, 2019). En este contexto, hemos descubierto resultados interesantes en relación con el análisis fenotípico de las células inmunitarias esplénicas de los ratones PCD. En general,

se detectó una expresión reducida de varios marcadores inmunitarios en poblaciones mieloides específicas durante la degeneración de las células de Purkinje o incluso antes. Curiosamente, esas alteraciones dejan de ser patentes cuando concluye la degeneración cerebelosa, por lo que ambos procesos parecen estar directamente relacionados.

En particular, los macrófagos y las células dendríticas fueron claramente las poblaciones más afectadas, mostrando una capacidad de presentación antigénica disminuida y una madurez reducida. Esto viene reflejado por una reducción en la expresión del marcador general de células presentadoras de antígeno, MHC-II, así como de los marcadores fenotípicos específicos de macrófagos y células dendríticas, F4/80 y CD11c, respectivamente. Sería concebible encontrar un sistema inmunitario más activado como resultado de una respuesta inflamatoria periférica al daño nervioso (Marcet *et al.*, 2017) o la neurodegeneración (Björkqvist *et al.*, 2008; Boyko *et al.*, 2017), pero, sorprendentemente, nosotros detectamos una peor funcionalidad mieloide. A pesar de esta aparente incongruencia, nuestros resultados comparten similitudes con otros estudios que, precisamente, han revelado alteraciones en las células mieloides en relación con enfermedades neurodegenerativas. De este modo, los monocitos derivados de pacientes con Alzheimer exhiben tanto una diferenciación alterada de los macrófagos como una actividad fagocítica reducida (Fiala *et al.*, 2005; Jairani *et al.*, 2019). Del mismo modo, los neutrófilos aislados de pacientes con Alzheimer presentan una capacidad reducida para fagocitar y destruir patógenos (Davydova *et al.*, 2003; Le Page *et al.*, 2017). Además, las células dendríticas se reducen en la sangre periférica de pacientes con enfermedad de Alzheimer o de Parkinson de forma directamente proporcional a la gravedad de los síntomas (Ciaramella *et al.*, 2013; Ciaramella *et al.*, 2016). Como resultado de esta respuesta inmunitaria innata comprometida, proponemos que los ratones PCD probablemente presenten una mayor predisposición a desarrollar infecciones por patógenos oportunistas, tal y como se ha sugerido para otras enfermedades neurodegenerativas (Le Page *et al.*, 2017; Gupta *et al.*, 2018). Esto podría ser una de las causas de que los ratones PCD tengan una mayor mortalidad, hecho que hemos observado con cierta frecuencia en el animalario aun cuando estos ratones reciben cuidados especiales debido a su mala coordinación motora.

A pesar de las similitudes con otros estudios, es plausible pensar que las alteraciones inmunitarias observadas en los ratones PCD estén ligadas al déficit en la expresión del gen *Ccp1*. Este gen codifica la proteína CCP1 (Berezniuk *et al.*, 2012), que es esencial para la estabilización de los microtúbulos (Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018) y que se sintetiza en múltiples tejidos y tipos celulares, incluidas las células inmunitarias (Liu *et al.*, 2017). Esto implica que las alteraciones observadas en las células mieloides de los ratones PCD podrían deberse a la propia mutación *pcd*, y no solo al efecto de la pérdida neuronal. Curiosamente, un estudio reciente ha demostrado que la deficiencia de la

proteína CCP1 o de su homóloga CCP6 promueve la reprogramación celular somática o, en otras palabras, previene la diferenciación celular (Ye *et al.*, 2018). Además, una investigación previa de los mismos autores reveló que ratones *Ccp6*<sup>-/-</sup> presentan megacariocitos subdesarrollados que dan lugar a plaquetas disfuncionales (Ye *et al.*, 2014). De este modo, sería razonable considerar que la mutación *pcd* está directamente involucrada en las perturbaciones leucocitarias identificadas en los animales PCD. Aunque estos argumentos podrían explicar estos resultados tan llamativos, no se puede descartar que la neurodegeneración también esté implicada, ya que esas alteraciones parecen revertirse a P40, cuando la muerte de las células de Purkinje ha concluido virtualmente (Mullen *et al.*, 1976; Wang y Morgan, 2007). Por lo tanto, se requerirían más estudios para explicar de manera más precisa y concluyente la inmadurez que muestran las células mieloides de los ratones PCD, como, por ejemplo, analizar qué ocurre a edades más avanzadas, incluyendo el periodo neurodegenerativo del BO.

Aparte de un bloqueo parcial en la maduración mieloide, también se detectó un menor porcentaje de células Ly-6C<sup>high</sup> en los ratones PCD solo a P15, es decir, antes del comienzo de la muerte de las células de Purkinje. Precisamente, a esta edad es cuando comienzan a ser evidentes ciertos cambios ultraestructurales y morfológicos en las células de Purkinje de los ratones PCD (Landis y Mullen, 1978; Baltanás *et al.*, 2011a; Baltanás *et al.*, 2011b; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018). Esto puede guardar relación con el incremento de monocitos observado en el cerebelo de los animales mutantes a P15 y P20, puesto que las células Ly-6C<sup>high</sup> se han definido tradicionalmente como monocitos altamente invasivos (King *et al.*, 2009; Butovsky *et al.*, 2012). Es decir, a esta edad se podría estar produciendo una extravasación significativa de monocitos desde la sangre al cerebelo de los ratones PCD. Este es un hallazgo interesante, ya que el nivel de células Ly-6C<sup>high</sup> podría ser usado como un biomarcador temprano del desarrollo de esta neurodegeneración selectiva. El concepto de que los procesos inmunitarios puedan funcionar como biomarcadores de las enfermedades neurodegenerativas ha surgido recientemente, en vista de los resultados crecientes que apoyan su participación en la patogénesis de estas dolencias (Ciaramella *et al.*, 2016; Le Page *et al.*, 2018). Así, se ha detectado un descenso de células dendríticas en sangre periférica de pacientes con enfermedad de Alzheimer o de Parkinson que, además, está asociado con la gravedad de los síntomas (Ciaramella *et al.*, 2013; Ciaramella *et al.*, 2016). En pacientes con esclerosis lateral amiotrófica, los linfocitos Treg presentan una disfunción que se correlaciona con la progresión de la enfermedad (Beers *et al.*, 2017). Otro ejemplo lo constituyen las células NK, que presentan una mayor actividad en pacientes con deterioro cognitivo leve, justo antes de que se desarrolle la enfermedad de Alzheimer, por lo que

podrían considerarse como un biomarcador temprano de esta patología neurodegenerativa (Le Page *et al.*, 2015).

En vista de todo lo anterior, parece que hay alteraciones inmunitarias específicas ante diferentes tipos de patologías neurodegenerativas. Es por ello que estudiar los componentes del sistema inmunitario podría volverse una estrategia muy útil para monitorizar el progreso de estas enfermedades, así como para medir el potencial terapéutico de diferentes tratamientos (Björkqvist *et al.*, 2009; Boyko *et al.*, 2017). De este modo, se evitaría una exploración directa del SNC, hecho que implicaría métodos más complejos e invasivos.

En su conjunto, los resultados detallados hasta ahora muestran que el microambiente específico asociado a un proceso neurodegenerativo constituye un factor clave en el reclutamiento celular y, por tanto, debe ser tenido en cuenta a la hora de aplicar algún tipo de terapia celular para hacer frente a estas patologías devastadoras. Asimismo, las alteraciones leucocitarias identificadas en los ratones PCD podrían servir como indicadores biológicos tempranos de la degeneración cerebelosa y, además, pueden ser responsables de causar una mayor susceptibilidad a infecciones. Esto último también resulta relevante en el mantenimiento de las colonias de estos animales o a la hora de someterlos a determinados procedimientos quirúrgicos.

## TERAPIA CELULAR INMUNOMODULADORA

El segundo objetivo de esta Tesis Doctoral consistió en evaluar nuevos enfoques terapéuticos para paliar la neurodegeneración. La terapia celular es una de las estrategias más prometedoras para hacer frente a las enfermedades neurodegenerativas (Díaz *et al.*, 2015; Díaz *et al.*, 2019). En este contexto, las células derivadas de la médula ósea son una de las fuentes más atractivas y factibles, porque son fáciles de obtener, poseen mecanismos de acción variados y plásticos y, además, pueden integrarse fisiológicamente en diversos órganos (Saiwai *et al.*, 2013; Díaz *et al.*, 2018).

Con el fin de reducir la inflamación/degeneración que ocurre en el cerebelo de los ratones PCD, decidimos trasplantar dos tipos celulares derivados de la médula ósea, las hMSCs y las IMCs, por sus propiedades inmunomoduladoras y neuroprotectoras (ver Introducción). El hecho de haber realizado los trasplantes cuando ya ha comenzado la neurodegeneración (P20) se debe a que las células madre derivadas de la médula ósea muestran una tendencia a migrar hacia las zonas que presentan una lesión o inflamación, proceso que puede deberse al efecto de moléculas quimioatrayentes (Johansson *et al.*, 2008; Recio *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2012a). A ello tenemos que añadir la informa-



ción aportada por nuestros resultados, puesto que hemos demostrado que las células sanguíneas presentan una atracción selectiva hacia las células de Purkinje en degeneración, y no antes de que comience el periodo degenerativo. Asimismo, también se ha descrito que la neurodegeneración y la inflamación en el SNC incrementan las propiedades regenerativas e inmunomoduladoras de las células trasplantadas (Bae *et al.*, 2005b; Bae *et al.*, 2007; Ravanidis *et al.*, 2015).

### La detección de mitocondrias humanas es adecuada en las células mesenquimales humanas en suspensión, pero no en tejido

Puesto que se desconocía la capacidad de migración y distribución de las hMSCs en los animales PCD tras su inyección intravenosa, lo primero que hicimos fue analizar su llegada a diferentes tejidos a las 24 horas postrasplante. Se escogió este periodo de tiempo ya que se ha demostrado que tras una administración como la aquí empleada se observa una mayor detección durante las primeras horas, de manera que a los pocos días las MSCs dejan de ser visibles (Kurtz, 2008; Salvadori *et al.*, 2019). En particular, tras la administración intravenosa de las MSCs, la mayoría de ellas se queda atrapada rápidamente en los pulmones. Esto parece deberse a un problema físico, ya que el diámetro de las células es superior al ancho de los microcapilares pulmonares (Scherzer *et al.*, 2007). Además, otro factor que puede contribuir en menor medida a esta retención es la interacción entre las MSCs y las células endoteliales de dichos microcapilares, mediante moléculas de adhesión celular (Fischer *et al.*, 2009). Después, a las 24 horas de ser trasplantadas, muchas MSCs se redistribuyen hacia otros órganos, principalmente el hígado (Eggenhofer *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2016; Salvadori *et al.*, 2019), aunque también el bazo, el riñón y la médula ósea (Fischer *et al.*, 2009), o **hacia sitios dañados o inflamados** (Lee *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2012). La mayoría de las células atrapadas en estos órganos muere por apoptosis en cuestión de pocos días (De Vocht *et al.*, 2013), de manera que a los 7 días apenas son detectables, salvo en modelos de daño tisular en los que son capaces de sobrevivir algunos meses e incluso ejercer efectos beneficiosos (Kurtz, 2008; Chang *et al.*, 2011; Salvadori *et al.*, 2019).

Previamente a analizarlas en tejido, se optimizó el marcaje de las hMSCs en suspensión por inmunohistoquímica. A pesar de esto, no se consiguieron detectar en el cerebelo de los animales receptores. En primera instancia, pensamos que ello podría deberse a que las células no llegaron al SNC tras su trasplante, a pesar del posible efecto atrayente debido a la degeneración cerebelosa. Por ello, decidimos comprobar su presencia en el pulmón y en el hígado, órganos en los que deberían encontrarse claramente a las 24 horas (Kraitichman *et al.*, 2005; Fischer *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2016; Salvadori *et al.*, 2019). Sin embargo, tampoco se logró un inmunomarcaje de las hMSCs en

estos órganos aun habiendo probado varios métodos de recuperación antigénica y variaciones en la concentración de los distintos reactivos (anticuerpo, suero y detergente). Existe la posibilidad de que las células sean reconocidas por el sistema inmunitario del ratón (DelaRosa *et al.*, 2012), aunque la pérdida de las hMSCs tras su trasplante parece ser independiente de un rechazo inmunitario, puesto que ocurre igualmente en ratones inmunodeficientes (Joyce *et al.*, 2010). A ello hay que añadir que al tratarse de células humanas su supervivencia puede estar comprometida debido a la necesidad de factores de crecimiento esenciales que no se encuentren en un ambiente de naturaleza xenogénica (Tierney *et al.*, 2020). Por otro lado, numerosos estudios han revelado la presencia de hMSCs en el tejido de ratones trasplantados por vía intravenosa (Lee *et al.*, 2009; He *et al.*, 2016; Zheng *et al.*, 2016), incluido el cerebelo (Chang *et al.*, 2011; Kemp *et al.*, 2011), por lo que parece poco probable que el fallo en la detección de estas células se deba a su reconocimiento y eliminación por el sistema inmunitario del hospedador. Finalmente, parece ser que en otros grupos de investigación también han surgido dificultades similares a la hora de identificar las hMSCs empleando anticuerpos antimitocondriales (Comunicación tipo póster, PS1-84, SENC 2019).

En vista de todo lo anterior, proponemos que la incapacidad de identificar las hMSCs en el tejido de los animales receptores se debió a la metodología empleada. Aparte de detectar proteínas humanas específicas por inmunohistoquímica, existen otros tipos de técnicas que permiten identificar las hMSCs. Así, por ejemplo, estas células se pueden detectar *in vivo* mediante un sistema de imagen de bioluminiscencia, tras haberlas transfectado con el gen de la luciferasa (He *et al.*, 2016). Asimismo, las hMSCs se pueden transformar con el gen de la GFP (Guo *et al.*, 2012; Matsuura *et al.*, 2014; Ben Menachem-Zidon *et al.*, 2019) o marcar con un pulso de BrdU (Wang *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006; Khalili *et al.*, 2012) para detectarlas en tejidos específicos. Sin embargo, todas estas técnicas implican manipulaciones que pueden interferir con el DNA, y que podrían comprometer la fisiología celular, además de dificultar un salto traslacional a la clínica. Otra posibilidad consistiría en disgregar el tejido y analizar las células de interés por citometría de flujo (Capotondo *et al.*, 2017; Hakim *et al.*, 2019). El problema de este procedimiento es que no se podría analizar *in situ* la integración de las células trasplantadas o su morfología en un tejido intacto. Por todo ello, no seguimos avanzando en esta línea de investigación y decidimos dedicarnos al estudio del segundo tipo celular, las IMCs monocíticas.

## Caracterización y trasplante de células mieloides inmaduras monocíticas

Siempre que se trabaja con MDSCs se debe comprobar su capacidad inmunosupresora mediante ensayos funcionales, ya que es lo que realmente las distingue del resto de poblaciones mieloides (Bronte *et al.*, 2016; Cassetta *et al.*, 2019). En nuestro caso esto era incluso más importante,

puesto que las células se aislaron de la médula ósea de animales silvestres, es decir, se trataba de IMCs (que todavía no han adquirido actividad inmunosupresora; Talmadge y Gabrilovich, 2013). Tradicionalmente, las MDSCs se han aislado de diversos tejidos de ratones con diferentes patologías inflamatorias, generalmente a partir del bazo, donde se acumulan abundantemente, aunque también de tejido tumoral, de la médula ósea e incluso de tejido pulmonar y nervioso (Moliné-Velázquez *et al.*, 2011; Bruger *et al.*, 2019; Hosomi *et al.*, 2019). Nosotros decidimos aislar IMCs a partir de médula ósea sana para no tener que depender de animales enfermos a la hora de obtener las células, lo cual es relevante de cara a llevar a cabo su explotación clínica (Highfill *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2010). A ello hay que añadir que nuestro laboratorio cuenta con una amplia experiencia en lo que respecta a la extracción y trasplante de células derivadas de la médula ósea (Recio *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2012a; Díaz *et al.*, 2012b; Díaz *et al.*, 2015; Díaz *et al.*, 2018; Díaz *et al.*, 2019), lo que es relevante para comparar los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral con experimentos previos que, además, emplean el mismo modelo animal.

De este modo, lo primero que tuvimos que hacer fue comprobar si las IMCs aisladas de la médula ósea de animales sanos eran capaces de adquirir propiedades inmunosupresoras bajo condiciones que estimulen su activación patológica. Esto es lo que se discutirá a continuación.

### ***Las células mieloides inmaduras monocíticas se comportan como células mieloides supresoras ante condiciones patológicas***

La prueba más empleada para evaluar las propiedades inmunosupresoras de las MDSCs consiste en determinar su influencia en la proliferación de los linfocitos T, después de que estos hayan sido estimulados (Bruger *et al.*, 2019). Existen varias técnicas para evaluar la proliferación celular, pero las más usadas actualmente son las que se basan en detectar la dilución de un trazador por citometría de flujo -como es el caso del Tag-it Violet usado en este trabajo-. Por otro lado, analizar el ciclo celular también puede servir para corroborar el análisis de proliferación, ya que indica la proporción de células en las distintas fases del ciclo celular y, además, añade información sobre la fracción de células que se encuentran en apoptosis. Tras realizar estos ensayos funcionales pudimos comprobar que las IMCs aisladas de la médula ósea de ratones silvestres fueron capaces de suprimir la proliferación de los linfocitos T activados, así como de promover su apoptosis. Por tanto, se comportaron como MDSCs tras su cultivo con linfocitos T en condiciones patológicas.

El hecho de que las IMCs extraídas de una médula ósea sana adquiriesen una potente capacidad inmunosupresora tiene gran importancia, ya que evita que se tengan que extraer células de animales enfermos y genera una fuente más factible para su explotación clínica (Highfill *et al.*, 2010;

Zhou *et al.*, 2010). A día de hoy existen varios grupos de investigación que han conseguido generar MDSCs tras el cultivo de células derivadas de la médula ósea, principalmente de ratones, aunque también de humanos (Highfill *et al.*, 2010; Marigo *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2010; Messmann *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2016). Para lograr la diferenciación de las células cultivadas en MDSCs, cada uno de ellos emplea una combinación diferente de citocinas. Esto hace que haya gran variabilidad en los mecanismos inmunosupresores de las MDSCs obtenidas, que parecen depender de las citocinas empleadas durante el cultivo (Messmann *et al.*, 2015). Por tanto, se necesita refinar la producción de MDSCs *in vitro* con esta metodología antes de considerar un salto hacia la clínica (Drujont *et al.*, 2014). Por el contrario, nuestra investigación ha demostrado la posibilidad de trasplantar las IMCs directamente tras su aislamiento, sin cultivarlas previamente, dado que un microambiente patológico fomenta su diferenciación a MDSCs, evitando así la diferenciación artificial *in vitro* y sus citadas desventajas.

### **Las células mieloides inmaduras monocíticas no llegan al cerebelo de los ratones PCD tras su inyección intravenosa**

Después de comprobar la capacidad de las IMCs para adquirir actividad inmunosupresora, las trasplantamos por vía intravenosa en los ratones PCD. En este caso se usaron dos rutas de administración -la vena lateral de la cola y el seno retroorbital-, con el objetivo de analizar dos alternativas diferentes y poder comprobar, además, posibles diferencias dada su distinta proximidad al encéfalo. Lo primero que hicimos, al igual que con las hMSCs, fue analizar su presencia a las 24 horas en el cerebelo de los animales receptores. Como las IMCs se aislaron de la médula ósea de ratones GFP no hubo problemas para identificarlas. En este caso, sí se consiguieron detectar perfectamente, pero, desafortunadamente, la llegada de células al cerebelo fue muy escasa. También analizamos el pulmón y el hígado, donde se encontraron numerosas células GFP<sup>+</sup>, especialmente en el tejido pulmonar. De este modo, se verificó que en dichos órganos quedan retenidas las células tras su administración intravenosa, tal y como se ha sugerido anteriormente (Kraitchman *et al.*, 2005; Fischer *et al.*, 2009; Eggenhofer *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015; Leibacher y Henschler, 2016; Zheng *et al.*, 2016; Salvadori *et al.*, 2019). Los resultados fueron similares para las dos rutas empleadas, lo cual tiene sentido ya que han demostrado ser equivalentes en cuanto a la distribución de anticuerpos, células y agentes químicos (Steel *et al.*, 2008; León-Rico *et al.*, 2015), e incluso para el trasplante y reconstitución de la médula ósea (León-Rico *et al.*, 2015). De esta manera, la proximidad al sitio de integración esperado no pareció influir en la llegada de las células trasplantadas al cerebelo.

Aparte de la retención de las células trasplantadas en órganos periféricos, el hecho de observar tan pocas células en el cerebelo podría deberse a que no resulten atraídas por el ambiente neurodegenerativo del ratón PCD o a que la barrera hematoencefálica no esté excesivamente afectada en este modelo. De hecho, como se vio anteriormente, la infiltración de leucocitos en los ratones PCD fue muy ligera en comparación con los ratones tratados con LPS. Además, no hubo un incremento generalizado de monocitos en comparación con los animales silvestres, de manera que estas células solo parecieron infiltrarse en las fases más iniciales de la neurodegeneración, cuando presuponemos que la barrera hematoencefálica pudo estar alterada (Prinz *et al.*, 2017).

Por otro lado, tras realizar un trasplante de médula ósea completa se ha identificado una mayor llegada de células derivadas de esta en el BO de ratones PCD a P60 -justo cuando comienza la degeneración de las células mitrales- respecto a ratones silvestres (Recio *et al.*, 2011). No obstante, en dicho estudio el aporte de nuevas células es continuo y, además, se aplicó radiación para realizar la ablación de la médula ósea de los animales receptores. Esto último parece ser responsable de la integración de células Iba1<sup>+</sup> derivadas de la médula ósea en un intento por reemplazar las células microgliales residentes disfuncionales o apoptóticas a consecuencia de la radiación (Massengale *et al.*, 2005; Morganti *et al.*, 2014). De hecho, en experimentos con ablación química de médula ósea o en los que se ha empleado protección craneal a la hora de aplicar la radiación, apenas se detectó una llegada al encéfalo de células derivadas del trasplante (Wiersema *et al.*, 2008; Moravan *et al.*, 2016; Díaz *et al.*, 2019). Por tanto, independientemente de que un ambiente neurodegenerativo pueda ejercer algún tipo de efecto sobre la integración de las células derivadas de la médula ósea, la radiación podría facilitar este fenómeno.

### **La inyección intracerebelosa de células mieloides inmaduras monocíticas evita los efectos adversos causados por una cirugía estereotáctica**

Después de comprobar que la ruta intravenosa no es favorable para una integración adecuada de las IMCs en el cerebelo de los ratones PCD, decidimos inyectarlas directamente en el tejido nervioso, que es lo que se ha realizado en la mayoría de los estudios en los que se administran células en modelos animales de degeneración cerebelosa (Bae *et al.*, 2005a; Bae *et al.*, 2005b; Li *et al.*, 2006; Bae *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2011; Babuska *et al.*, 2015; Mendonça *et al.*, 2015; Huda *et al.*, 2016; Higuera *et al.*, 2017; Hsieh *et al.*, 2017; Cendelin *et al.*, 2018). El principal inconveniente de este método es que conlleva una lesión mecánica que causa daños e inflamación en el tejido circundante (Akyol *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018). Sin embargo, las ventajas que ofrece es que es más directo y la supervivencia de las células trasplantadas es mayor que cuando se introducen

por vía intravenosa, aunque su dispersión en el tejido sea menor (De Vocht *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015). Aprovechando que la llegada estaba garantizada, se decidió analizar el comportamiento motor de los ratones antes de su sacrificio y del procesamiento histológico.

En relación a la habilidad motora de los ratones PCD, se observó un empeoramiento en los ratones Sham respecto a los que no fueron operados. Dicho deterioro motor no se observó en los animales operados que recibieron un trasplante de IMCs. Más aún, estos datos comportamentales fueron acompañados por los análisis histológicos, como veremos más adelante.

En este caso, se observaron bastantes células derivadas del trasplante en el lóbulo que recibió la inyección (lóbulo IV-V), con una morfología aparentemente indiferenciada. Aunque sí que se llegaron a detectar algunas células en lóbulos alejados, como el lóbulo X, las células no migraron demasiado durante los 10 días que estuvieron en el cerebelo; más bien permanecieron en su mayoría en el lóbulo inyectado. En efecto, se ha descrito que las células inyectadas directamente en el tejido nervioso apenas se desplazan más allá del sitio de la lesión (Li *et al.*, 2015). No obstante, sus efectos pueden propagarse gracias a la acción de factores paracrinos (Jones *et al.*, 2010; Oliveira Miranda *et al.*, 2018).

Continuando con el análisis histológico, se observó una mayor muerte de células de Purkinje en los ratones Sham además de una mayor densidad de células apoptóticas, que se evitó completa o parcialmente en los animales trasplantados con IMCs. La mayor muerte de las células de Purkinje se detectó en el lóbulo X de los ratones Sham, que está relativamente alejado del lóbulo lesionado, por lo que parece que el daño de la lesión se transmitió hacia otras regiones del cerebelo. Aunque los astrocitos y la microglía reaccionan y transmiten mensajes dentro de su entorno inmediato, también pueden comunicarse en distancias más largas a través de diversas moléculas señalizadoras (Cicchetti y Barker, 2014). Tanto es así que la gliosis reactiva se ha visto implicada no solo en la aceleración de procesos neurodegenerativos, sino también en su propagación (Leyns y Holtzman, 2017).

Todos estos hallazgos se concretan en dos hechos fundamentales. El primero es que la cirugía estereotáctica practicada está ejerciendo efectos perjudiciales tanto a nivel comportamental como histológico en los ratones PCD. Esto no resulta sorprendente, ya que se ha demostrado que las intervenciones neuroquirúrgicas conllevan un daño inevitable sobre el tejido nervioso circundante (Akyol *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018), incluso teniendo en cuenta que en los últimos años ha disminuido la invasividad de los procedimientos quirúrgicos, como es el caso de la cirugía estereotáctica (Jadhav *et al.*, 2007; Travis *et al.*, 2019). En particular, practicar una neurocirugía puede implicar el desarrollo

de neuroinflamación, sangrado, edema cerebral, muerte celular y, en definitiva, causar déficits neurológicos postoperatorios (Tian *et al.*, 2019; Travis *et al.*, 2019). Todo ello parece haber contribuido a exacerbar aún más la inflamación y la muerte neuronal existentes en el cerebelo del ratón PCD, así como a empeorar su habilidad motora. Es precisamente por este motivo que inicialmente no buscábamos inyectar las células directamente en el tejido nervioso.

El segundo hecho a destacar es que el trasplante intracerebeloso de IMCs parece ser una aproximación terapéutica prometedora para evitar los efectos adversos nombrados anteriormente. Curiosamente, hoy en día dichos perjuicios no se tratan directamente, sino que se deja que sanen por sí solos (Travis *et al.*, 2019). De hecho, actualmente no existen tratamientos específicos para prevenir los daños derivados de las cirugías intracraneales, debido en parte a que no se ha desarrollado un modelo animal apropiado para estudiar esto hasta hace relativamente poco tiempo (Jadhav *et al.*, 2007). Por todo ello, la exploración de nuevas estrategias que logren una neuroprotección eficaz, segura y precisa se ha convertido en un punto clave de la neurocirugía moderna (Tian *et al.*, 2019), y precisamente el trasplante de IMCs podría ser una estrategia neuroprotectora a considerar; más aún si tenemos en cuenta que la potencia inmunomoduladora de estas células se adquiere e intensifica con la inflamación (Ostrand-Rosenberg y Sinha, 2009).

El beneficio terapéutico tras el trasplante de diversos tipos celulares en modelos de neurodegeneración cerebelosa parece deberse a la liberación de factores neurotróficos y a efectos antiinflamatorios (Bae *et al.*, 2005a; Jones *et al.*, 2010; Nakamura *et al.*, 2015; Oliveira Miranda *et al.*, 2018), ya que tanto la transdiferenciación como la fusión celular son muy escasas (Jones *et al.*, 2010; Díaz *et al.*, 2015). En este sentido, los ensayos clínicos que están en marcha sobre el uso de células derivadas de la médula ósea en enfermedades neurológicas se aprovechan de sus propiedades inmunomoduladoras y neuroprotectoras (Díaz *et al.*, 2015). Centrándonos en las MDSCs, se ha demostrado que suprimen la neuroinflamación en varios modelos de daño neurológico (Melero-Jerez *et al.*, 2016). Más específicamente, las MDSCs son capaces de inhibir la activación de la microglía proinflamatoria en un modelo de lesión cerebral traumática (Hosomi *et al.*, 2019), limitar el desarrollo de los focos inflamatorios y de las regiones desmielinizadas en ratones con EAE (Moliné-Velázquez *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2011; Ioannou *et al.*, 2012) y atenuar significativamente la inflamación aguda y favorecer la reparación tisular en un modelo de lesión de médula espinal (Saiwai *et al.*, 2013). Asimismo, también se ha comprobado que pueden ejercer efectos neuroprotectores directos mediante la liberación de NGF (Sarkar *et al.*, 2013). En vista de todo esto, es plausible pensar que las IMCs estén ejerciendo sus efectos mediante la modulación de las células de su entorno a través de la liberación de factores

paracrinus, aunque no se puede descartar que haya algún tipo de regulación mediante interacciones célula-célula (Moliné-Velázquez *et al.*, 2011; Hosomi *et al.*, 2019).

A pesar de que las IMCs pudiesen estar promoviendo un ambiente neuroprotector, es posible que no se haya conseguido una mayor supervivencia de células de Purkinje o una mejora comportamental con respecto a ratones PCD sin tratamiento debido a la extrema rapidez con la que progresa la muerte de dichas neuronas. Este hecho ya se ha planteado recientemente para una terapia celular basada en células derivadas de la médula ósea sana en el ratón PCD, en la que tampoco se logró una mayor supervivencia de células de Purkinje (Díaz *et al.*, 2018). Por el contrario, mediante dicha terapia sí que se consiguieron efectos neuroprotectores en el BO del ratón PCD -donde la degeneración es más lenta-, lo que condujo a una recuperación parcial de su olfacción (Díaz *et al.*, 2012a). Siguiendo con este razonamiento, sería interesante trasplantar IMCs en el BO de ratones PCD, puesto que posiblemente se consiguiese detectar algún efecto terapéutico, ya sea una mejora en la olfacción, una mayor supervivencia de células mitrales o ambas.

En su conjunto, los resultados detallados hasta ahora muestran que las IMCs monocíticas aisladas de la médula ósea sana son capaces de adquirir propiedades inmunosupresoras cuando se cultivan bajo condiciones patológicas. Asimismo, el trasplante intracerebeloso de IMCs en el ratón mutante PCD evita los efectos adversos causados por la cirugía estereotáctica practicada, tanto a nivel histológico como comportamental. Este hecho resulta muy interesante, ya que un tratamiento adecuado para los daños producidos por las intervenciones neuroquirúrgicas puede resultar en beneficios significativos tanto para los pacientes como para las instituciones sanitarias (Jadhav *et al.*, 2007). Por lo tanto, proponemos que las IMCs podrían emplearse como agentes coadyuvantes a la hora de practicar una neurocirugía.



*“Ninguna de tus neuronas sabe  
quién eres... ni le importa.”*

*Eduard Punset*

## **CONCLUSIONES**



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

- I. La muerte selectiva de las células de Purkinje induce un efecto atrayente específico sobre los leucocitos. Por el contrario, la degeneración de las células mitrales no tiene un efecto aparente sobre el reclutamiento leucocitario. **Es decir, el ambiente neurodegenerativo constituye un factor clave para la movilización leucocitaria; por tanto, debe tenerse en cuenta cuando se aplique terapia celular contra estas patologías devastadoras.**
- II. La mutación *pcd* parece ser responsable de obstaculizar la maduración mielóide. **Estas alteraciones pueden servir como marcador temprano de neurodegeneración en el SNC.**
- III. Las hMSCs trasplantadas no se consiguieron detectar en los animales receptores. **Por ello, aunque no se puede descartar un efecto terapéutico colateral, este no parece ser significativo.**
- IV. Las IMCs aisladas de la médula ósea de ratones silvestres se comportan de manera similar que las MDSCs tras su cultivo con linfocitos T. **Podemos utilizar las IMCs como herramienta terapéutica de valor equivalente a las MDSCs, pero de fuentes celulares mucho más asequibles y cercanas a la utilización clínica.**
- V. El trasplante intravenoso no asegura una buena llegada de las IMCs al cerebelo del ratón PCD para su integración como agentes terapéuticos. **Este sistema de trasplante celular no parece adecuado para lograr efectos significativos ante situaciones de neurodegeneración muy agresiva.**
- VI. La cirugía estereotáctica practicada sobre el cerebelo de ratones PCD agrava sus síntomas, pero estos se recuperan con una inyección paralela de IMCs. **Esta estrategia parece ser un método eficaz para paliar efectos adversos de la neurocirugía.**



## **APÉNDICE I: soluciones de uso común**



## SOLUCIONES DE USO COMÚN

**Fijador Carnoy:** está compuesto por metanol al 75 % (v/v) y ácido acético al 25 % (v/v). Para obtener 100 ml de solución se mezclan 75 ml de metanol con 25 ml de ácido acético.

**Fijador Somogyi:** está compuesto por paraformaldehído al 4 % (p/v) y ácido pícrico saturado 15 % (v/v), tamponado en PB. 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 de ácido pícrico, previamente filtrada y 500 ml de tampón fosfato 0,2 M, pH 7,4. Por último, se enrasa hasta 1 litro con H<sub>2</sub>O destilada.

**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-propil galato 5 % (p/v), glicerol 70 % (v/v) y timerosal 0,002 % (p/v). Se obtiene disolviendo 0,42 g de glicina, 0,021 g de NaOH, 0,51 g de NaCl y 5 g de N-propil galato en 100 ml de glicerol al 70 % (v/v). Por último, se añade 1 ml de una predilución de timerosal al 2 % (p/v). Ha de guardarse protegido de la luz y a 4 °C.

**Mezcla congeladora para secciones:** está constituida por glicerol al 30 % (v/v) y polietilenglicol al 30 % (v/v) 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 y 300 ml de polietilenglicol. Se ajusta el volumen hasta 1 litro con H<sub>2</sub>O destilada. Ha de guardarse a 4 °C.

**Solución crioprotectora de sacarosa:** se compone de sacarosa al 30 % (p/v) disuelta en PB.

**Solución de ácido cítrico 1 M:** se obtiene disolviendo 19,21 g de ácido cítrico anhidro en 100 ml de H<sub>2</sub>O destilada.

**Solución de citrato sódico 1 M:** se obtiene disolviendo 29,4 g de citrato trisódico dihidrato en 100 ml de H<sub>2</sub>O destilada.

**Solución de lisis de eritrocitos:** para preparar 100 ml de solución, hay que disolver 8,3 g de NH<sub>4</sub>Cl y 1 g de KHCO<sub>3</sub> en H<sub>2</sub>O destilada y añadir 200 µl de EDTA 0,5 M. Se ajusta el pH a 7,4 y se enrasa hasta 100 ml con H<sub>2</sub>O destilada.

**Solución para gelatinizar portaobjetos:** mezclamos 4,5 g de gelatina en polvo con 900 ml de H<sub>2</sub>O destilada y se disuelve calentando hasta 80 °C. Se le añade 0,44 g de sulfato de cromo III y potasio, 12-hidrato. Los portaobjetos se introducen en la solución filtrada a 70 °C durante 5 min y se dejan secar en una estufa a 60 °C toda la noche. Tras repetir el proceso de nuevo, se guardan los portaobjetos en un lugar seco.

**Solución salina isotónica:** se compone de NaCl 0,9 % (p/v) en H<sub>2</sub>O.

**Solución SDS para recuperación antigénica:** está formada por SDS 1 % (v/v) en PBS. Para obtener 5 ml se mezclan 0,25 ml de SDS al 20 % (p/v) y 4,75 ml de PBS.

**Solución SDS-EDTA para recuperación antigénica:** está formada por SDS 0,2 % (v/v), NaCl 30 mM, EDTA 1,5 mM y Tris-base 20 mM en H<sub>2</sub>O destilada. Para obtener 50 ml se mezclan 0,5 ml de SDS 20 % (p/v), 0,12 g de Tris-base, 0,09 g de NaCl y 0,15 ml de EDTA 0,5 M. Se ajusta el pH a 7,4 y se enrasa con H<sub>2</sub>O destilada hasta 50 ml.

**Tampón citrato para recuperación antigénica 0,1 M, pH 6,0:** se obtiene mezclando 9 ml de una solución de ácido cítrico 1 M y 41 ml de una solución de citrato sódico 1 M en 400 ml de H<sub>2</sub>O destilada. Después se ajusta el pH a 6,0 y se enrasa hasta 500 ml con H<sub>2</sub>O destilada.

**Tampón fosfato 0,5 M, pH 7,4:** se obtiene mezclando soluciones 0,5 M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O. Se disuelven 35,8 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O en 100 ml de H<sub>2</sub>O y 7,8 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O en 200 ml de H<sub>2</sub>O. Se vierte la segunda solución sobre la primera hasta alcanzar el pH deseado.

**Tampón fosfato 0,2 M, pH 7,4:** se obtiene mezclando soluciones 0,2 M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O. Para conseguir aproximadamente 2 litros se disuelven 107,4 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O en 1,5 litros de H<sub>2</sub>O y 15,6 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O en 0,5 litros de H<sub>2</sub>O. Se vierte la segunda solución sobre la primera hasta alcanzar el pH deseado.

**Tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4 (PB, del inglés *Phosphate Buffer*):** se prepara diluyendo la solución anterior a la mitad en H<sub>2</sub>O destilada.

**Tampón fosfato salino, pH 7,4 (PBS, del inglés *Phosphate Buffered Saline*):** para obtener 1 litro de PBS se disuelven los siguientes componentes en H<sub>2</sub>O destilada: 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 3,63 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O y 0,21 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Se ajusta el pH a 7,4 y se enrasa hasta 1 litro con H<sub>2</sub>O destilada.



**Tampón SSC (del inglés *Saline Sodium Citrate*), pH 7,0 (20X):** 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 trisódico dihidrato en 30 ml de H<sub>2</sub>O destilada. Se ajusta el pH hasta 7,0 y se enrasa con más H<sub>2</sub>O hasta 50 ml.

**Tampón Tris-Borato-EDTA 10X:** para preparar 1 litro hay que disolver 108 g de Trizma base (890 mM) y 55 g de ácido bórico (890 mM) en 40 ml de EDTA 0,5 M pH 8,0 (20 mM). Para su uso (0,5X), se disuelve en la cantidad correspondiente de H<sub>2</sub>O destilada.

**Tampón TUNEL, pH 7,2:** está formado por Tris-HCl 30 mM, cacodilato de sodio 140 mM, cloruro de cobalto 1 mM y Tritón X-100 al 0,3 % (v/v). Para obtener 100 ml se mezclan 15 ml de una solución de Tris-HCl 0,2 M pH 7,2, 2,997 g de cacodilato de sodio, 23,793 mg de cloruro de cobalto y 1,5 ml de Tritón X-100 al 20 % (v/v). Por último, se ajusta el volumen hasta 100 ml con H<sub>2</sub>O destilada.



**APÉNDICE II: artículos científicos elaborados  
hasta la fecha, relacionados con la presente  
Tesis Doctoral**



## THE SELECTIVE DEGENERATION OF PURKINJE CELLS INDUCES SPECIFIC PERIPHERAL IMMUNE ALTERATIONS

Carlos del Pilar<sup>a,b</sup>, David Díaz<sup>a,b,\*</sup>, Rafael Lebrón-Galán<sup>c</sup>, Diego Clemente<sup>c</sup>, José Ramón Alonso<sup>a,b,d</sup>, Eduardo Weruaga<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> *INCyL, Institute for Neuroscience of Castile and Leon, Universidad de Salamanca, E-37007, Salamanca, Spain*

<sup>b</sup> *IBSAL, Institute of Biomedical Research of Salamanca, E-37007, Salamanca, Spain*

<sup>c</sup> *Grupo de Neuroinmuno-Reparación, Hospital Nacional de Paraplégicos, Finca La Peraleda s/n, 45071 Toledo, Spain*

<sup>d</sup> *Instituto de Alta Investigación, Universidad de Tarapacá, Arica, Chile*

### \*Corresponding authors:

Dr. Eduardo Weruaga, Institute for Neuroscience of Castile and Leon, Universidad de Salamanca, C/ Pintor Fernando Gallego 1, E-37007, Salamanca, Spain; e-mail: ewp@usal.es; phone: +34 923 294500 ext. 5324; fax: + 34 923 294750.

Dr. David Díaz, Institute for Neuroscience of Castile and Leon, Universidad de Salamanca, C/ Pintor Fernando Gallego 1, E-37007, Salamanca, Spain; e-mail: ddiaz@usal.es; phone: +34 923 294500 ext. 5326; fax: + 34 923 294750.

**Keywords:** selective neurodegeneration, neuroinflammation, brain infiltration, immune cell modulation, peripheral immune alterations.

**Abstract**

Neurodegenerative diseases are associated with impairments in peripheral immune responses, including an altered immune cell infiltration into the central nervous system, which may affect the progression of such diseases. In view of this, we wanted to know how different scenarios of selective neurodegeneration may affect immune cell infiltration into the brain parenchyma, as well as the phenotype of peripheral immune cells. Therefore, the Purkinje Cell Degeneration (PCD) mouse has been employed since it allows the study of different neurodegenerative processes in the same animal. Infiltrated leukocytes were analyzed in both the cerebellum and olfactory bulb, and compared with other standardized neuroinflammatory models, obtained by administering gamma radiation or lipopolysaccharide (LPS). For the exploration of peripheral immune cells, myeloid and lymphoid splenic populations were analyzed by flow cytometry. The severity of neural damage and the type of inflammation affected the infiltration of leukocytes, since its number slightly increased in the cerebellum of PCD mice and dramatically in LPS-treated mice, but declined in irradiated animals. Interestingly, leukocytes in PCD mice tended to localize in those layers of the cerebellar cortex mostly affected by Purkinje cell degeneration, but they did not in LPS-treated or irradiated mice, which held a generalized inflammation. By contrast, the mild degeneration in the olfactory bulb did not foster leukocyte attraction. Concerning the splenic analysis, we found a lower percentage of several myeloid cell subsets, together with a lower mean fluorescence intensity in myeloid markers related to antigen presentation and functional maturity in PCD animals in comparison with controls. In sum, our findings suggest an attractive and specific effect of Purkinje cell degeneration on peripheral immune cells, as well as the use of peripheral immune changes as biomarkers of such processes of neuronal death.

## 1. Introduction

Neurodegenerative diseases are generally accompanied by local inflammatory reactions that have been associated with an altered immune cell infiltration into the damaged nervous system (Keaney and Campbell, 2015; Ransohoff and Brown, 2012; Zlokovic, 2011). This phenomenon is critical for microglial regulation, a pivotal player in neuroinflammation, and has been involved in the progression of the neurodegenerative process (Boyko et al., 2017; González et al., 2014; McManus and Heneka, 2017). As a result, a new therapeutic approach consisting of modulating the peripheral immune function has emerged (Björkqvist et al., 2009).

Interestingly, alterations in peripheral immune responses have been identified in several neurodegenerative disorders, beginning with multiple sclerosis (Fakhoury, 2016), in which a clear participation of immune cells has been reported, but also in Alzheimer's disease (AD; Ciaramella et al., 2016; Gupta et al., 2018; Le Page et al., 2018; Ray et al., 2007), Huntington's disease (Björkqvist et al., 2008), Parkinson's disease (PD; Fuzzati-Armentero et al., 2019; Scherzer et al., 2007) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS; Liu and Wang, 2017; Zhao et al., 2017). Those alterations include changes in the distribution and activation of lymphocytes and macrophages (Lucin and Wyss-Coray, 2009), the latter usually presenting a pro-inflammatory phenotype in humans suffering from neurodegenerative disorders (González and Pacheco, 2014). Moreover, increased levels of pro-inflammatory cytokines have been detected both in blood and cerebrospinal fluid of patients with AD or PD (Boyko et al., 2017; Chen et al., 2018). In this sense, there is growing evidence for a close communication between immune and nervous systems (Busse et al., 2017; Dantzer, 2018; Giménez-Llort et al., 2012), implying that alterations in one of them affect the other. In fact, it has been suggested that inflammatory mediators generated during brain damage can migrate to the periphery and act on peripheral immune cells (Gupta et al., 2018; Le Page et al., 2018), contributing in this way to activate or recruit circulating lymphoid and myeloid cells (Ransohoff and Brown, 2012). Therefore, a better

comprehension of peripheral immune responses is becoming essential to understand neurodegenerative diseases and try to predict, halt or delay their progression.

In view of the above, we wanted to ascertain how peripheral immune cells are influenced by selective neurodegeneration and, thus, help to clarify their role in this pathological condition. As model of selective neurodegeneration we used the Purkinje Cell Degeneration (PCD) mouse, which holds a mutation in the *Ccp1* gene (also known as *Agtpbp1* or *Nnal*) that leads to the postnatal loss of specific neuronal populations, such as Purkinje cells in the cerebellum and mitral cells in the olfactory bulb (OB; Mullen et al., 1976; Wang and Morgan, 2007). Interestingly, these neurodegenerative events occur at different and well-defined periods of time. More precisely, Purkinje cell loss starts at postnatal day 18 (P18) and progresses quickly in such a way that at P25 about 50% of Purkinje cells in the vermis have degenerated, at P30 mainly survive in the nodulus (lobule X) and ventral side of the uvula (lobule IX), and at P40 only scarce Purkinje cells persist, most of them in lobule X (Mullen et al., 1976; Wang and Morgan, 2007). Besides, mitral cell degeneration in the OB begins around P60 and advances more slowly during two months (Greer and Shepherd, 1982; Valero et al., 2006). Therefore, the PCD mouse arises as a suitable model to study selective neurodegeneration.

In particular, we examined possible alterations at the central level, by exploring both the leukocyte infiltration and distribution, as well as at the peripheral level, by evaluating the phenotype of splenic leukocytes in the PCD mutant mouse, in comparison with wild-type (WT) animals. Additionally, in order to compare different neuroinflammatory scenarios, we used lipopolysaccharide (LPS) and gamma irradiation to generate two standard models of neuroinflammation in which an enhanced peripheral recruitment into the brain parenchyma has been described (Cazareth et al., 2014; Moravan et al., 2016; Morganti et al., 2014). Our findings showed specific effects on peripheral immune cells in the central nervous system caused by the degeneration of Purkinje cells, as well as intriguing alterations in the myeloid compartment at the peripheral level.



## 2. Methods

### 2.1. Animals

Both WT and PCD mice from the C57BL/DBA hybrid strain were used. These mice were obtained by mating C57BL/6J and DBA/2J strains, both originally purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Animals were separated into groups depending on their genotype and age at the time of analysis: P15, P20, P25, P30, P40 and P70 (n = 5 per age and genotype). These ages were chosen considering the neurodegenerative processes that occur in PCD mice (Mullen et al., 1976; Wang and Morgan, 2007). Additionally, we used other three groups of treated WT mice at P25: one received LPS and the others were gamma-irradiated (n = 5 per group). Mice were housed at the Animal Facilities of the University of Salamanca at constant temperature and relative 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., Barcelona, Spain). Animals were housed, handled and sacrificed following the guidelines established by European (Directive 2010/63/UE, Recommendation 2007/526/CE) and Spanish (Law 32/2007, RD 53/2013) legislation. All experiments were approved by the Bioethics Committee of the University of Salamanca (reference numbers: #00291 and #00344).

### 2.2. Genotyping

As PCD mice are not suitable for breeding (Wang and Morgan, 2007), the colony was kept by mating heterozygous animals, which are indistinguishable from their WT littermates. As a consequence, the offspring were genotyped by PCR as previously described (Díaz et al., 2012; Valero et al., 2006).

### 2.3. LPS administration and gamma irradiation

LPS-treated animals were administered with LPS at P24, while irradiated animals were exposed to radiation at P18 or P24. LPS (strain O26:B6, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was freshly dissolved in saline solution and injected intraperitoneally employing a dose of 2 mg/kg body weight, as used in other studies (Cazareth et al., 2014; Fu et al., 2014). Besides, irradiated animals received a

single dose of 3 Gy whole-body gamma irradiation that was supplied with a  $^{137}\text{Cs}$  source for mice (Gammacell 1000 Elite, 243 cGy/min, 0.662 MeV, MDS Nordion, Ottawa, Canada).

#### **2.4. Tissue preparation**

Mice were deeply anesthetized with 10  $\mu\text{l/g}$  body weight of 5% w/v chloral hydrate, and subsequently they were perfused intracardially with 0.9% w/v NaCl for 1 min, followed by Somogyi's fixative solution containing 4% w/v paraformaldehyde and 15% v/v saturated picric acid in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 (PB) for 15 min. Brains were dissected out and immersed in the same fixative for 2 h at room temperature. Then, they were rinsed with PB and cryoprotected with 30% w/v sucrose in PB overnight at 4 °C. Afterwards, cerebella and OBs were cut in 40- $\mu\text{m}$  sagittal or coronal sections respectively, by employing a freezing-sliding microtome (Jung SM 2000, Leica Instruments, Nussloch, Germany). Collected sections were rinsed with PB to remove fixative and sucrose residues. Finally, sections were immunostained in order to visualize the leukocytes.

#### **2.5. Immunofluorescent labeling**

Free-floating sections were washed with phosphate buffered saline, pH 7.4 (PBS; 3 x 10 min) and incubated for 72 h at 4 °C under continuous rotary shaking in a medium containing 0.2% v/v Triton X-100, 5% v/v normal donkey serum, and the primary antibodies: rat anti-CD45 (1:1000; MCA1388; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), rabbit anti-Iba1 (1:1000, 019-19741, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) or rabbit anti-CD3 (1:200; ab5690, Abcam, Cambridge, UK) in PBS. These antibodies were used to stain leukocytes (CD45), macrophages/microglia (Iba1) and T lymphocytes (CD3). Sections were washed with PBS (3 x 10 min) and then incubated in a second medium for 1 h and 30 min at room temperature under continuous rotary shaking. This second medium contained an appropriate secondary antibody conjugated to Cy2 or Cy3 (1:500; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Cambridge, UK) in PBS. Ten minutes before the end of the incubation, DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; Sigma-Aldrich) at 1:10,000 was added to the medium in order

to obtain a nuclear counterstain. Finally, the sections were rinsed with PBS, mounted on gelatin-coated slides and covered using a freshly prepared anti-fading mounting medium.

### ***2.6. Microscopy visualization and cell counting***

Sections were observed under an epifluorescence microscope Olympus Provis AX70 equipped with an Olympus DP70 digital camera (Olympus, Tokyo, Japan). Digital images were processed with Adobe Photoshop CC 2015 (Adobe Inc., San Jose, CA, USA) to slightly adjust contrast, brightness and color balance.

Leukocytes were manually counted after the observation of all the sections. For the cerebellar histological analyses, three sections of vermis per animal were chosen, where all cerebellar lobules were clearly seen and the degeneration occurs earlier (Wang and Morgan, 2007). Regarding the OB, central coronal sections were analyzed for comparisons, where both mitral cell and glomerular layers were clearly observed (Weruaga et al., 1999). All counts were performed by the same person (C.d.P.) and following the same criterion.

### ***2.7. Analysis of splenic subsets by flow cytometry***

For the exploration of peripheral immune cells, myeloid and lymphoid populations from four WT and four PCD spleens per age were analyzed by flow cytometry. As soon as mice were euthanized, their spleens were placed in Hibernate™ medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) until subsequent processing. A single-cell suspension was obtained from spleens by passing them through a 40 µm nylon cell strainer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). After that, red blood cells were lysed in ACK lysis buffer (0.83% w/v NH<sub>4</sub>Cl, 0.1% w/v KHCO<sub>3</sub>, 1 mM EDTA in distilled H<sub>2</sub>O, pH 7.4; Panreac Química, Barcelona, Spain). Then, 10<sup>6</sup> splenocytes were resuspended in 50 µl of staining buffer containing 25 mM HEPES, 2% v/v penicillin/streptomycin, and 10% v/v fetal bovine serum (Cultek, Madrid, Spain) in sterile PBS. Fc receptors were blocked with anti-CD16/CD32 antibodies (10 µg/ml; BD Biosciences) in staining buffer for 10 min at 4 °C. Thus, non-specific bonds between

Fc receptors presented on immune cells and the subsequent antibodies were interrupted. After blocking, cells were labeled for 30 min at 4 °C in the darkness employing 50 µl of staining buffer with the corresponding antibodies (see below). Splenocytes were washed twice with staining buffer, recovered by centrifugation at 1,500 rpm for 5 min at room temperature, resuspended in PBS and, finally, analyzed with a FACSCanto™ II cytometer (BD Biosciences). For the lymphoid subset analysis, we used the following anti-mouse antibodies: FITC-conjugated CD8 (5 µg/ml), PE-conjugated CD4 (2 µg/ml), Pacific Blue-conjugated CD3ε (4 µg/ml; BD Biosciences), PE-Cy5.5-conjugated CD25 (4 µg/ml) and APC-conjugated CD69 (4 µg/ml; Thermo Fisher Scientific). For the myeloid subset analysis, the following anti-mouse antibodies were used: FITC-conjugated Ly-6C (10 µg/ml), PE-conjugated Ly-6G (4 µg/ml), PerCP-Cy5.5-conjugated CD11b (4 µg/ml; BD Biosciences), PE-Cy7-conjugated MHC-II (4 µg/ml), APC-conjugated CD11c (4 µg/ml) and eFluor 450-conjugated F4/80 (4 µg/ml; Thermo Fisher Scientific). The data were analyzed with FACSDiva 6.1 (BD Biosciences) and FlowJo 7.6.4 software (TreeStar Inc., Ashland, OR, USA) from the Flow Cytometry service of the *Hospital Nacional de Paraplégicos*.

### **2.8. Statistical analysis**

All data are shown as mean ± standard error of the mean (SEM). Once normality had been checked with the Kolmogorov-Smirnov test, a two-way ANOVA test was employed when we compared WT and PCD groups at different ages. Once we checked that there was no interaction between age and genotype, we performed the Student's t-test in order to evaluate possible differences between PCD and WT mice within each age or one-way ANOVA and Bonferroni *post hoc* tests to evaluate differences between ages. In addition, one-way ANOVA test was used to compare several groups at the same age. In this case, Dunnett's *post hoc* test was performed to compare all the groups respecting the control one (WT or PCD mice). All analyses were performed with the IBM SPSS Statistical 25 software (IBM, Armonk, NY, USA).

### 3. Results

#### 3.1. Number of leukocytes in WT and PCD mouse olfactory bulb

Firstly, we investigated the effect of selective mitral cell loss on leukocyte infiltration. For that, we analyzed the number of leukocytes in OB sections from WT and PCD mice at P25, when the degeneration of mitral cells has not started, and P70, when the death of these cells is in progress (Valero et al., 2006).

Leukocytes (CD45-positive cells) were found in all bulb layers of both WT and PCD mice (Fig. 1A-D). No statistically significant differences were detected between WT and PCD mice neither at P25 ( $p = 0.154$ ) nor at P70 ( $p = 0.747$ ; Fig. 1E). Therefore, it seems that the neurodegenerative microenvironment in the OB of PCD mice does not trigger leukocyte infiltration.

#### 3.2. Amount and distribution of leukocytes in WT and PCD mouse cerebellum

Afterwards, we explored whether the severity of the inflammatory/degenerative process is important for leukocyte infiltration. To this end, we analyzed the number of leukocytes in the cerebellum, where a stronger neurodegenerative and inflammatory microenvironment exists in PCD animals (Baltanás et al., 2013). In this case, we employed WT and PCD mice at P15, P20, P25, P30 and P40, taking into account the temporal progression of the degeneration afflicting PCD mice.

As in the OB, leukocytes were found in all cerebellar layers of both WT and PCD mice (Fig. 2A-C). However, in this case, the quantitative analysis showed up a statistically significant increase in the number of leukocytes in PCD mice exclusively at P25 ( $p = 0.017$ ) and P30 ( $p = 0.027$ ), when compared with WT ones (Fig. 2D). Both ages correspond to advanced neurodegenerative stages in PCD mice. This is indicative that the degree of the neurodegenerative process in a given brain area is related to the extent of cell recruitment.

Besides, at P20 a striking peak in the number of leukocytes appeared in both WT and PCD mice (Fig. 2D), which was statistically higher in relation to the rest of ages in WT mice ( $p = 0.038$  for P20 vs.

P15,  $p = 0.002$  for P20 vs. P25,  $p = 0.004$  for P20 vs. P30, and  $p < 0.001$  for P20 vs. P40). This is probably connected with developmental refinements occurring in the cerebellum at this age.

Given that the number of leukocytes in the cerebellum was not as limited as in the OB, we considered it appropriate to assess their distribution within the different layers of the cerebellar cortex and the underlying white matter. For this evaluation, we studied the molecular and Purkinje cell layers together (ML+PCL) -where Purkinje cell dendritic arbors and somas are located- and, separately, the granular layer and the white matter (GL+WM). The percentage of leukocytes was notably higher in ML+PCL in PCD mice with regard to WT mice at P20 ( $p = 0.003$ ), P25 ( $p = 0.002$ ) and P30 ( $p = 0.019$ ), i.e., throughout the cerebellar degenerative process (Fig. 2E). The results concerning the percentage of leukocytes in GL+WM were the opposite (Fig. 2F). All these data suggest that the loss of Purkinje cells modifies the infiltration pattern of peripheral immune cells.

### ***3.3. Amount, distribution and characterization of leukocytes in the mouse cerebellum under several neuroinflammatory scenarios***

Next, we wanted to compare the effect of selective cerebellar neurodegeneration on the recruitment and distribution of leukocytes with other types of brain inflammation. Thus, we compared the following experimental paradigms: lack of inflammation (WT), inflammation associated with selective neurodegeneration (PCD), inflammation induced by LPS and inflammation induced by gamma radiation. The objective of this comparison was to ascertain whether the previously observed effects are specifically due to the degeneration of Purkinje cells. All groups were studied at P25, when the greatest difference in leukocyte infiltration and distribution between WT and PCD mice was appreciated.

There was an evident decrease in the number of leukocytes in the cerebellum of irradiated animals with respect to WT mice, regardless of the time elapsed from irradiation to tissue analysis, either 1 day ( $p = 0.002$ ) or 7 days ( $p = 0.017$ ) after treatment (Fig. 3A). By contrast, leukocyte infiltration increased dramatically in LPS-treated mice respecting WT animals ( $p < 0.001$ ; Fig. 3A). These results

point to moderate whole-body irradiation or LPS as potential agents to hamper or facilitate leukocyte infiltration into the cerebellum, respectively.

As noted above, leukocytes in PCD mice clearly tended to localize in those layers of the cerebellar cortex mostly affected by Purkinje cell degeneration in relation to WT mice (Fig. 3B,C). Interestingly, this phenomenon was not observed in LPS-treated and irradiated mice (Fig. 3B,C). In fact, LPS-mediated inflammation even induced an opposite, albeit slighter, effect on the leukocyte disposition, towards the innermost layers of the cerebellum ( $p = 0.032$ ). If we compare PCD mice respecting the others, it is even more evident the differential effect on leukocyte distribution ( $p = 0.002$  for WT mice,  $p < 0.001$  for irradiated and LPS-treated mice; Fig. 3B,C). Altogether, these findings ratify that the selective degeneration of Purkinje cells triggers a specific attractive effect on peripheral leukocytes.

Additionally, we wanted to characterize the leukocytes in all these experimental groups. In particular, we studied the percentage of T cells ( $CD3^+/CD45^+$  cells; Fig. 3D-F) and monocytes ( $Iba1^+/CD45^+$  cells; Fig. 3H-J) in these scenarios, since they constitute the main peripheral immune populations that enter the brain parenchyma under neuronal damage (González and Pacheco, 2014; Solleiro-Villavicencio and Rivas-Arancibia, 2018). No statistical changes could be observed in the percentage of T cells among the experimental groups (one-way ANOVA  $p$ -value = 0.476; Fig. 3G). Regarding the monocyte population, there was a significant increase in the percentage of monocytes in both irradiated groups in comparison with WT animals ( $p = 0.025$  and  $p = 0.032$  for 1 day and 7 days post-irradiation, respectively), which was even higher in LPS-treated mice ( $p < 0.001$ ; Fig. 3K). In contrast, no differences between PCD and WT animals were detected ( $p = 0.465$ ; Fig. 3K). These findings suggest that Purkinje cell degeneration does not alter the ratio of infiltrated T cells or monocytes in the cerebellar parenchyma as other less specific neuroinflammatory models do.

Although we did not identify variations in the percentage of both T cells and monocytes in the cerebellum of PCD mice in comparison with WT ones, we wanted to finalize this study by researching possible temporal changes throughout the degenerative process of mutant animals (Fig. 4). In both cases, interaction between age and genotype was detected (two-way ANOVA:  $p = 0,090$  for T cells, and  $p = 0,003$  for monocytes). Accordingly, we will just describe the results alluding to their graphic representation. In WT animals, the percentage of T cells and monocytes remained constant over time (Fig. 4). On the contrary, in PCD mice the percentage of T cells presented some fluctuations at P15 and P30 (Fig. 4A). Regarding the percentage of monocytes, a remarkable increase in PCD mice was identified between P15 and P20, which reverted rapidly (Fig. 4B). This could well mean that initial stages of the neurodegenerative process induce a prompt and transient attraction of monocytes to the mutant cerebellum. Altogether, these results reflect certain alterations in two of the main leukocyte types that can be found in the central nervous system, before and during the degeneration of Purkinje cells in PCD mice.

### **3.4. Phenotypic analysis of peripheral immune cells**

Finally, as the degeneration of Purkinje neurons exerted a special influence on the recruitment of immune cells, we decided to explore whether the phenotype of these cells is also altered during the cerebellar degeneration. For that, the percentage of several leukocyte populations was evaluated by flow cytometry, as well as the mean fluorescence intensity (MFI) of diverse myeloid and lymphoid markers. The analyzed cells were obtained from both WT and PCD spleens at P15, P20, P30 and P40. To ease the comprehension only the significant results will be presented, which correspond to the myeloid compartment (CD11b<sup>+</sup> cells). Accordingly, all the percentages were provided with respect to CD11b<sup>+</sup> cells.

On the one hand, we found a lower percentage of several myeloid cell subsets. For instance, inflammatory monocytes, known as Ly-6C<sup>high</sup> (CD11b<sup>+</sup> Ly-6G<sup>-/low</sup> Ly-6C<sup>high</sup>), displayed a significant reduction in PCD mice at P15 ( $p = 0.015$ ; Fig. 5A,B), before the Purkinje cell degeneration has begun.



Interestingly, there were no differences in the other ages studied (data not shown). Furthermore, the percentage of dendritic cells (CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup>) and macrophages (CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup>) showed variations between the two animal groups. In the case of dendritic cells, a reduction was statistically significant at P15 ( $p = 0.034$ ) and P30 ( $p = 0.011$ ; Fig. 5C,D), while macrophages presented a generalized reduction from P15 to P30, although it was only statistically significant at P20 ( $p = 0.033$ ; Fig. 5E,F).

On the other hand, in PCD animals several alterations in the MFI of markers related to antigen presentation and functional maturity of myeloid cells were detected. In this sense, antigen-presenting cells (CD11b<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup>) displayed a significantly reduced surface expression of MHC-II in PCD mice from P15 to P30 ( $p = 0.009$  at P15,  $p = 0.048$  at P20,  $p = 0.045$  at P30; Fig. 6A,B). Besides, the MFI of both F4/80 and MHC-II was down-regulated in macrophages (Fig. 6C-F), at P20 ( $p = 0.033$ ) and P30 ( $p = 0.042$ ) for F4/80, and at P30 for MHC-II ( $p = 0.006$ ). Moreover, a significant decrease of the MFI of both CD11c and MHC-II was detected in dendritic cells at P20 ( $p = 0.040$ ) and P30 ( $p = 0.032$ ), respectively (Fig. 6G-J). Altogether, these findings reflect alterations in the peripheral myeloid compartment during the Purkinje cell degeneration that may also appear prior to the beginning of the neurodegenerative processes.

#### 4. Discussion

The purpose of this study was to investigate how selective neurodegeneration and its associated inflammation influence peripheral immune cells. To this end, we analyzed the presence and distribution of leukocytes in the central nervous system of PCD and WT mice, as well as their phenotype at the peripheral level in the spleen. PCD mouse was the chosen model of neurodegeneration since it experiences the selective death of specific neuronal populations in different regions and at well-defined moments (Mullen et al., 1976; Wang and Morgan, 2007). Another point in favor of studying with PCD mice is that analogous mutations have recently been discovered in humans, showing very similar

symptoms (Karakaya et al., 2019; Shashi et al., 2018; Sheffer et al., 2019). Moreover, we employed two models of general brain damage, one induced by a physical agent (gamma radiation) and the other by a biological agent (LPS), with the aim of comparing the inflammation of PCD mice (due to a selective neuronal death) with other standardized neuroinflammatory scenarios.

The selective neurodegeneration afflicting the PCD mouse cerebellum induced a specific attractive effect on leukocytes towards the cerebellar layers where dendritic arbors and somas of Purkinje cells are located, namely the molecular and Purkinje cell layers. These data are in agreement with the distribution adopted by reactive microglial cells in the cerebellar cortex of PCD mice, which are mainly located in the Purkinje cell and molecular layers (Baltanás et al., 2013; Kyuhou et al., 2006). Furthermore, a widespread inflammation/damage either did not alter the cerebellar leukocyte distribution (irradiated animals) or even prompted an opposite effect (LPS-treated animals). The latter may be linked to the fact that the innermost layers are more densely populated by microglial cells (Vela et al., 1995), which constitute the main source of inflammatory mediators. Altogether, these facts further corroborated the specific attractive effect caused by the degeneration of Purkinje cells.

In parallel, our research highlights the importance of the severity of the neurodegenerative process and its associated inflammation on leukocyte recruitment. In this regard, a larger amount of leukocytes was found in the PCD cerebellum, where an exacerbated reactive gliosis occurs accompanied by oligodendrocyte apoptosis (Baltanás et al., 2013). By contrast, no differences were detected between WT and PCD OBs. This may be related to the slower degenerative process and the balanced reactive gliosis occurring in this brain region, where, in addition, the death of oligodendrocytes is not provoked (Baltanás et al., 2013).

Surprisingly, at P20 we noticed an outstanding rise in the number of leukocytes in both WT and PCD cerebella. Therefore, this phenomenon does not seem to be connected with the neurodegeneration,

but it is probably associated with neurodevelopmental processes. Moreover, previous data of our laboratory demonstrate behavioral alterations in both genotypes at a similar age (Muñoz-Castañeda et al., 2018). Indeed, around this age, a strong process of synaptic remodeling is happening in the mouse cerebellum, affecting both mossy fibers and climbing fibers, which constitute the main inputs to the cerebellar cortex, as well as parallel fiber-Purkinje cell and interneuron-Purkinje cell synapses (Kano et al., 2018; van Welie et al., 2011; White and Sillitoe, 2013). Interestingly, it has been described that leukocytes are involved in several functions during brain development (Tanabe and Yamashita, 2018). Specifically, T lymphocytes promote the establishment of inhibitory synapses, which are particularly numerous in the cerebellum (Beckinghausen and Sillitoe, 2019), through the action of  $\text{INF-}\gamma$  (Tanabe and Yamashita, 2018). In particular,  $\text{INF-}\gamma$  prevents the formation of excitatory synapses and facilitates inhibitory synapses in GABAergic neurons (Filiano et al., 2016; Kim et al., 2002).

Brain exposition to radiation triggers inflammatory reactions, characterized by a rapid glial and endothelial activation, the up-regulation of multiple pro-inflammatory cytokines and the blood-brain barrier disruption (Lumniczky et al., 2017; Moravan et al., 2011; Sándor et al., 2014). As a consequence, a larger immune cell infiltration has been demonstrated, specifically in areas directly exposed to the radiation beam (Burrell et al., 2012; Moravan et al., 2016; Morganti et al., 2014). We found, however, a significant decrease in the amount of leukocytes in the irradiated mice. These apparently contrasting results can be readily explained if we consider the differences in the radiation methodology. Whereas the researchers who found an increased infiltration employed cranial irradiation, we used whole-body irradiation. It has been proved that doses of radiation similar to ours cause immune cell apoptosis, being lymphocytes the most sensitive population (Bogdándi et al., 2010). Consequently, we propose that radiation induced apoptosis of circulating cells in the irradiated mice, causing the observed decline of infiltrated leukocytes into the cerebellum. Moreover, a partial recovery of the immune cells 7 days after irradiation has been described by the same study (Bogdándi et al.,

2010) and, interestingly, we saw a lower reduction of leukocytes -i.e., a recovery in their number- 7 days than 1 day after irradiation.

The cerebellar neurodegenerative environment of PCD mice did not seem to cause a noticeable blood-brain barrier disruption, considering the light increase in the infiltrated leukocytes in comparison with LPS-treated mice. In addition, there were very few monocytes in the PCD cerebellum, just like in WT mice, at least during the advanced phases of the cerebellar degeneration. This fact supports our hypothesis, since infiltrated monocytes are only observed when the blood-brain barrier is impaired (Prinz et al., 2017), and not under physiological conditions (Ajami et al., 2007; Gomez Perdiguero et al., 2015). Unlike what happens in WT and PCD mice, in LPS-treated animals approximately half of the leukocytes were monocytes. Indeed, it has been demonstrated that LPS not only induces the release of several pro-inflammatory cytokines in the central nervous system, such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and CCL-2 (Catorce and Gevorkian, 2016; Cazareth et al., 2014; Fu et al., 2014; Lopes, 2016; Qin et al., 2007), but also facilitates the opening of the blood-brain barrier (Banks et al., 2015; Varatharaj and Galea, 2017; Zhou et al., 2014). Irradiated animals also exhibited a significant increase in the percentage of monocytes, which reflects an alteration of their blood-brain barrier as a consequence of the exposition to radiation. Also, it has been reported that CCL-2 is overexpressed, a chemokine which appears to be essential for monocyte infiltration after irradiation (Moravan et al., 2016; Morganti et al., 2014).

Lastly, after analyzing the temporal infiltration of T cells and monocytes, it was revealed that in WT animals – without neurodegenerative processes- the percentage of both cell types remains constant over time. By contrast, neuronal death in PCD mice provoked evident fluctuations both in T cells and monocytes. In both cases, fluctuations seem to stabilize toward the final stages of neurodegeneration.

In relation to T cells, alterations in their infiltration have been described in several models of neurodegeneration (Brochard et al., 2009; Browne et al., 2013; Evans et al., 2013; Sommer et al., 2017; Solleiro-Villavicencio and Rivas-Arancibia, 2018; Correale et al., 2019; Williams et al., 2020). However, the precise role of infiltrated T cells is quite heterogeneous, since their phenotypic and functional profile depends on both the type and the stage of the neurodegenerative disease under consideration (González and Pacheco, 2014; Sommer et al., 2017). In addition, diverse subtypes of T cells have been implicated in the pathophysiology of these diseases. Thus, Th1 and Th17 cells appear to contribute to neuroinflammation and perpetuate neurodegenerative processes, whereas Th2 and Treg attenuate the neuroinflammatory response and promote a neuroprotective environment (González and Pacheco, 2014; Solleiro-Villavicencio y Rivas-Arancibia, 2018). Therefore, effects exerted by T cells become diametrically opposed and, by extension, their overall response is highly complex. In any case, it is evident that the behavior of this type of leukocytes is affected by the cerebellar neurodegeneration.

In the case of monocytes, an increase at P15 and P20 in PCD mice was clearly noticeable respecting WT mice. This fact means that, if there is any alteration in the blood-brain barrier of PCD mice, this occurs transiently at the early phases of the death of Purkinje cells or even before. Interestingly, a similar event was previously observed in the same animal model, but with regard to the neurodegenerative environment of the OB (Recio et al., 2011). In this study, it was shown an increase in the integration of Iba1<sup>+</sup> cells derived from the bone marrow in the OB of PCD mice at P60 –when the loss of mitral cells begins–, in comparison with WT mice. However, such increase disappeared at more advanced stages. Thus, although it would be necessary a more profound investigation about the blood-brain barrier of PCD mice, if there is an alteration, it must occur in an early and transient manner, since monocytes diminished quickly at P25. In connection with these results, it has been detected a lower number of monocytes in peripheral blood of ALS patients that seems to correlate with their recruitment into the central nervous system. This phenomenon precisely becomes patent at

the initial stage of the disease (Zondler et al., 2016; Baufeld et al., 2018). Such monocytic invasion could play a protective function, at least during the beginning of this pathology (Zondler et al., 2016). We cannot know if the early increase of infiltrated monocytes in PCD mice is exerting any function, but it may be linked to the peripheral variation of Ly-6C<sup>high</sup> cells (see below).

Concerning the peripheral immune system, it has been proved that neurodegeneration and neuroinflammation are capable of altering both innate and adaptive responses (Fuzzati-Armentero et al., 2019; González and Pacheco, 2014; Gupta et al., 2018; Lucin and Wyss-Coray, 2009; Solleiro-Villavicencio and Rivas-Arancibia, 2018). In this context, intriguing results were obtained in relation to the phenotypic analysis of peripheral immune cells of PCD animals. In general, a reduced expression of several immune markers were detected in specific myeloid populations of PCD mice during the degeneration of Purkinje cells or even before. In particular, macrophages and dendritic cells were the most clearly affected populations, presenting a diminished capability of antigen presentation and a reduced maturity, as reflected by a reduction in the MFI of F4/80, CD11c and MHC-II, the phenotypic markers of macrophages, dendritic cells and antigen-presenting cells, respectively. It would be conceivable to find a more activated immune system as a result of a peripheral inflammatory response to brain injury (Marcet et al., 2017) or neurodegeneration (Björkqvist et al., 2008; Boyko et al., 2017) but, surprisingly, we detected a worse myeloid functionality. Despite this, our results share similarities with other studies, which precisely have reported alterations in myeloid cells. Thus, monocytes derived from AD patients exhibited both an impaired differentiation into macrophages and a limited phagocytic activity (Fiala et al., 2005; Jairani et al., 2019), which is the first step in the process of antigen presentation. Likewise, neutrophils isolated from AD patients displayed a diminished ability to phagocytize and destroy pathogens (Davydova et al., 2003; Le Page et al., 2017). Furthermore, dendritic cells were reduced in peripheral blood from patients with AD or PD. Interestingly, this descent was related to the severity of the symptoms (Ciaramella et al., 2016; Ciaramella et al., 2013). As a consequence of this compromised innate immune response, we propose that PCD mice are

highly likely to present a higher predisposition to develop infections by opportunistic pathogens, as it has been previously suggested for neurodegenerative diseases (Gupta et al., 2018; Le Page et al., 2017).

Despite these similarities, it is plausible to think that the immune alterations observed in PCD mice are linked to *Ccp1*, the gene mutated in these animals, which encodes cytosolic carboxypeptidase 1 (CCP1; Berezniuk et al., 2012). CCP1 is essential for the stabilization of microtubules (Muñoz-Castañeda et al., 2018) and it is synthesized in multiple tissues and cell types, including immune cells (Liu et al., 2017), which means that the disturbances observed in peripheral myeloid cells could be due to the *Ccp1* mutation. Interestingly, a recent study has proved that the deficiency of CCP1 or its homologous CCP6 promotes somatic cell reprogramming or, in other words, prevents cell differentiation (Ye et al., 2018). In addition, a previous report by the same authors revealed that *Ccp6*<sup>-/-</sup> mice present underdeveloped megakaryocytes which give rise to dysfunctional platelets (Ye et al., 2014). Thus, it would be reasonable to consider that the *Ccp1* mutation is directly involved in the immune cell alterations observed in PCD mice. Although these arguments may explain these striking results, we cannot discard that the neurodegenerative process is also directly involved, since those alterations appear to reverse at P40, when the Purkinje cell death is virtually concluded (Mullen et al., 1976; Wang and Morgan, 2007). Hence, further studies are required to accurately explain the immaturity exhibited by these myeloid cells in PCD mice.

Apart from a partial block in myeloid maturation, we found a lower percentage of Ly-6C<sup>high</sup> cells in PCD mice only at P15, before the onset of the death of Purkinje cells. Precisely, at this age, ultrastructural and morphological changes begin to be evident in the Purkinje cells of PCD mice (Baltanás et al., 2011a; Baltanás et al., 2011b; Landis and Mullen, 1978; Muñoz-Castañeda et al., 2018). This may be connected with the increase of monocytes observed in the cerebellum of PCD mice at P15 and P20, since Ly-6C<sup>high</sup> are traditionally considered as pro-inflammatory monocytes with a high invasiveness capacity in different CNS diseases as multiple sclerosis, ALS or stroke (Butovsky et al.,

2012; Khan et al., 2016; King et al., 2009). On the other hand, Ly-6C<sup>high</sup> cells have been defined as a highly plastic cell population that, depending on the clinical moment of each disease, may behave as pro-inflammatory or even as alternatively activated immunosuppressive cells with a powerful regulatory role over the adaptive immune response (Giles et al., 2018; Melero-Jerez et al., 2019; Moliné-Velázquez et al., 2011). In this sense, a decrease in the number of this regulatory myeloid cell type may be a sign of an exacerbated pro-inflammatory immune response with profound neurodegenerative consequences (Bok et al., 2018). This is a very interesting phenomenon, since the level of Ly-6C<sup>high</sup> cells could be used as an early biomarker of the development of this selective neurodegeneration in PCD mice. Precisely, the concept that peripheral immune processes can function as biomarkers for neurodegenerative diseases has recently emerged, in view of the growing evidence supporting their involvement in the pathogenesis of these disorders (Ciaramella et al., 2016; Le Page et al., 2018). Therefore, the study of peripheral immune components could become a very useful tool for monitoring the progress of these diseases, as well as to measure the therapeutic potential of different treatments (Björkqvist et al., 2009; Boyko et al., 2017), thus avoiding more complex or invasive explorations involving the central nervous system.

## 5. Conclusions

Our findings show that the selective death of Purkinje cells induces a specific attractive effect on leukocytes within the cerebellum of PCD mice. Additionally, our research highlights that the inflammatory state associated to a neurodegenerative process constitutes a key factor for cell homing and, thus, it must be considered when applying cell therapy against these devastating disorders. In parallel, we identified peripheral immune alterations in our mouse model, which may be responsible for an increased susceptibility to infections. Finally, we hope that the data presented here will help to shed light on the role of peripheral immune cells in neurodegeneration, and encourage the use of immune cells as a new diagnostic tool or even a therapeutic approach for neurodegenerative diseases.



### Abbreviations

AD: Alzheimer's disease; ALS: amyotrophic lateral sclerosis; CCP1: cytosolic carboxypeptidase 1; DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole; GL: granular layer; LPS: lipopolysaccharide; MFI: mean fluorescence intensity; ML: molecular layer; OB: olfactory bulb; PB: phosphate buffer; PBS: phosphate buffered saline; PCD: Purkinje Cell Degeneration; PCL: Purkinje cell layer; PD: Parkinson's disease; SEM: standard error of the mean; WM: white matter; WT: wild-type.

### Acknowledgements

We thank María Sánchez for technical assistance in animal handling and genotyping, Dr. Virginia Vila-del Sol for technical assistance in flow cytometry and Dr. Emma Keck for language editing.

### Authors' contributions

CdP, DD, DC and EW conceived the study and designed the experiments; CdP and RL-G performed the experiments; CdP, DD, RL-G, DC, JRA, EW interpreted the data; CdP was a major contributor in writing the paper and organizing all the figures. All authors critically revised and approved the final manuscript.

### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

### Funding

This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO; SAF2016-79668-R), the Regional Government of Castile and Leon (SA030P17), the University of Salamanca and the Instituto de Salud Carlos III (PI15/00963; PI18/00357; partially co-financed by F.E.D.E.R., European Union, “*Una manera de hacer Europa*”). DC and RL-G, are hired by SESCAM. CdP holds a predoctoral grant by the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities (FPU14/02963).

**References**

- Ajami, B., Bennett, J.L., Krieger, C., Tetzlaff, W., Rossi, F.M., 2007. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci* 10, 1538-1543.
- Baltanás, F.C., Berciano, M.T., Valero, J., Gómez, C., Díaz, D., Alonso, J.R., Lafarga, M., Weruaga, E., 2013. Differential glial activation during the degeneration of Purkinje cells and mitral cells in the PCD mutant mice. *Glia* 61, 254-272.
- Baltanás, F.C., Casafont, I., Lafarga, V., Weruaga, E., Alonso, J.R., Berciano, M.T., Lafarga, M., 2011a. Purkinje cell degeneration in pcd mice reveals large scale chromatin reorganization and gene silencing linked to defective DNA repair. *J Biol Chem* 286, 28287-28302.
- Baltanás, F.C., Casafont, I., Weruaga, E., Alonso, J.R., Berciano, M.T., Lafarga, M., 2011b. Nucleolar disruption and cajal body disassembly are nuclear hallmarks of DNA damage-induced neurodegeneration in purkinje cells. *Brain Pathol* 21, 374-388.
- Banks, W.A., Gray, A.M., Erickson, M.A., Salameh, T.S., Damodarasamy, M., Sheibani, N., Meabon, J.S., Wing, E.E., Morofuji, Y., Cook, D.G., Reed, M.J., 2015. Lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier disruption: roles of cyclooxygenase, oxidative stress, neuroinflammation, and elements of the neurovascular unit. *J Neuroinflammation* 12, 223.
- Baufeld, C., O'Loughlin, E., Calcagno, N., Madore, C., Butovsky, O., 2018. Differential contribution of microglia and monocytes in neurodegenerative diseases. *J Neural Transm (Vienna)* 125, 809-826.
- Beckinghausen, J., Sillitoe, R.V., 2019. Insights into cerebellar development and connectivity. *Neurosci Lett* 688, 2-13.
- Berezniuk, I., Vu, H.T., Lyons, P.J., Sironi, J.J., Xiao, H., Burd, B., Setou, M., Angeletti, R.H., Ikegami, K., Fricker, L.D., 2012. Cytosolic carboxypeptidase 1 is involved in processing alpha- and beta-tubulin. *J Biol Chem* 287, 6503-6517.

- Björkqvist, M., Wild, E.J., Tabrizi, S.J., 2009. Harnessing immune alterations in neurodegenerative diseases. *Neuron* 64, 21-24.
- Björkqvist, M., Wild, E.J., Thiele, J., Silvestroni, A., Andre, R., Lahiri, N., Raibon, E., Lee, R.V., Benn, C.L., Soulet, D., Magnusson, A., Woodman, B., Landles, C., Pouladi, M.A., Hayden, M.R., Khalili-Shirazi, A., Lowdell, M.W., Brundin, P., Bates, G.P., Leavitt, B.R., Möller, T., Tabrizi, S.J., 2008. A novel pathogenic pathway of immune activation detectable before clinical onset in Huntington's disease. *J Exp Med* 205, 1869-1877.
- Bogdándi, E.N., Balogh, A., Felgyinszki, N., Szatmári, T., Persa, E., Hildebrandt, G., Sáfrány, G., Lumniczky, K., 2010. Effects of low-dose radiation on the immune system of mice after total-body irradiation. *Radiat Res* 174, 480-489.
- Bok, E., Chung, Y.C., Kim, K.S., Baik, H.H., Shin, W.H., Jin, B.K., 2018. Modulation of M1/M2 polarization by capsaicin contributes to the survival of dopaminergic neurons in the lipopolysaccharide-lesioned substantia nigra in vivo. *Exp Mol Med* 50, 76.
- Boyko, A.A., Troyanova, N.I., Kovalenko, E.I., Sapozhnikov, A.M., 2017. Similarity and Differences in Inflammation-Related Characteristics of the Peripheral Immune System of Patients with Parkinson's and Alzheimer's Diseases. *Int J Mol Sci* 18.
- Brochard, V., Combadière, B., Prigent, A., Laouar, Y., Perrin, A., Beray-Berthat, V., Bonduelle, O., Alvarez-Fischer, D., Callebert, J., Launay, J.M., Duyckaerts, C., Flavell, R.A., Hirsch, E.C., Hunot, S., 2009. Infiltration of CD4<sup>+</sup> lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. *J Clin Invest* 119, 182-192.
- Browne, T.C., McQuillan, K., McManus, R.M., O'Reilly, J.A., Mills, K.H., Lynch, M.A., 2013. IFN- $\gamma$  production by amyloid  $\beta$ -specific Th1 cells promotes microglial activation and increases plaque burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Immunol* 190, 2241-2251.
- Burrell, K., Hill, R.P., Zadeh, G., 2012. High-resolution in-vivo analysis of normal brain response to cranial irradiation. *PLoS One* 7, e38366.

- Busse, M., Michler, E., von Hoff, F., Dobrowolny, H., Hartig, R., Frodl, T., Busse, S., 2017. Alterations in the Peripheral Immune System in Dementia. *J Alzheimers Dis* 58, 1303-1313.
- Butovsky, O., Siddiqui, S., Gabriely, G., Lanser, A.J., Dake, B., Murugaiyan, G., Doykan, C.E., Wu, P.M., Gali, R.R., Iyer, L.K., Lawson, R., Berry, J., Krichevsky, A.M., Cudkowicz, M.E., Weiner, H.L., 2012. Modulating inflammatory monocytes with a unique microRNA gene signature ameliorates murine ALS. *J Clin Invest* 122, 3063-3087.
- Catorce, M.N., Gevorkian, G., 2016. LPS-induced Murine Neuroinflammation Model: Main Features and Suitability for Pre-clinical Assessment of Nutraceuticals. *Curr Neuropharmacol* 14, 155-164.
- Cazareth, J., Guyon, A., Heurteaux, C., Chabry, J., Petit-Paitel, A., 2014. Molecular and cellular neuroinflammatory status of mouse brain after systemic lipopolysaccharide challenge: importance of CCR2/CCL2 signaling. *J Neuroinflammation* 11, 132.
- Chen, X., Hu, Y., Cao, Z., Liu, Q., Cheng, Y., 2018. Cerebrospinal Fluid Inflammatory Cytokine Aberrations in Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Immunol* 9, 2122.
- Ciaramella, A., Salani, F., Bizzoni, F., Orfei, M.D., Caltagirone, C., Spalletta, G., Bossù, P., 2016. Myeloid dendritic cells are decreased in peripheral blood of Alzheimer's disease patients in association with disease progression and severity of depressive symptoms. *J Neuroinflammation* 13, 18.
- Ciaramella, A., Salani, F., Bizzoni, F., Pontieri, F.E., Stefani, A., Pierantozzi, M., Assogna, F., Caltagirone, C., Spalletta, G., Bossu, P., 2013. Blood dendritic cell frequency declines in idiopathic Parkinson's disease and is associated with motor symptom severity. *PLoS One* 8, e65352.
- Correale, J., Marrodan, M., Ysraelit, M.C., 2019. Mechanisms of Neurodegeneration and Axonal Dysfunction in Progressive Multiple Sclerosis. *Biomedicines* 7.

- Dantzer, R., 2018. Neuroimmune Interactions: From the Brain to the Immune System and Vice Versa. *Physiol Rev* 98, 477-504.
- Davydova, T.V., Fomina, V.G., Voskresenskaya, N.I., Doronina, O.A., 2003. Phagocytic activity and state of bactericidal systems in polymorphonuclear leukocytes from patients with Alzheimer's disease. *Bull Exp Biol Med* 136, 355-357.
- Díaz, D., Recio, J.S., Weruaga, E., Alonso, J.R., 2012. Mild cerebellar neurodegeneration of aged heterozygous PCD mice increases cell fusion of Purkinje and bone marrow-derived cells. *Cell Transplant* 21, 1595-1602.
- Evans, M.C., Couch, Y., Sibson, N., Turner, M.R., 2013. Inflammation and neurovascular changes in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Cell Neurosci* 53, 34-41.
- Fakhoury, M., 2016. Immune-mediated processes in neurodegeneration: where do we stand? *J Neurol* 263, 1683-1701.
- Fiala, M., Lin, J., Ringman, J., Kermani-Arab, V., Tsao, G., Patel, A., Lossinsky, A.S., Graves, M.C., Gustavson, A., Sayre, J., Sofroni, E., Suárez, T., Chiappelli, F., Bernard, G., 2005. Ineffective phagocytosis of amyloid-beta by macrophages of Alzheimer's disease patients. *J Alzheimers Dis* 7, 221-232; discussion 255-262.
- Filiano, A.J., Xu, Y., Tustison, N.J., Marsh, R.L., Baker, W., Smirnov, I., Overall, C.C., Gadani, S.P., Turner, S.D., Weng, Z., Peerzade, S.N., Chen, H., Lee, K.S., Scott, M.M., Beenhakker, M.P., Litvak, V., Kipnis, J., 2016. Unexpected role of interferon-gamma in regulating neuronal connectivity and social behaviour. *Nature* 535, 425-429.
- Fu, H.Q., Yang, T., Xiao, W., Fan, L., Wu, Y., Terrando, N., Wang, T.L., 2014. Prolonged neuroinflammation after lipopolysaccharide exposure in aged rats. *PLoS One* 9, e106331.
- Fuzzati-Armentero, M.T., Cerri, S., Blandini, F., 2019. Peripheral-Central Neuroimmune Crosstalk in Parkinson's Disease: What Do Patients and Animal Models Tell Us? *Front Neurol* 10, 232.

- Giles, D.A., Washnock-Schmid, J.M., Duncker, P.C., Dahlawi, S., Ponath, G., Pitt, D., Segal, B.M., 2018. Myeloid cell plasticity in the evolution of central nervous system autoimmunity. *Ann Neurol* 83, 131-141.
- Giménez-Llort, L., Maté, I., Manassra, R., Vida, C., de la Fuente, M., 2012. Peripheral immune system and neuroimmune communication impairment in a mouse model of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1262, 74-84.
- Gómez Perdigüero, E., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., Azzoni, E., Crozet, L., Garner, H., Trouillet, C., de Bruijn, M.F., Geissmann, F., Rodewald, H.R., 2015. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* 518, 547-551.
- González, H., Elgueta, D., Montoya, A., Pacheco, R., 2014. Neuroimmune regulation of microglial activity involved in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *J Neuroimmunol* 274, 1-13.
- González, H., Pacheco, R., 2014. T-cell-mediated regulation of neuroinflammation involved in neurodegenerative diseases. *J Neuroinflammation* 11, 201.
- Greer, C.A., Shepherd, G.M., 1982. Mitral cell degeneration and sensory function in the neurological mutant mouse Purkinje cell degeneration (PCD). *Brain Res* 235, 156-161.
- Gupta, P., Sil, S., Ghosh, R., Ghosh, A., Ghosh, T., 2018. Intracerebroventricular A $\beta$ -Induced Neuroinflammation Alters Peripheral Immune Responses in Rats. *J Mol Neurosci* 66, 572-586.
- Jairani, P.S., Aswathy, P.M., Krishnan, D., Menon, R.N., Verghese, J., Mathuranath, P.S., Gopala, S., 2019. Apolipoprotein E Polymorphism and Oxidative Stress in Peripheral Blood-Derived Macrophage-Mediated Amyloid-Beta Phagocytosis in Alzheimer's Disease Patients. *Cell Mol Neurobiol* 39, 355-369.
- Kano, M., Watanabe, T., Uesaka, N., Watanabe, M., 2018. Multiple Phases of Climbing Fiber Synapse Elimination in the Developing Cerebellum. *Cerebellum* 17, 722-734.

- Karakaya, M., Paketci, C., Altmueller, J., Thiele, H., Hoelker, I., Yis, U., Wirth, B., 2019. Biallelic variant in AGTPBP1 causes infantile lower motor neuron degeneration and cerebellar atrophy. *Am J Med Genet A* 179, 1580-1584.
- Keaney, J., Campbell, M., 2015. The dynamic blood–brain barrier. *The FEBS Journal* 282, 4067-4079.
- Khan, M.A., Schultz, S., Othman, A., Fleming, T., Lebrón-Galán, R., Rades, D., Clemente, D., Nawroth, P.P., Schwaninger, M., 2016. Hyperglycemia in Stroke Impairs Polarization of Monocytes/Macrophages to a Protective Noninflammatory Cell Type. *J Neurosci* 36, 9313-9325.
- Kim, I.J., Beck, H.N., Lein, P.J., Higgins, D., 2002. Interferon gamma induces retrograde dendritic retraction and inhibits synapse formation. *J Neurosci* 22, 4530-4539.
- King, I.L., Dickendesher, T.L., Segal, B.M., 2009. Circulating Ly-6C<sup>+</sup> myeloid precursors migrate to the CNS and play a pathogenic role during autoimmune demyelinating disease. *Blood* 113, 3190-3197.
- 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.
- Landis, S.C., Mullen, R.J., 1978. The development and degeneration of Purkinje cells in pcd mutant mice. *J Comp Neurol* 177, 125-143.
- Le Page, A., Dupuis, G., Frost, E.H., Larbi, A., Pawelec, G., Witkowski, J.M., Fulop, T., 2018. Role of the peripheral innate immune system in the development of Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* 107, 59-66.
- Le Page, A., Lamoureux, J., Bourgade, K., Frost, E.H., Pawelec, G., Witkowski, J.M., Larbi, A., Dupuis, G., Fulop, T., 2017. Polymorphonuclear Neutrophil Functions are Differentially Altered in Amnesic Mild Cognitive Impairment and Mild Alzheimer's Disease Patients. *J Alzheimers Dis* 60, 23-42.

- Liu, B., Ye, B., Zhu, X., Huang, G., Yang, L., Zhu, P., Du, Y., Wu, J., Meng, S., Tian, Y., Fan, Z., 2017. IL-7/Ralpha glutamylation and activation of transcription factor Sall3 promote group 3 ILC development. *Nat Commun* 8, 231.
- Liu, J., Wang, F., 2017. Role of Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Cellular Mechanisms and Therapeutic Implications. *Front Immunol* 8, 1005.
- Lopes, P.C., 2016. LPS and neuroinflammation: a matter of timing. *Inflammopharmacology* 24, 291-293.
- Lucin, K.M., Wyss-Coray, T., 2009. Immune activation in brain aging and neurodegeneration: too much or too little? *Neuron* 64, 110-122.
- Lumniczky, K., Szatmari, T., Safrany, G., 2017. Ionizing Radiation-Induced Immune and Inflammatory Reactions in the Brain. *Front Immunol* 8, 517.
- Marcet, P., Santos, N., Borlongan, C.V., 2017. When friend turns foe: central and peripheral neuroinflammation in central nervous system injury. *Neuroimmunol Neuroinflamm* 4, 82-92.
- McManus, R.M., Heneka, M.T., 2017. Role of neuroinflammation in neurodegeneration: new insights. *Alzheimers Res Ther* 9, 14.
- Melero-Jerez, C., Suardíaz, M., Lebrón-Galán, R., Marín-Banasco, C., Oliver-Martos, B., Machín-Díaz, I., Fernández, O., de Castro, F., Clemente, D., 2019. The presence and suppressive activity of myeloid-derived suppressor cells are potentiated after interferon-beta treatment in a murine model of multiple sclerosis. *Neurobiol Dis* 127, 13-31.
- Moliné-Velázquez, V., Cuervo, H., Vila-Del Sol, V., Ortega, M.C., Clemente, D., de Castro, F., 2011. Myeloid-derived suppressor cells limit the inflammation by promoting T lymphocyte apoptosis in the spinal cord of a murine model of multiple sclerosis. *Brain Pathol* 21, 678-691.
- Moravan, M.J., Olschowka, J.A., Williams, J.P., O'Banion, M.K., 2011. Cranial irradiation leads to acute and persistent neuroinflammation with delayed increases in T-cell infiltration and CD11c expression in C57BL/6 mouse brain. *Radiat Res* 176, 459-473.



- Moravan, M.J., Olschowka, J.A., Williams, J.P., O'Banion, M.K., 2016. Brain radiation injury leads to a dose- and time-dependent recruitment of peripheral myeloid cells that depends on CCR2 signaling. *J Neuroinflammation* 13, 30.
- Morganti, J.M., Jopson, T.D., Liu, S., Gupta, N., Rosi, S., 2014. Cranial irradiation alters the brain's microenvironment and permits CCR2+ macrophage infiltration. *PLoS One* 9, e93650.
- Mullen, R.J., Eicher, E.M., Sidman, R.L., 1976. Purkinje cell degeneration, a new neurological mutation in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 208-212.
- Muñoz-Castañeda, R., Díaz, D., Peris, L., Andrieux, A., Bosc, C., Muñoz-Castañeda, J.M., Janke, C., Alonso, J.R., Moutin, M.J., Weruaga, E., 2018. Cytoskeleton stability is essential for the integrity of the cerebellum and its motor- and affective-related behaviors. *Sci Rep* 8, 3072.
- Prinz, M., Emy, D., Hagemeyer, N., 2017. Ontogeny and homeostasis of CNS myeloid cells. *Nat Immunol* 18, 385-392.
- Qin, L., Wu, X., Block, M.L., Liu, Y., Breese, G.R., Hong, J.S., Knapp, D.J., Crews, F.T., 2007. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia* 55, 453-462.
- Ransohoff, R.M., Brown, M.A., 2012. Innate immunity in the central nervous system. *J Clin Invest* 122, 1164-1171.
- Ray, S., Britschgi, M., Herbert, C., Takeda-Uchimura, Y., Boxer, A., Blennow, K., Friedman, L.F., Galasko, D.R., Jutel, M., Karydas, A., Kaye, J.A., Leszek, J., Miller, B.L., Minthon, L., Quinn, J.F., Rabinovici, G.D., Robinson, W.H., Sabbagh, M.N., So, Y.T., Sparks, D.L., Tabaton, M., Tinklenberg, J., Yesavage, J.A., Tibshirani, R., Wyss-Coray, T., 2007. Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins. *Nat Med* 13, 1359-1362.

- Recio, J.S., Álvarez-Dolado, M., Díaz, D., Baltanás, F.C., Piquer-Gil, M., Alonso, J.R., Weruaga, E., 2011. Bone marrow contributes simultaneously to different neural types in the central nervous system through different mechanisms of plasticity. *Cell Transplant* 20, 1179-1192.
- Sándor, N., Walter, F.R., Bocsik, A., Sántha, P., Schilling-Tóth, B., Léner, V., Varga, Z., Kahán, Z., Deli, M.A., Sáfrány, G., Hegyesi, H., 2014. Low dose cranial irradiation-induced cerebrovascular damage is reversible in mice. *PLoS One* 9, e112397.
- Scherzer, C.R., Eklund, A.C., Morse, L.J., Liao, Z., Locascio, J.J., Fefer, D., Schwarzschild, M.A., Schlossmacher, M.G., Hauser, M.A., Vance, J.M., Sudarsky, L.R., Standaert, D.G., Growdon, J.H., Jensen, R.V., Gullans, S.R., 2007. Molecular markers of early Parkinson's disease based on gene expression in blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 955-960.
- Shashi, V., Magiera, M.M., Klein, D., Zaki, M., Schoch, K., Rudnik-Schöneborn, S., Norman, A., Lopes Abath Neto, O., Dusl, M., Yuan, X., Bartesaghi, L., De Marco, P., Alfares, A.A., Marom, R., Arold, S.T., Guzmán-Vega, F.J., Pena, L.D., Smith, E.C., Steinlin, M., Babiker, M.O., Mohassel, P., Foley, A.R., Donkervoort, S., Kaur, R., Ghosh, P.S., Stanley, V., Musaev, D., Nava, C., Mignot, C., Keren, B., Scala, M., Tassano, E., Picco, P., Doneda, P., Fiorillo, C., Issa, M.Y., Alassiri, A., Alahmad, A., Gerard, A., Liu, P., Yang, Y., Ertl-Wagner, B., Kranz, P.G., Wentzensen, I.M., Stucka, R., Stong, N., Allen, A.S., Goldstein, D.B., Schoser, B., Rösler, K.M., Alfadhel, M., Capra, V., Chrast, R., Strom, T.M., Kamsteeg, E.J., Bönnemann, C.G., Gleeson, J.G., Martini, R., Janke, C., Senderek, J., Network, U.D., 2018. Loss of tubulin deglutamylase CCP1 causes infantile-onset neurodegeneration. *EMBO J* 37.
- Sheffer, R., Gur, M., Brooks, R., Salah, S., Daana, M., Fraenkel, N., Eisenstein, E., Rabie, M., Nevo, Y., Jalas, C., Elpeleg, O., Edvardson, S., Harel, T., 2019. Biallelic variants in *AGTPBP1*, involved in tubulin deglutamylation, are associated with cerebellar degeneration and motor neuropathy. *Eur J Hum Genet* 27, 1419-1426.

- Solleiro-Villavicencio, H., Rivas-Arancibia, S., 2018. Effect of Chronic Oxidative Stress on Neuroinflammatory Response Mediated by CD4. *Front Cell Neurosci* 12, 114.
- Sommer, A., Winner, B., Prots, I., 2017. The Trojan horse - neuroinflammatory impact of T cells in neurodegenerative diseases. *Mol Neurodegener* 12, 78.
- Tanabe, S., Yamashita, T., 2018. The role of immune cells in brain development and neurodevelopmental diseases. *Int Immunol* 30, 437-444.
- Valero, J., Berciano, M.T., Weruaga, E., Lafarga, M., Alonso, J.R., 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.
- van Welie, I., Smith, I.T., Watt, A.J., 2011. The metamorphosis of the developing cerebellar microcircuit. *Current Opinion in Neurobiology* 21, 245-253.
- Varatharaj, A., Galea, I., 2017. The blood-brain barrier in systemic inflammation. *Brain Behav Immun* 60, 1-12.
- Vela, J.M., Dalmau, I., González, B., Castellano, B., 1995. Morphology and distribution of microglial cells in the young and adult mouse cerebellum. *J Comp Neurol* 361, 602-616.
- Wang, T., Morgan, J.I., 2007. The Purkinje cell degeneration (pcd) mouse: an unexpected molecular link between neuronal degeneration and regeneration. *Brain Res* 1140, 26-40.
- Weruaga, E., Briñón, J.G., Barbado, V., Aijón, J., Alonso, J.R., 1999. A standardized model for the anatomical division of the rodent olfactory bulb. *Eur. J. Anat.* 3, 27-34.
- White, J.J., Sillitoe, R.V., 2013. Development of the cerebellum: from gene expression patterns to circuit maps. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 2, 149-164.
- Williams, G.P., Marmion, D.J., Schonhoff, A.M., Jurkuvenaite, A., Won, W.J., Standaert, D.G., Kordower, J.H., Harms, A.S., 2020. T cell infiltration in both human multiple system atrophy and a novel mouse model of the disease. *Acta Neuropathol* 139, 855-874.

- Ye, B., Li, C., Yang, Z., Wang, Y., Hao, J., Wang, L., Li, Y., Du, Y., Hao, L., Liu, B., Wang, S., Xia, P., Huang, G., Sun, L., Tian, Y., Fan, Z., 2014. Cytosolic carboxypeptidase CCP6 is required for megakaryopoiesis by modulating Mad2 polyglutamylation. *J Exp Med* 211, 2439-2454.
- Ye, B., Liu, B., Hao, L., Zhu, X., Yang, L., Wang, S., Xia, P., Du, Y., Meng, S., Huang, G., Qin, X., Wang, Y., Yan, X., Li, C., Hao, J., Zhu, P., He, L., Tian, Y., Fan, Z., 2018. Klf4 glutamylation is required for cell reprogramming and early embryonic development in mice. *Nat Commun* 9, 1261.
- Zhao, W., Beers, D.R., Hooten, K.G., Sieglaff, D.H., Zhang, A., Kalyana-Sundaram, S., Traini, C.M., Halsey, W.S., Hughes, A.M., Sathe, G.M., Livi, G.P., Fan, G.H., Appel, S.H., 2017. Characterization of Gene Expression Phenotype in Amyotrophic Lateral Sclerosis Monocytes. *JAMA Neurol* 74, 677-685.
- Zhou, T., Zhao, L., Zhan, R., He, Q., Tong, Y., Tian, X., Wang, H., Zhang, T., Fu, Y., Sun, Y., Xu, F., Guo, X., Fan, D., Han, H., Chui, D., 2014. Blood-brain barrier dysfunction in mice induced by lipopolysaccharide is attenuated by dapsone. *Biochem Biophys Res Commun* 453, 419-424.
- Zlokovic, B.V., 2011. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat Rev Neurosci* 12, 723-738.
- Zondler, L., Müller, K., Khalaji, S., Bliedehäuser, C., Ruf, W.P., Grozdanov, V., Thiemann, M., Fundel-Clemes, K., Freischmidt, A., Holzmann, K., Strobel, B., Weydt, P., Witting, A., Thal, D.R., Hefnerich, A.M., Hengerer, B., Gottschalk, K.E., Hill, O., Kluge, M., Ludolph, A.C., Danzer, K.M., Weishaupt, J.H., 2016. Peripheral monocytes are functionally altered and invade the CNS in ALS patients. *Acta Neuropathol* 132, 391-411.

## Figure legends

**Fig. 1.** Leukocyte infiltration into the OB of WT and PCD mice. **A-D:** Immunolabeling for CD45 showing leukocytes in the different layers of the OB of a PCD mouse. **E:** Chart showing the quantification of leukocytes per OB section at P25, when the death of mitral cells has not started in PCD mice, and at P70, when the mitral cell loss is in progress. In this case, no differences were detected between WT and PCD mice. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. GL, glomerular layer; EPL, external plexiform layer; MCL, mitral cell layer; IPL, internal plexiform layer; GCL, granule cell layer. Scale bar: 25  $\mu$ m.

**Fig. 2.** Leukocyte infiltration and distribution in the cerebellum of WT and PCD mice. **A-C:** Immunolabeling for CD45 showing leukocytes in the different layers of the cerebellar cortex of a PCD mouse. **D:** Chart showing the quantification of leukocytes per section of cerebellar vermis. **E-F:** Graphs showing the proportional distribution of leukocytes in molecular and Purkinje cell layers (**E**) or granular layer plus the underlying white matter (**F**). Note that differences in both the quantification and distribution were detected when the degeneration of Purkinje cells is in progress (from P20 to P30). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ . GL, granular layer; PCL, Purkinje cell layer; ML, molecular layer. Scale bar: 25  $\mu$ m.

**Fig. 3.** Leukocyte characterization in the cerebellum of different animal models of neuroinflammation. **A:** Quantification of the number of leukocytes per section of cerebellar vermis. In this case, data were displayed in logarithmic scale to provide a better visualization, since the number of leukocytes in LPS-treated mice was much higher than in the other groups. **B-C:** Distribution of leukocytes in ML + PCL (**B**) and GL + WM (**C**); note the remarkably differential distribution of leukocytes in PCD mice. **D-F:** Immunolabeling for CD3 (red) and CD45 (green) of a T cell in the molecular layer of a PCD mouse. **G:** Percentage of T cells in the cerebellum. **H-J:** Immunolabeling for Iba1 (red) and CD45 (green) of a monocyte in the molecular layer of a LPS-treated mouse. Arrow: microglial cells,

which were negatively marked with CD45. **K:** Percentage of monocytes in the cerebellum; note that radiation-induced or LPS-induced inflammation triggered monocyte infiltration, that was very low in both WT and PCD mice. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ , regarding WT mice; ## $p < 0.01$ , regarding PCD mice. Scale bar: 25  $\mu$ m.

**Fig. 4.** Temporal analysis of the percentage of T cells and monocytes in the cerebellum of WT and PCD mice. **A:** Graph showing the percentage of T cells. **B)** Graph showing the percentage of monocytes. The crossing between lines in both charts is indicative of the interaction between the factors analyzed. Note the fluctuations over time in PCD animals, while WT mice showed a relatively constant percentage of T cells and monocytes throughout the whole period studied. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM.

**Fig. 5.** Flow cytometry analysis of the percentage of different myeloid subsets in the spleen of WT and PCD mice. **A, C, E:** Representative dot plots showing the Ly-6C<sup>high</sup> cell (**A**), dendritic cell (**C**) and macrophage (**E**) content within the whole myeloid population. **B, D, F:** Charts showing the percentage of the Ly-6C<sup>high</sup> cells (**B**), dendritic cells (**D**) and macrophages (**F**) within the myeloid population. Note that PCD mice presented an overall reduction of the percentage of several myeloid populations. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ .

**Fig. 6.** Flow cytometry analysis of the MFI of different myeloid markers in the spleen of WT and PCD mice. **A, C, E, G, I:** Representative histograms showing the distribution of the fluorescence intensity of several myeloid markers: MHC-II within the whole antigen-presenting cell population (**A**), F4/80 and MHC-II respect to the whole macrophage subset (**C, E**), and CD11c and MHC-II respect to the whole dendritic cell population (**G, I**). **B, D, F, H, J:** Charts showing the MFI of the markers and populations described in **A, C, E, G, I**. Note that myeloid cells of PCD mice exhibited a general reduction of the MFI of several myeloid markers. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

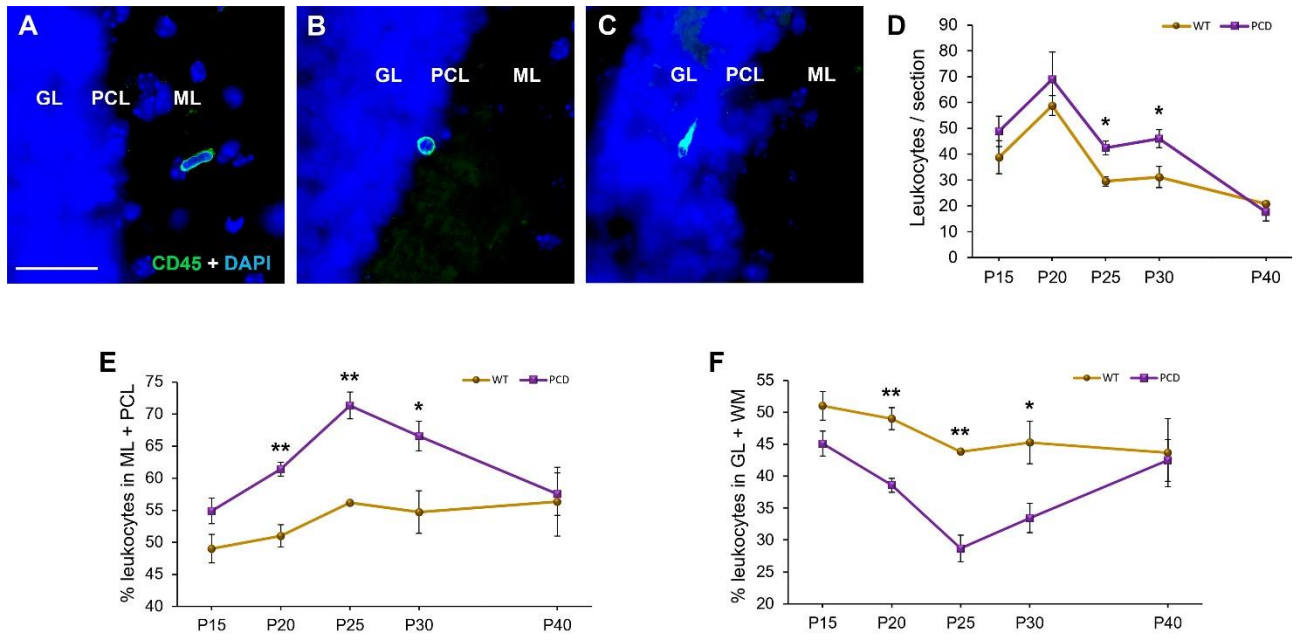


Figure 1

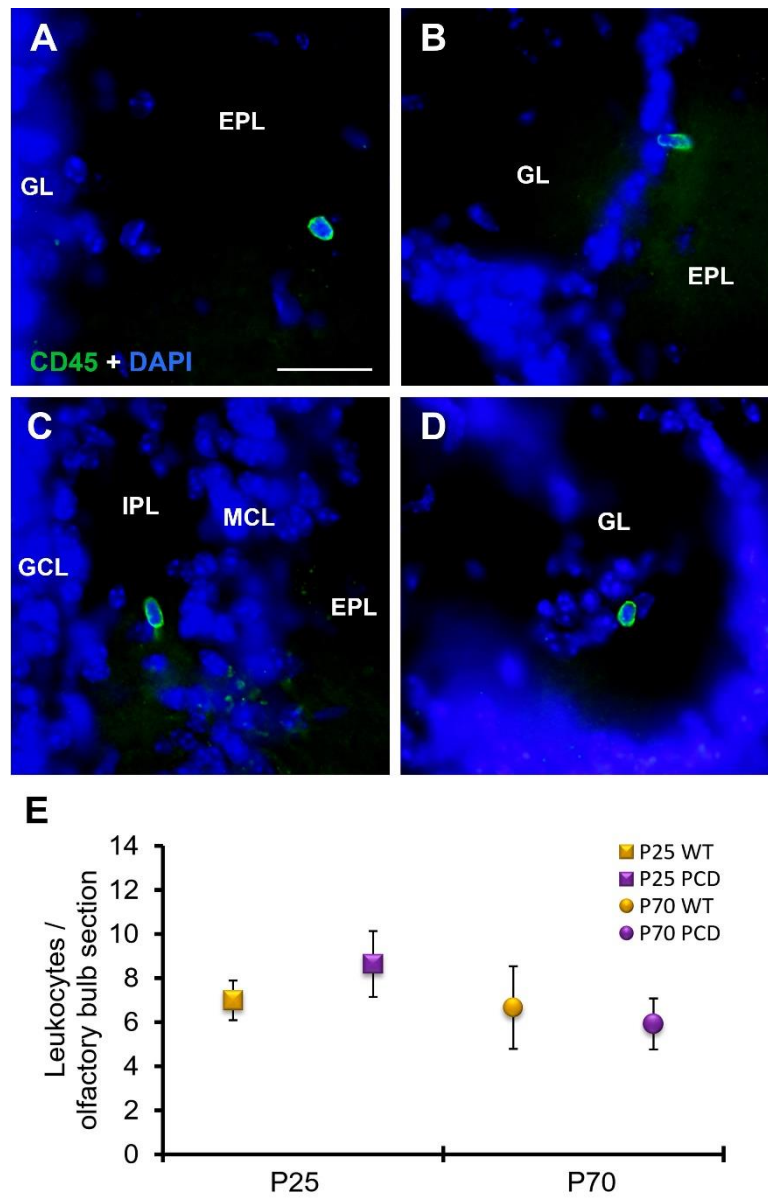


Figure 2



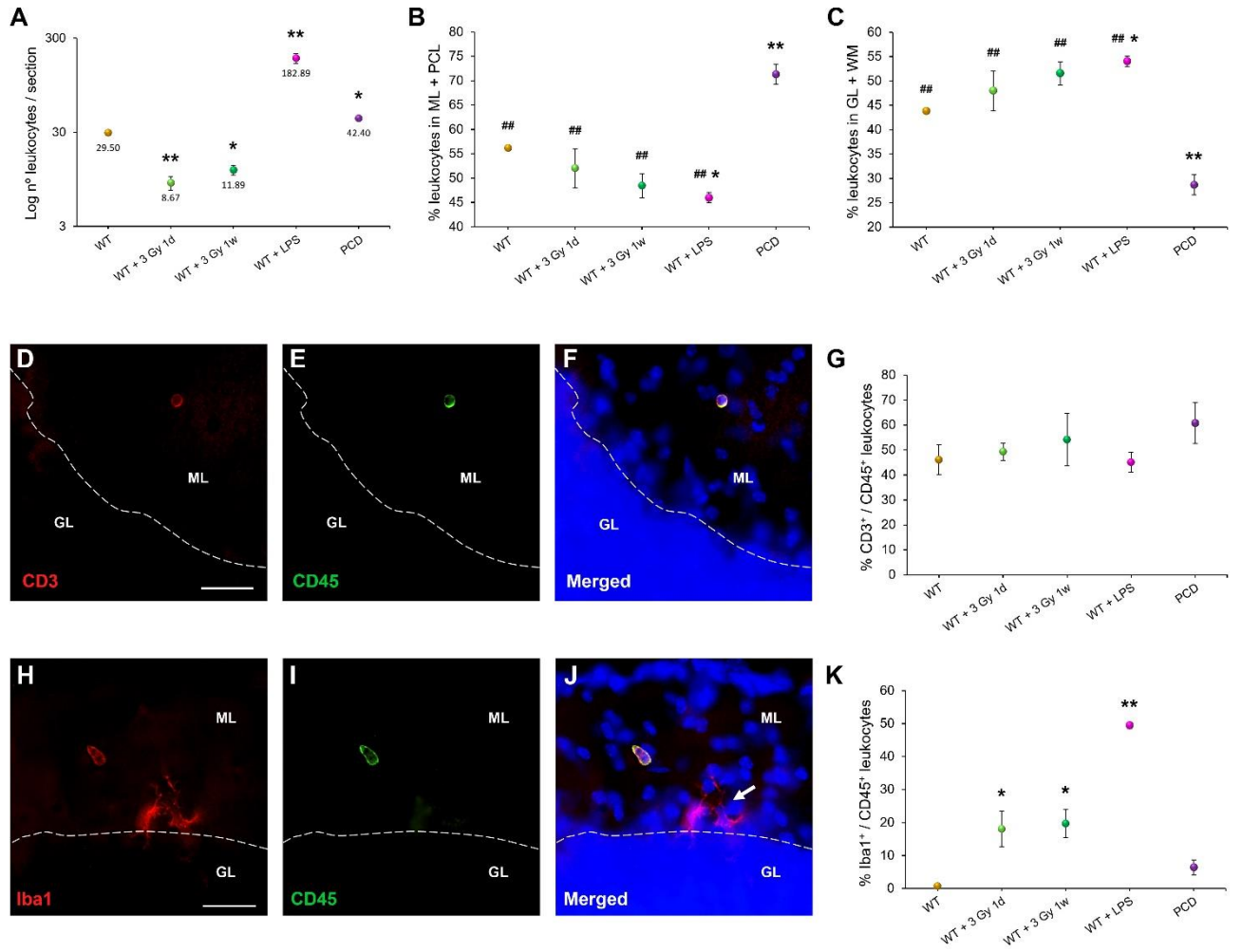


Figure 3

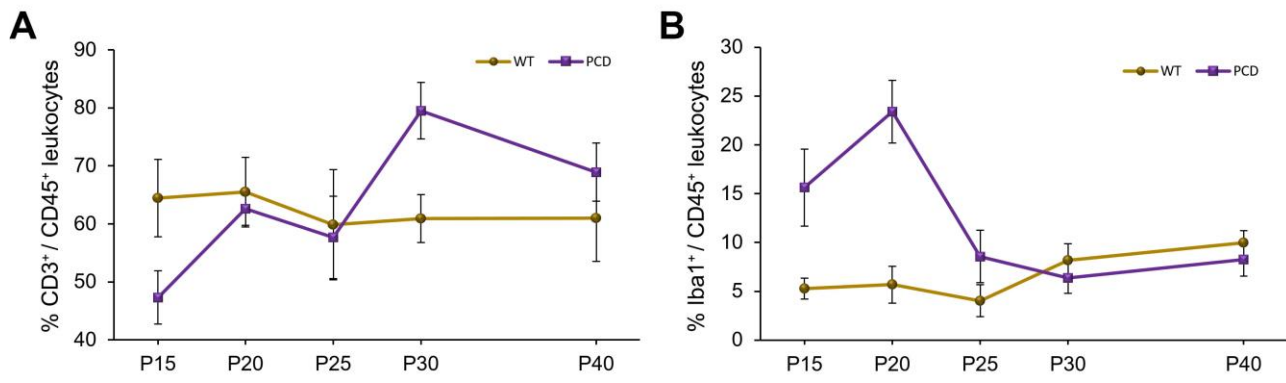


Figure 4

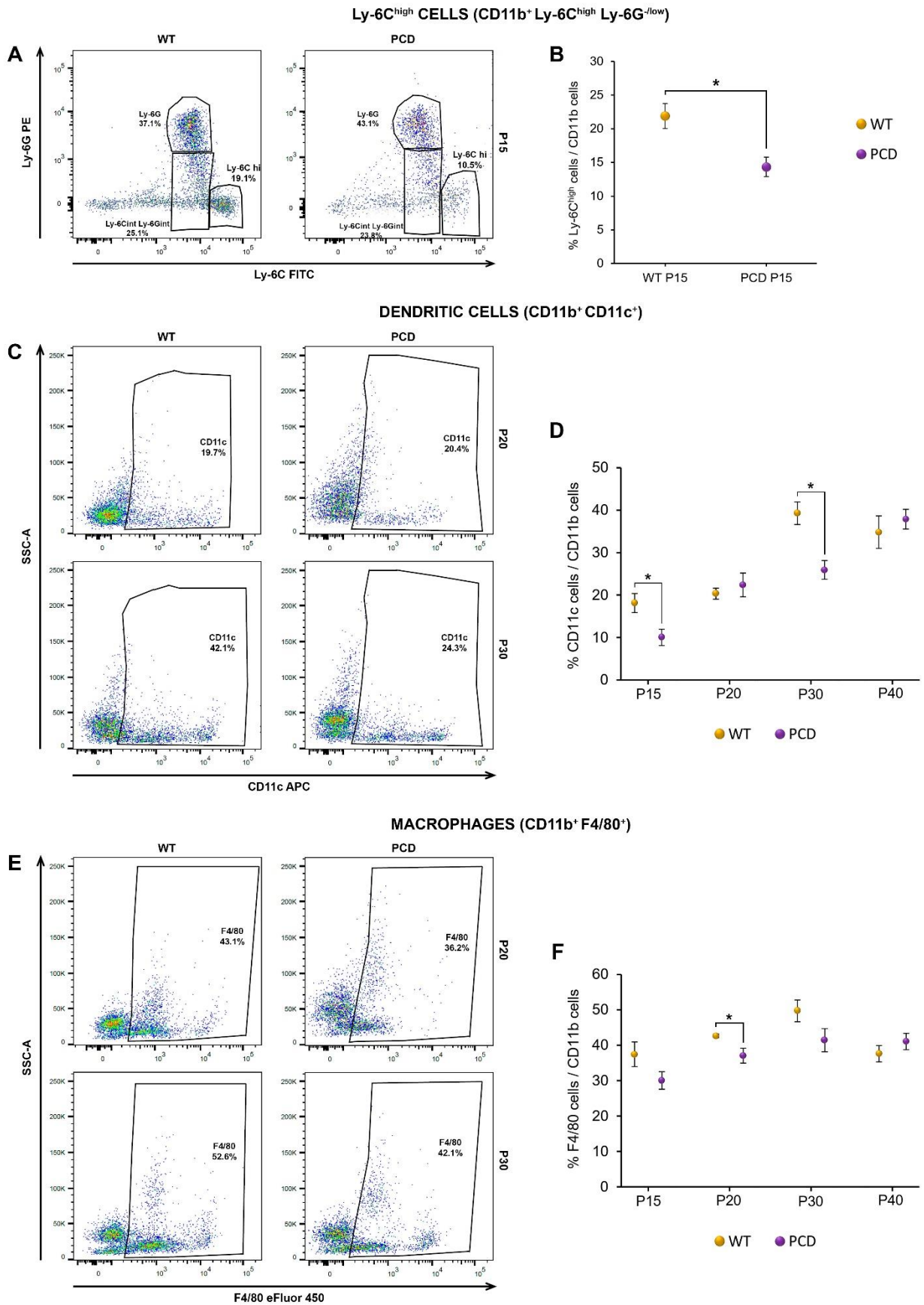


Figure 5

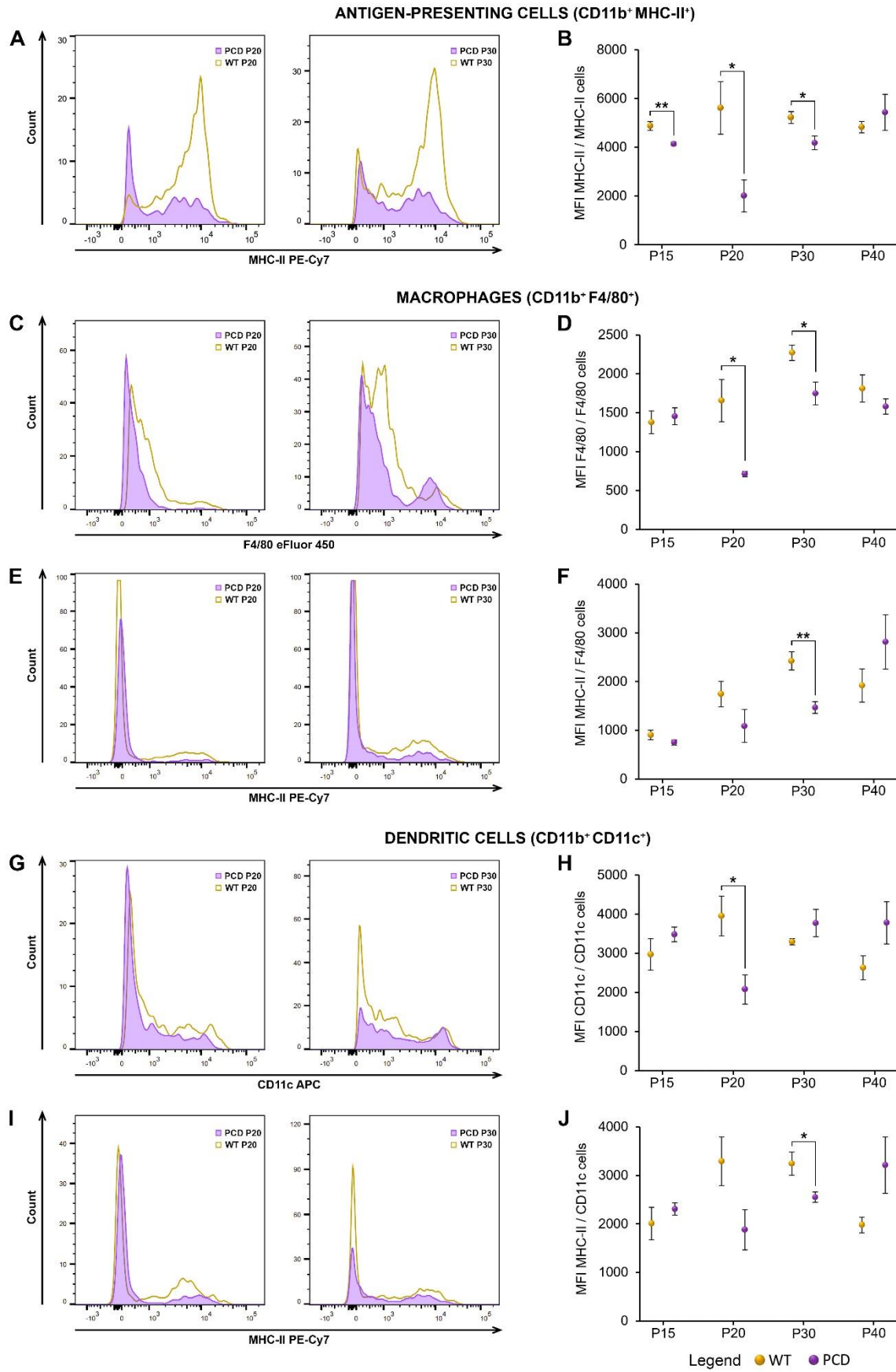


Figure 6

## INTRACEREBELLAR INJECTION OF IMMATURE MYELOID CELLS PREVENTS THE ADVERSE EFFECTS CAUSED BY STEREOTACTIC SURGERY IN A MOUSE MODEL OF ATAXIA

Carlos del Pilar <sup>1,2</sup>, David Díaz <sup>1,2</sup>, Rafael Lebrón-Galán <sup>3</sup>, Diego Clemente <sup>3</sup>, José Ramón Alonso <sup>1,2,4</sup>, Eduardo Weruaga <sup>1,2, CA</sup>

1. INCyL, Institute for Neuroscience of Castile and Leon, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain.
2. IBSAL, Institute of Biomedical Research of Salamanca, Salamanca, Spain.
3. Grupo de Neuroinmuno-Reparación, Hospital Nacional de Parapléjicos, Finca La Peraleda s/n, 45071 Toledo, Spain.
4. Universidad de Tarapacá, Arica, Chile.

**CA**Corresponding author: Dr. Eduardo Weruaga, Institute for Neuroscience of Castile and Leon, Universidad de Salamanca, C/ Pintor Fernando Gallego 1, E-37007, Salamanca, Spain; e-mail: ewp@usal.es; phone: +34 923 294500 ext. 5324; fax: + 34 923 294750.

**Keywords:** selective neurodegeneration, neuroinflammation, immune cell modulation, cell therapy, surgical brain injury.

## Introduction

The regenerative capacity of the central nervous system is very limited, which has supposed an enormous challenge for the development of effective therapies to cope with neurodegenerative diseases (Chen et al., 2018). Stem cells have emerged as promising agents in an attempt to replace lost neurons or glial cells as well as promote a neuroprotective environment (Dantuma et al., 2010; Díaz et al., 2019; Lindvall and Kokaia, 2010). In particular, bone marrow-derived stem cells constitute one of the most attractive and suitable source because they can be obtained easily, possess neuroprotective and immunomodulatory properties and, additionally, are capable of integrating physiologically into multiple tissues, including the central nervous system (Díaz et al., 2015; Díaz et al., 2018; Jones et al., 2010; Saiwai et al., 2013).

Recently, within the pool of bone marrow cells, a new cell type with immunomodulatory properties has been described: the myeloid-derived suppressor cells (MDSCs), which eventually derive from immature myeloid cells (IMCs) under inflammatory conditions (Gabrilovich and Nagaraj, 2009; Gabrielovich et al., 2012). MDSCs are mainly characterized for their extraordinary ability to inhibit T-cell functions (Gimeno and Barquinero, 2011; Nagaraj and Gabrielovich, 2008). Apart from this, they can also modulate other myeloid populations, such as dendritic cells and macrophages/microglia (Hosomi et al., 2019; Ostrand-Rosenberg et al., 2012), the latter being a pivotal player in the acquisition and/or the development of most neurological disorders (Du et al., 2017; González et al., 2014; Kim and de Vellis, 2005). More precisely, monocytic MDSCs, a subset of MDSCs (see below), skew macrophages/microglia toward a neuroprotective phenotype (commonly known as M2) through cytokines, primarily IL-10 (Bunt et al., 2009; Hosomi et al., 2019; Sinha et al., 2007).

MDSCs are subdivided into two main groups: monocytic and granulocytic or polymorphonuclear (Movahedi et al., 2008; Youn et al., 2008). The former controls immune responses in a wide manner, mainly through the combined action of arginase-1 and inducible nitric oxide synthase, and by releas-

ing reactive nitrogen species and cytokines (Gabrilovich et al., 2012). Moreover, it has been demonstrated by immunosuppression assays that monocytic MDSCs have a greater suppressive potential than polymorphonuclear MDSCs, both *in vitro* and *in vivo* (Dolcetti et al., 2010; Movahedi et al., 2008). Another interesting difference is that polymorphonuclear MDSCs exhibit a higher sensitivity to cryopreservation (Trellakis et al., 2013). This is an additional pro for using monocytic MDSCs, especially considering a translational point of view, since the main source of MDSCs in humans is peripheral blood, which is frozen and stored in many cases (Pawelec et al., 2019). Importantly, phenotypic characterization is not enough to identify MDSCs, since both monocytic and polymorphonuclear subsets possess a phenotype similar to that of the monocytes and neutrophils, respectively. That is the reason why functional tests are required when MDSCs are investigated, considering that their potent immunosuppressive activity is what truly distinguishes them from other myeloid populations (Bronte et al., 2016; Veglia et al., 2018).

MDSCs are an excellent tool to consider against those inflammatory diseases in which controlling the immune response may result in beneficial effects (Gimeno and Barquinero, 2011). In fact, they are currently being explored to treat autoimmune diseases and allotransplants (Crook and Liu, 2014; Zhang et al., 2018). In the context of neurodegeneration/inflammation, MDSCs have been studied in several pathologies, such as experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), spinal cord injury, stroke and traumatic brain injury (Hosomi et al., 2019; Melero-Jerez et al., 2016b). However, the transplantation of MDSCs has only been conducted in EAE and spinal cord injury models, as far as we know (Melero-Jerez et al., 2016b; Saiwai et al., 2013). Regarding the EAE model, MDSCs managed to delay the onset of symptoms and significantly reduce demyelinated areas (Ioannou et al., 2012; Zhu et al., 2011). In relation to the model of spinal cord injury, it was observed that the adoptive transfer of monocytic MDSCs into the damaged areas significantly attenuated acute inflammation and promoted tissue repair by creating a permissive environment for the development of M2 macrophages (Saiwai et al., 2013). Altogether, MDSCs led to anti-inflammatory and neurotrophic effects

as well as functional improvements. Therefore, MDSC-based therapies may become promising strategies for treating several neuroinflammatory disorders (Melero-Jerez et al., 2016b).

Traditionally, murine MDSCs have been isolated from diverse tissues of different models of inflammatory pathologies, usually from spleen, where they accumulate abundantly, although tumor tissue, bone marrow and even nervous or pulmonary tissue have been used as practicable sources as well (Bruger et al., 2019; Hosomi et al., 2019; Moliné-Velázquez et al., 2011). For this study, we decided to characterize and transplant monocytic IMCs –the precursors of monocytic MDSCs– to avoid depending on diseased animals to obtain them, which is undoubtedly helpful if we consider their clinical exploitation (Highfill et al., 2010; Zhou et al., 2010).

In view of the above mentioned, we wanted to ascertain if monocytic IMCs derived from bone marrow of wild-type (WT) animals are able to suppress the inflammation/degeneration afflicting a mouse model of cerebellar ataxia: the Purkinje Cell Degeneration (PCD) mutant mouse. This animal model holds a mutation in the *Ccp1* gene (also known as *Agtpbp1* or *Nna1*) that leads to the postnatal loss of specific neuronal populations, such as the Purkinje cells in the cerebellum (Mullen et al., 1976; Wang and Morgan, 2007). More precisely, Purkinje cell loss starts at postnatal day 18 (P18) and progresses quickly in such a way that at P30 these neurons mainly survive in the nodulus (lobule X) and the ventral side of the uvula (lobule IX) (Mullen et al., 1976; Wang and Morgan, 2007). Along with this selective neurodegeneration, an exacerbated reactive gliosis occurs in this region, mainly characterized by hypertrophied microglial cell bodies and the apoptosis of oligodendrocytes (Baltanás et al., 2013). Our findings showed how monocytic IMCs effectively exerted immunosuppressive activity when cultured under pathological conditions, as well as intriguing anti-inflammatory effects after their intracerebellar transplantation in PCD mice.



## Methods

### Animals

Both WT and PCD mice from the C57BL/DBA hybrid strain were used. These mice were obtained by mating C57BL/6J and DBA/2J strains, both originally purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Transgenic green fluorescent protein (GFP) mice of the BALB/cJ strain (The Jackson Laboratory) were employed as donors of IMCs.

For characterizing the IMCs, we used 4 WT mice of seven weeks of age to isolate T cells and 4 WT mice between two and three months of age to isolate IMCs. For the intracerebellar injection of IMCs, we used 6 GFP mice as donors and 8 PCD mice as recipients. In addition, we employed 8 PCD mice that were operated but not transplanted (sham-operated) and 8 PCD mice that did not receive any treatment. All the donors were sacrificed between two and three months of age, and all the recipients were transplanted at P20. Mice were housed at the Animal Facilities of the University of Salamanca at constant temperature and relative 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., Barcelona, Spain). Animals were housed, handled and sacrificed following the guidelines established by European (Directive 2010/63/UE, Recommendation 2007/526/CE) and Spanish (Law 32/2007, RD 53/2013) legislation. All the experiments were approved by the Bioethics Committee of the University of Salamanca.

### Genotyping

As PCD mice are not suitable for breeding (Wang and Morgan, 2007), the colony was kept by mating heterozygous animals, which are indistinguishable from their WT littermates. In consequence, the offspring were genotyped by PCR as previously described (Díaz et al., 2012b; Valero et al., 2006).

**T-cell isolation and activation**

Firstly, spleens were dissected from WT mice. A single-cell suspension was obtained from spleens by passing them through a 40 µm nylon cell strainer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). After that, red blood cells were lysed in lysis buffer (0.83% w/v NH<sub>4</sub>Cl, 0.1% w/v KHCO<sub>3</sub>, 1 mM EDTA in distilled H<sub>2</sub>O, pH 7.4; Panreac Química, Barcelona, Spain). Then, splenocytes were resuspended in 200 µl of staining buffer containing 25 mM HEPES, 2% v/v penicillin/streptomycin, and 10% v/v fetal bovine serum (Cultek, Madrid, Spain) in sterile phosphate buffered saline (PBS). Fc receptors were blocked with anti-CD16/CD32 antibodies (10 µg/ml; BD Biosciences) in staining buffer for 10 min at 4 °C. Thus, non-specific interactions between Fc receptors presented on immune cells and the subsequent antibodies were interrupted. After blocking, cells were labeled for 30 min at 4 °C in the darkness employing 200 µl of staining buffer with Pacific Blue-conjugated anti-CD3ε antibodies (4 µg/ml; BD Biosciences). Splenocytes were washed twice with staining buffer, recovered by centrifugation at 1,500 rpm for 5 min, resuspended in PBS and, finally, sorted with a FACSAria cell sorter (BD Biosciences). T cells were isolated as CD3<sup>+</sup> cells.

For T cell activation, flat bottom 96-well plates were coated with purified anti-CD3ε and anti-CD28 antibodies (1 µg/ml each; BD Biosciences) for 3 h at 37 °C. Purified CD3<sup>+</sup> T cells (2 x 10<sup>5</sup> / well) were plated in RPMI medium (Gibco–Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 25 mM HEPES, 10% v/v fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 1% v/v penicillin/streptomycin and 50 µM 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and stimulated for 14 h with anti-CD3ε/CD28, at 37 °C. Some T cells were seeded with culture medium alone (unstimulated controls).

**IMC isolation and culture with T cells**

IMCs were isolated from WT mice one day after T cells were plated. Firstly, mice were sacrificed by cervical dislocation, femurs and tibiae were dissected and bone marrow cells were extracted by flushing RPMI medium through both epiphyses. After that, the same procedure used to isolate T cells was

followed. In this case, we employed the following antibodies: PerCP-Cy5.5-conjugated anti-CD11b (4 µg/ml), FITC-conjugated anti-Ly-6C (10 µg/ml) and PE-conjugated anti-Ly-6G (4 µg/ml; BD Biosciences). IMCs were isolated as CD11b<sup>+</sup>/Ly-6C<sup>high</sup>/Ly-6G<sup>low</sup> cells.

Once sorted, IMCs were plated with the T cells at a 1:4 ratio (5 x 10<sup>4</sup> IMCs / well), and the co-culture was incubated for 48 h at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. IMCs were not seeded in every well, so that some wells remained only with T cells. Afterwards, cells were harvested and both T-cell proliferation and cell cycle were evaluated by flow cytometry.

For the proliferation assay, T cells were previously exposed to 2 µM Tag-it Violet™ Proliferation and Cell Tracking Dye (BioLegend, San Diego, CA, USA) diluted in PBS supplemented with 0.1% w/v bovine serum albumin under continuous rotary shaking for 20 min at 37 °C and protected from light.

For the cell cycle assay, cells were fixed in 70% v/v ethanol at -20 °C, and stained the following day with a propidium iodide/RNase solution (Immunostep, Salamanca, Spain) according to the manufacturer's instructions. Then, cells were analyzed in a FACSCanto II cytometer (BD Biosciences) with FACSDiva 6.1 software (BD Biosciences).

### **Intracerebellar injection of IMCs**

IMCs were extracted as described above from the bone marrow of GFP mice in order to easily identify them in the recipients thanks to their distinctive fluorescence. Once isolated by flow cytometry, they were transplanted into the cerebellum of PCD mice at P20, specifically into the lobule IV-V. For that, mice were placed in a stereotactic apparatus (Just for Mouse Stereotactic Instrument; Stoelting, Wood Dale, IL, USA) under the effect of inhalational anesthesia (2% v/v isoflurane; Provesa, Murcia, Spain) that was administered through a nose mask (Stoelting). Then, a small incision was made along the midline of the back of the head to expose the cranium. Next, a small burr hole was made 2.2 mm caudal from lambda in the midline. Subsequently, IMCs (1.3 x 10<sup>5</sup> in 2 µl PBS) were injected using

a Hamilton 75N syringe (Hamilton, Reno, NV, USA). The needle was inserted 2.5 mm regarding the bone surface and the cell suspension was inoculated at a rate of 0.5  $\mu$ l/min. Sham-operated animals underwent the same transplantation procedure but only the vehicle was injected (2  $\mu$ l PBS). The needle was left in place for 2 min before it was withdrawn. Then, the scalp was sutured, and each animal was subcutaneously administered with 2 mg/kg body weight (b.wt.) meloxicam (Metacam; Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein, Germany) and 0.1 mg/kg b.wt. buprenorphine (Buprecare; Divasa-Farmavic, S.A., Barcelona, Spain) for postoperative pain relief. Finally, each mouse was kept on a heating pad until recovery from the anesthesia before it was returned to a standard cage.

### **Rotarod performance test**

The 3 groups of PCD animals (untreated, transplanted and sham-operated) were subjected to the rotarod test (Rotarod LE8200; Panlab, Barcelona, Spain) at P25 and P30 in order to evaluate their motor coordination and balance. The test consists of positioning the animals on a horizontal rod that rotates at constant acceleration (from 4 rpm to 40 rpm in 10 min) and measuring the time they are able to remain on it. In each session, seven trials were conducted with 15 min between them to prevent the animals from fatigue. The latency to fall (s) was automatically recorded. The apparatus was cleaned with 96% v/v ethanol between trials. For statistical analysis, the highest of the seven measurements was taken as the value that best represents the motor skills.

### **Tissue preparation**

At P30, mice were deeply anesthetized with 10  $\mu$ l/g b.wt. of 5% w/v chloral hydrate, and subsequently they were perfused intracardially with 0.9% w/v NaCl for 1 min, followed by Somogyi's fixative solution containing 4% w/v paraformaldehyde and 15% v/v saturated picric acid in 0.1 M phosphate buffer (PB) for 15 min. Brains were dissected and immersed in the same fixative for 2 h at room temperature. Then, they were rinsed with PB and cryoprotected with 30% w/v sucrose in PB overnight at 4 °C. Afterwards, cerebella were cut in 40  $\mu$ m-thick sagittal sections, by employing a freezing-sliding microtome (Jung SM 2000, Leica Instruments, Nussloch, Germany). Collected sections

were rinsed with PB to remove fixative and sucrose residues. Finally, sections were immunostained in order to perform the histological analyses (five animals per group).

### **Immunofluorescent labeling**

Free-floating sections were washed with PBS (3 x 10 min) and incubated for 72 h at 4 °C under continuous rotary shaking in a medium containing 0.2% v/v Triton X-100, 5% v/v normal donkey serum, and the primary antibodies: mouse anti-calbindin D-28k (CB; 1:2000; 300, Swant, Marly, Switzerland) or goat anti-GFP (1:2000; ab5450, Abcam, Cambridge, UK) in PBS. These antibodies were used to stain Purkinje cells (CB<sup>+</sup>) and the transplanted cells (GFP<sup>+</sup>). Following this, sections were washed with PBS (3 x 10 min) and then incubated in a second medium for 1 h and 30 min at room temperature under continuous rotary shaking. This second medium contained the appropriate secondary antibodies conjugated to Cy2 (1:500; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Cambridge, UK) in PBS. Ten minutes before the end of the incubation, DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; Sigma-Aldrich) at 1:10,000 was added to the medium in order to obtain a nuclear counterstain. Finally, the sections were rinsed with PBS, mounted on gelatin-coated slides and covered using a freshly prepared anti-fading mounting medium.

### **TUNEL assay**

The terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) technique was employed to detect apoptotic cells, as previously described (Díaz et al., 2012b). Tissue slices were washed with PBS (3 x 10 min) and treated with a cold solution of ethanol-acetic acid (2:1) for 5 min. Then, slices were washed with PBS (3 x 10 min) and permeabilized with 0.2% v/v Triton X-100 and 0.1% w/v sodium citrate in distilled water for 15 min. They were washed again with PBS (2 x 10 min) and incubated with TUNEL buffer containing 30 mM Tris-HCl, 140 mM sodium cacodylate, 1 mM cobalt(II) chloride, and 0.3% v/v Triton X-100 for 30 min. Subsequently, the tissue slices were incubated in a medium with terminal transferase (800 U/ml; Roche, Basel, Switzerland) and biotinylated dUTP (1 µM; Roche) in TUNEL buffer for 1 h and 30 min at 37 °C. The reaction

was terminated by adding saline sodium citrate buffer, composed of 150 mM sodium chloride and 15 mM sodium citrate in distilled water. Finally, the slices were washed with PBS (3 x 10 min) and developed with a medium containing Cy3-conjugated streptavidin (1:200; Jackson ImmunoResearch Laboratories) in PBS for 1 h and 30 min. Both nuclear counterstain and slide mounting were performed as described above.

### **Microscopy visualization and cell counting**

Sections were observed under an epifluorescence microscope Olympus Provis AX70 equipped with an Olympus DP70 digital camera (Olympus, Tokyo, Japan). Digital images were processed with Adobe Photoshop CC 2015 (Adobe Inc., San Jose, CA, USA) to slightly adjust contrast, brightness and color balance.

For the cerebellar histological analyses, three sections of vermis per animal were chosen, where all cerebellar lobules are clearly seen and the degeneration occurs earlier (Wang and Morgan, 2007). Purkinje cells and apoptotic cells were manually counted after the observation of all the sections. Purkinje cell linear density was calculated as number of CB-positive cells per mm of the Purkinje cell layer in each section, on the one hand, respecting the whole vermis and, on the other hand, respecting the lobule X, which is the region where most of Purkinje cells survive at P30 (Wang and Morgan, 2007). Apoptotic cell density was calculated as number of TUNEL-positive cells per mm<sup>2</sup> regarding the whole vermis and, separately, respecting the lobule IV-V, where the cell suspension was injected.

The data were analyzed using NeuroLucida (V8.23) and Neuroexplorer (MBF Bioscience, Williston, VT, USA) software. Each count was performed by the same person and following the same criterion.

### **Statistical analysis**

All data are shown as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Once normality had been checked with the Kolmogorov-Smirnov test, a two-way ANOVA test was employed when we compared the outcomes obtained with the rotarod test of the three groups of PCD mice (untreated, transplanted and

sham-operated) at different ages (P25 and P30). Once we checked that there was no interaction between age and treatment, we performed one-way ANOVA and Bonferroni *post hoc* tests to evaluate differences between PCD groups within each age. One-way ANOVA and Bonferroni *post hoc* tests were also used to compare the three groups for histological analyses. All analyses were performed with the IBM SPSS Statistical 25 software (IBM, Armonk, NY, USA).

## Results

### Functional characterization of bone marrow-derived IMCs

First of all, we ascertained if IMCs isolated from healthy bone marrow were able to acquire immunosuppressive properties under pathological conditions, i.e., if these cells become genuine MDSCs. For that purpose, IMCs were cultured with both activated and unstimulated (control) T cells to evaluate if the former can suppress the proliferation or induce the apoptosis of the latter. After two days of co-culture, cells were harvested and both the proliferative capability and the cell cycle of the T cells were analyzed by flow cytometry.

On the one hand, proliferation was assessed by labeling T cells with Tag-it Violet, a fluorophore whose intensity of fluorescence is inversely proportional to the percentage of dividing cells. The *precursor frequency* was the variable employed to do the comparisons between the different experimental groups. This variable represents the fraction of the original population divided at least once during the culture period and, importantly, it does not depend on the number of cells that proliferate or culture time (Roederer, 2011). Control T cells cultured alone or with IMCs did not proliferate (Figure 1A, B). By contrast, activated T cells divided considerably (Figure 1C). However, when activated T cells were cultured with IMCs, the percentage of dividing cells decreased substantially (Fig-

ure 1D). If we focus on the statistical analysis of activated T cells, it can be observed how the precursor frequency was notably reduced when they were cultured with IMCs ( $p < 0.001$ ; Figure 1E). Hence, IMCs were able to suppress the T-cell proliferation.

On the other hand, we assessed the proportion of T cells in each phase of the cell cycle. For that, their DNA was stained with propidium iodide, a fluorescent intercalating agent. An overview of these results can be appreciated in Figure 2A, and the statistical analyses in Figure 2B-E. In the group of control T cells, G0/G1 phase was clearly predominant, indicating that there was virtually no proliferation. Conversely, in the group of activated T cells, the percentage of cells in G0/G1 diminished while, in parallel, both S and G2/M phases augmented, indicating that cells divided. Finally, when activated T cells were cultured with IMCs, the proportion of cells in both S and G2/M phases decreased, showing a reduction in the T-cell proliferative rate. All this information corroborates the outcomes connected with the proliferation assay. In addition, and more interesting, we could identify the percentage of cells in apoptosis (sub-G1 phase). In this regard, an increase in sub-G1 phase was observed when activated T cells were cultured with IMCs ( $p = 0.031$ ; Figure 2E). This fact illustrates that IMCs induced T-cell apoptosis.

### **Assessment of intracerebellar transplantation of IMCs**

After having checked the immunosuppressive properties of IMCs under pathological conditions, we proceeded to transplant them into the cerebellum of PCD mice at P20, when the degeneration of Purkinje cells has already begun. Both transplanted and sham-operated animals were subjected to stereotactic surgery. In addition, another group of non-treated PCD mice were used to compare the results.

### **Motor behavior analysis**

Motor skills of animals were evaluated with the rotarod test (see Material and Methods). After performing the two-way ANOVA, we detected differences both between experimental groups ( $p =$



0.001) and ages ( $p < 0.001$ ), without the existence of interaction between both factors ( $p = 0.456$ ). Regarding the age, all groups showed a worse motor coordination at P30 as a result of the progression of the cerebellar degeneration. However, the most interesting data were found after comparing the different experimental groups within each age. Thus, sham-operated animals exhibited a worse performance, both at P25 ( $p = 0.046$ ) and at P30 ( $p = 0.029$ ), regarding the untreated PCD animals. This phenomenon was not observed in transplanted PCD mice ( $p = 0.494$  at P25 and  $p = 1.000$  at P30; Figure 3), whose behavior was similar to that for untreated animals. Moreover, at P30 transplanted animals displayed differences in relation to sham-operated animals ( $p = 0.016$ ). These findings reflect that the intracerebellar injection of IMCs, although did not improve the motor skills of PCD mice, effectively reduced the harmful effect resulting from the surgery performed.

### ***IMC integration***

The following step consisted of analyzing the integration of the cells derived from the transplant in the cerebella of the recipients. We sighted GFP<sup>+</sup> cells mainly in the lobule IV-V, which received the injection; such cells presented a rounded morphology (Figure 4A). Some more distant cells were also detected in a more isolated manner and with some ramifications (Figure 4B, C). Therefore, IMCs could be detected at least 10 days after their transplantation, without showing high migration rates.

### ***Purkinje cell survival***

We also evaluated the survival of Purkinje cells, which is the major population affected in the cerebellum of PCD mice. To this end, anti-CB antibodies were used to specifically mark Purkinje cells, as previously described (Bastianelli, 2003; Figure 5A-C). After estimating the linear density of Purkinje cells in the whole vermis, no differences were detected between the three experimental groups, but when lobule X was analyzed separately, an increased death of Purkinje cells was detected in sham-operated animals with regard to both untreated ( $p = 0.038$ ) and transplanted ones ( $p = 0.031$ ; Figure 5D). By contrast, no differences were distinguished between untreated and transplanted mice ( $p = 1.000$ ; Figure 5D).

Although it could not be appreciated a greater survival of Purkinje cells in transplanted animals, these data highlight again that the transplantation of IMCs seemed to reduce the noxious effects caused by stereotactic surgery, even in a distant region such as the lobule X.

### ***Apoptosis assay***

We also determined the density of apoptotic cells by employing the TUNEL technique (see Material and Methods). Considering the whole vermis, sham-operated animals showed more apoptotic cells than both untreated ( $p = 0.014$ ) and transplanted mice ( $p = 0.018$ ; Figure 6). In contrast, no differences were detected between untreated and transplanted animals ( $p = 1.000$ ; Figure 6). Focusing on the lobule IV-V (injection site), we also identified an increased density of programmed cell death in sham-operated animals in comparison with untreated ones ( $p = 0.015$ ; Figure 6). However, in this case, transplanted mice were situated at an intermediate level between untreated and sham-operated mice, in such a way that no statistically significant differences were detected with any of them (Figure 6). These findings show that stereotactic surgery induced a greater apoptosis and emphasize that the transplant of IMCs reduced, at least in part, these events of programmed cell death.

## **Discussion**

The purpose of this study was to investigate whether IMCs isolated from healthy bone marrow are able to reduce the degeneration/inflammation occurring in the cerebellum of PCD mice, a model of selective degeneration of Purkinje cells. IMCs were transplanted directly into the cerebellum at P20, when the neurodegeneration has already started. The reason why we selected this age is that bone marrow-derived stem cells tend to migrate toward inflamed or damaged areas, a fact that may be due to the effect of chemoattractant signals (Díaz et al., 2012a; Johansson et al., 2008; Recio et al., 2011). In addition, it has also been described that both neurodegeneration and inflammation in the central

nervous system enhance the regenerative and immunomodulatory properties of several cell types after their transplantation (Bae et al., 2005b; Bae et al., 2007; Ravanidis et al., 2015).

### ***Monocytic IMCs behave like MDSCs under pathological conditions***

Whenever MDSCs are used it should be checked their immunosuppressive capability through functional assays, since that is what really distinguishes them from the rest of myeloid populations (Bronte et al., 2016; Cassetta et al., 2019). In our case, this is even more important, since IMCs were isolated from bone marrow of WT mice, hence they initially lack immunosuppressive activity (Talmadge and Gabrilovich, 2013). Thus, we firstly checked if IMCs from healthy bone marrow were able to acquire immunosuppressive properties under pathological conditions.

After realizing the functional assays previously explained, we could verify that IMCs were able to suppress the proliferation of activated T cells as well as promote their apoptosis. Therefore, IMCs displayed a behavior similar to authentic MDSCs after their culture with stimulated T cells. The fact that IMCs acquire a potent immunosuppressive capability under pathological conditions avoids their extraction from diseased animals and generates a more feasible source for clinical application (Highfill et al., 2010; Zhou et al., 2010). Today, several research groups have managed to generate MDSCs after culturing bone marrow-derived cells, mainly from mice, but also from humans (Highfill et al., 2010; Marigo et al., 2010; Messmann et al., 2015; Yang et al., 2016; Zhou et al., 2010). Nevertheless, each of them employs a different combination of cytokines during the culture, resulting in large variability in the immunosuppressive mechanisms of MDSCs generated in this way (Messmann et al., 2015). In consequence, it is critical to refine the *in vitro* production of MDSCs before considering the translation into clinical practice (Drujont et al., 2014). Importantly, our research lacks that disadvantage since it contemplates the transplantation of IMCs right after their isolation, without previously culturing them.

***Intracerebellar injection of IMCs avoids the adverse effects provoked by stereotactic surgery***

Once characterized, we proceeded to transplant IMCs in PCD mice. In previous studies carried out in our laboratory, we attempted to introduce these cells intravenously, but this route was not favorable for a suitable and consistent arrival into the cerebellum (data not published). That is the reason why we decided to inject them directly into the cerebellum, which is what has been performed in the majority of the studies reporting cell therapy in mouse models of cerebellar degeneration (Babuska et al., 2015; Bae et al., 2005a; Bae et al., 2005b; Bae et al., 2007; Cendelin et al., 2018; Chang et al., 2011; Higuera et al., 2017; Hsieh et al., 2017; Huda et al., 2016; Jones et al., 2010; Li et al., 2006; Mendonça et al., 2015). This method entails a mechanical injury that causes damage and inflammation to the surrounding tissue (Akyol et al., 2018; Wang et al., 2018). However, it offers a number of advantages, such as being more direct and achieving a higher survival of transplanted cells than when they are introduced intravenously, although their spreading is rather limited (De Vocht et al., 2013; Li et al., 2015).

We could observe a lot of GFP<sup>+</sup> cells in the injection site, the lobule IV-V, with an apparently undifferentiated morphology. Although some cells were detected in more distant lobules, such as the lobule X, they barely migrated during the 10 days, but rather they remained mostly in the lobule IV-V. Indeed, it has been reported that cells directly transplanted into the nervous parenchyma hardly move beyond the injection site (Li et al., 2015). Nonetheless, it should be noted that their effects can be propagated thanks to paracrine factors (Jones et al., 2010; Oliveira Miranda et al., 2018).

In relation to the motor performance test, sham-operated mice showed a significant worsening compared with untreated ones. This motor impairment was not detected in transplanted animals. What is more, these behavioral data were correlated with the histological analyses. Thus, a lower density of Purkinje cells was observed in sham-operated mice in addition to a higher density of apoptotic cells; both phenomena were completely or partially avoided in transplanted animals. The greater death of Purkinje cells was detected in the lobule X, which is relatively distant from the damaged lobule.

Therefore, it seems that surgical brain injury was transmitted to other cerebellar regions, probably through glial communication. Indeed, although astrocytes and microglia react and convey messages within their immediate environment, they can also communicate at longer distances through diverse signaling molecules (Cicchetti and Barker, 2014). In fact, reactive gliosis has been involved not only in accelerating neurodegenerative processes, but also in spreading them (Leyns and Holtzman, 2017).

Altogether, the above findings highlight two fundamental facts. The first is that stereotactic surgery exerted detrimental effects on PCD mice both at behavioral and histological levels. This is not surprising, since it has been proved that neurosurgical interventions lead to unavoidable injury to surrounding neural tissue (Akyol et al., 2018; Wang et al., 2018), even taking into account that invasiveness has diminished very much lately, as in the case of stereotactic surgery (Jadhav et al., 2007; Travis et al., 2019). In particular, neurosurgery may easily imply the development of neuroinflammation, bleeding, brain edema, cell death and, eventually, cause postoperative neurological deficits (Tian et al., 2019; Travis et al., 2019). This seems to have exacerbated the inflammation and neuronal death already existing in the cerebellum of PCD mice as well as worsened their motor skills. Precisely, this is the reason why we initially did not want to inject IMCs directly in the brain parenchyma.

The second outstanding fact is that intracerebellar transplantation of IMCs seems to be a promising therapeutic approach so as to avoid the adverse effects mentioned above. Interestingly, up to now, such adverse effects are not treated, but they are allowed to heal on their own (Travis et al., 2019). In fact, there are no specific treatments to prevent surgical brain injury, because an appropriate animal model to study this has not been developed until recently (Jadhav et al., 2007). In view of these considerations, it has become a key point in modern neurosurgery to explore new strategies for achieving an efficient, safe and accurate neuroprotection (Tian et al., 2019), and precisely, the transplantation of IMCs could become a neuroprotective approach to consider; even more if we contemplate that the immunoregulatory potency of these cells is acquired and enhanced with inflammation (Ostrand-Rosenberg and Sinha, 2009).

The therapeutic benefit after the transplantation of several cell types in animal models of cerebellar degeneration seems to be due to the release of neurotrophic and anti-inflammatory factors (Bae et al., 2005a; Jones et al., 2010; Nakamura et al., 2015), since both transdifferentiation and cell fusion are very scarce (Díaz et al., 2015; Jones et al., 2010). Indeed, ongoing clinical trials about the usage of bone marrow cells in neurological disorders harness their immunomodulatory and neuroprotective properties (Díaz et al., 2015). Focusing on MDSCs, it has been proved that they suppress neuroinflammation in diverse models of neurological injury (Melero-Jerez et al., 2016a). More specifically, MDSCs are able to inhibit the microglial activation in a model of traumatic brain injury (Hosomi et al., 2019), limit the development of inflamed and demyelinated areas in mice with EAE (Ioannou et al., 2012; Moliné-Velázquez et al., 2011; Zhu et al., 2011) and significantly attenuate the acute inflammation and promote the tissue repair in a model of spinal cord injury (Saiwai et al., 2013). Furthermore, it has also been ascertained that they can exert direct neuroprotective effects by secreting NGF (Sarkar et al., 2013). In view of all this, it is plausible to think that IMCs are exerting their effects by modulating their surrounding cells through the release of paracrine factors, although some sort of regulation by cell-cell interactions cannot be dismissed.

Even though IMCs could be promoting a neuroprotective microenvironment, it is quite likely that a greater survival of Purkinje cells or a behavioral improvement was not achieved because of the extremely rapid degeneration. This fact has been reported recently in the case of a cell therapy based on healthy bone marrow-derived cells in PCD mice, which also failed to rescue degenerating Purkinje cells (Díaz et al., 2018). On the contrary, this therapy showed neuroprotective effects in the olfactory bulb, another region affected in PCD mice, but where the degeneration is slower and later (Díaz et al., 2012a). Following this reasoning, it would be interesting to transplant IMCs into the olfactory bulb of PCD mice, since therapeutic effects could be detected, either an improvement in olfaction, a greater survival of the degenerating neurons or both.

## Conclusions

Summarizing, our findings show that monocytic IMCs isolated from healthy bone marrow are able to acquire immunosuppressive properties when cultured under pathological conditions. Furthermore, intracerebellar transplantation of monocytic IMCs in PCD mice prevents the adverse effects caused by the stereotactic surgery performed, both at histological and behavioral levels. This is a very attractive phenomenon, since an adequate treatment for damage produced by neurosurgical interventions may result in significant benefits for both patients and health institutions (Jadhav et al., 2007). Therefore, IMCs could be employed as potential adjuvant agents when performing neurosurgery.

## Abbreviations

CB: calbindin D-28k; DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole; EAE: experimental autoimmune encephalomyelitis; GFP: green fluorescent protein; IMCs: immature myeloid cells; MDSCs: myeloid-derived suppressor cells; PB: phosphate buffer; PBS: phosphate buffered saline; PCD: Purkinje Cell Degeneration; SEM: standard error of the mean; TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling; WT: wild-type.

## Acknowledgements

We thank María Sánchez for technical assistance in animal handling and genotyping, Dr. Virginia Vila-del Sol for technical assistance in flow cytometry and Dr. Emma Keck for language editing.

## Authors' contributions

CdP, DD, DC and EW conceived the study and designed the experiments; CdP and RL-G performed the experiments; CdP, DD, RL-G, DC, JRA, EW interpreted the data; CdP was a major contributor in writing the paper and organizing all the figures. All authors critically revised and approved the final manuscript.

### **Funding**

This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO; SAF2016-79668-R), the Regional Government of Castile and Leon (SA030P17), the University of Salamanca and the Institute of Health Carlos III (PI15/00963; PI18/00357; partially co-financed by F.E.D.E.R., European Union, “Una manera de hacer Europa”). DC and RL-G, are hired by SESCAM. CdP holds a predoctoral grant by the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities (FPU14/02963).

### **Availability of data and materials**

The datasets generated and analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

### **Ethics approval**

Animal experiments were conducted in compliance with the guidelines established by European (Directive 2010/63/UE, Recommendation 2007/526/CE) and Spanish (Law 32/2007, RD 53/2013) legislation. All the experiments were approved by the Bioethics Committee of the University of Salamanca (reference numbers: #00291 and #00344).

### **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

### **References**

Akyol, O., Sherchan, P., Yilmaz, G., Reis, C., Ho, W.M., Wang, Y., Huang, L., Solaroglu, I., Zhang, J.H., 2018. Neurotrophin-3 provides neuroprotection via TrkC receptor dependent pErk5 activation in a rat surgical brain injury model. *Exp Neurol* 307, 82-89.



- Babuska, V., Houdek, Z., Tuma, J., Purkartova, Z., Tumova, J., Kralickova, M., Vozeh, F., Cendelin, J., 2015. Transplantation of Embryonic Cerebellar Grafts Improves Gait Parameters in Ataxic Lurcher Mice. *Cerebellum* 14, 632-641.
- Bae, J.S., Furuya, S., Ahn, S.J., Yi, S.J., Hirabayashi, Y., Jin, H.K., 2005a. Neuroglial activation in Niemann-Pick Type C mice is suppressed by intracerebral transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Neurosci Lett* 381, 234-236.
- Bae, J.S., Furuya, S., Shinoda, Y., Endo, S., Schuchman, E.H., Hirabayashi, Y., Jin, H.K., 2005b. Neurodegeneration augments the ability of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to fuse with Purkinje neurons in Niemann-Pick type C mice. *Hum Gene Ther* 16, 1006-1011.
- Bae, J.S., Han, H.S., Youn, D.H., Carter, J.E., Mado, M., Schuchman, E.H., Jin, H.K., 2007. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote neuronal networks with functional synaptic transmission after transplantation into mice with neurodegeneration. *Stem Cells* 25, 1307-1316.
- Baltanás, F.C., Berciano, M.T., Valero, J., Gómez, C., Díaz, D., Alonso, J.R., Lafarga, M., Weruaga, E., 2013. Differential glial activation during the degeneration of Purkinje cells and mitral cells in the PCD mutant mice. *Glia* 61, 254-272.
- Bastianelli, E., 2003. Distribution of calcium-binding proteins in the cerebellum. *Cerebellum* 2, 242-262.
- Bronte, V., Brandau, S., Chen, S.H., Colombo, M.P., Frey, A.B., Greten, T.F., Mandruzzato, S., Murray, P.J., Ochoa, A., Ostrand-Rosenberg, S., Rodríguez, P.C., Sica, A., Umansky, V., Vonderheide, R.H., Gabrilovich, D.I., 2016. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun* 7, 12150.
- Bruger, A.M., Dorhoi, A., Esendagli, G., Barczyk-Kahlert, K., van der Bruggen, P., Lipoldova, M., Perecko, T., Santibanez, J., Saraiva, M., van Ginderachter, J.A., Brandau, S., 2019. How to measure the immunosuppressive activity of MDSC: assays, problems and potential solutions. *Cancer Immunol Immunother* 68, 631-644.

- Bunt, S.K., Clements, V.K., Hanson, E.M., Sinha, P., Ostrand-Rosenberg, S., 2009. Inflammation enhances myeloid-derived suppressor cell cross-talk by signaling through Toll-like receptor 4. *J Leukoc Biol* 85, 996-1004.
- Cassetta, L., Baekkevold, E.S., Brandau, S., Bujko, A., Cassatella, M.A., Dorhoi, A., Krieg, C., Lin, A., Loré, K., Marini, O., Pollard, J.W., Roussel, M., Scapini, P., Umansky, V., Adema, G.J., 2019. Deciphering myeloid-derived suppressor cells: isolation and markers in humans, mice and non-human primates. *Cancer Immunol Immunother* 68, 687-697.
- Cendelin, J., Purkartova, Z., Kubik, J., Ulbricht, E., Tichanek, F., Kolinko, Y., 2018. Long-Term Development of Embryonic Cerebellar Grafts in Two Strains of Lurcher Mice. *Cerebellum* 17, 428-437.
- Chang, Y.K., Chen, M.H., Chiang, Y.H., Chen, Y.F., Ma, W.H., Tseng, C.Y., Soong, B.W., Ho, J.H., Lee, O.K., 2011. Mesenchymal stem cell transplantation ameliorates motor function deterioration of spinocerebellar ataxia by rescuing cerebellar Purkinje cells. *J Biomed Sci* 18, 54.
- Chen, X., Wang, S., Cao, W., 2018. Mesenchymal stem cell-mediated immunomodulation in cell therapy of neurodegenerative diseases. *Cell Immunol* 326, 8-14.
- Cicchetti, F., Barker, R.A., 2014. The glial response to intracerebrally delivered therapies for neurodegenerative disorders: is this a critical issue? *Front Pharmacol* 5, 139.
- Crook, K.R., Liu, P., 2014. Role of myeloid-derived suppressor cells in autoimmune disease. *World J Immunol* 4, 26-33.
- Dantuma, E., Merchant, S., Sugaya, K., 2010. Stem cells for the treatment of neurodegenerative diseases. *Stem Cell Res Ther* 1, 37.
- De Vocht, N., Praet, J., Reekmans, K., Le Blon, D., Hoornaert, C., Daans, J., Berneman, Z., van der Linden, A., Ponsaerts, P., 2013. Tackling the physiological barriers for successful mesenchymal stem cell transplantation into the central nervous system. *Stem Cell Res Ther* 4, 101.

- Dolcetti, L., Peranzoni, E., Ugel, S., Marigo, I., Fernández Gómez, A., Mesa, C., Geilich, M., Winkels, G., Traggiai, E., Casati, A., Grassi, F., Bronte, V., 2010. Hierarchy of immunosuppressive strength among myeloid-derived suppressor cell subsets is determined by GM-CSF. *Eur J Immunol* 40, 22-35.
- Drujont, L., Carretero-Iglesia, L., Bouchet-Delbos, L., Beriou, G., Merieau, E., Hill, M., Delneste, Y., Cuturi, M.C., Louvet, C., 2014. Evaluation of the therapeutic potential of bone marrow-derived myeloid suppressor cell (MDSC) adoptive transfer in mouse models of autoimmunity and allograft rejection. *PLoS One* 9, e100013.
- Du, L., Zhang, Y., Chen, Y., Zhu, J., Yang, Y., Zhang, H.L., 2017. Role of Microglia in Neurological Disorders and Their Potentials as a Therapeutic Target. *Mol Neurobiol* 54, 7567-7584.
- Díaz, D., del Pilar, C., Carretero, J., Alonso, J.R., Weruaga, E., 2019. Daily bone marrow cell transplantations for the management of fast neurodegenerative processes. *J Tissue Eng Regen Med* 13, 1702-1711.
- Díaz, D., Lepousez, G., Gheusi, G., Alonso, J.R., Lledo, P.M., Weruaga, E., 2012a. Bone marrow cell transplantation restores olfaction in the degenerated olfactory bulb. *J Neurosci* 32, 9053-9058.
- Díaz, D., Muñoz-Castañeda, R., Alonso, J.R., Weruaga, E., 2015. Bone Marrow-Derived Stem Cells and Strategies for Treatment of Nervous System Disorders: Many Protocols, and Many Results. *Neuroscientist* 21, 637-652.
- Díaz, D., Piquer-Gil, M., Recio, J.S., Martínez-Losa, M.M., Alonso, J.R., Weruaga, E., Álvarez-Dolado, M., 2018. Bone marrow transplantation improves motor activity in a mouse model of ataxia. *J Tissue Eng Regen Med* 12, e1950-e1961.
- Díaz, D., Recio, J.S., Weruaga, E., Alonso, J.R., 2012b. Mild cerebellar neurodegeneration of aged heterozygous PCD mice increases cell fusion of Purkinje and bone marrow-derived cells. *Cell Transplant* 21, 1595-1602.

- Gabrilovich, D.I., Nagaraj, S., 2009. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9, 162-174.
- Gabrilovich, D.I., Ostrand-Rosenberg, S., Bronte, V., 2012. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol* 12, 253-268.
- Gimeno, R., Barquinero, J., 2011. Myeloid-derived suppressor cells (MDSC): Another player in the orchestra. *Inmunología* 30, 45-53.
- González, H., Elgueta, D., Montoya, A., Pacheco, R., 2014. Neuroimmune regulation of microglial activity involved in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *J Neuroimmunol* 274, 1-13.
- Highfill, S.L., Rodríguez, P.C., Zhou, Q., Goetz, C.A., Koehn, B.H., Veenstra, R., Taylor, P.A., Panoskaltis-Mortari, A., Serody, J.S., Munn, D.H., Tolar, J., Ochoa, A.C., Blazar, B.R., 2010. Bone marrow myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) inhibit graft-versus-host disease (GVHD) via an arginase-1-dependent mechanism that is up-regulated by interleukin-13. *Blood* 116, 5738-5747.
- Higuera, G.A., Iaffaldano, G., Bedar, M., Shpak, G., Broersen, R., Munshi, S.T., Dupont, C., Gribnau, J., de Vrij, F.M.S., Kushner, S.A., De Zeeuw, C.I., 2017. An expandable embryonic stem cell-derived Purkinje neuron progenitor population that exhibits in vivo maturation in the adult mouse cerebellum. *Sci Rep* 7, 8863.
- Hosomi, S., Koyama, Y., Watabe, T., Ohnishi, M., Ogura, H., Yamashita, T., Shimazu, T., 2019. Myeloid-Derived Suppressor Cells Infiltrate the Brain and Suppress Neuroinflammation in a Mouse Model of Focal Traumatic Brain Injury. *Neuroscience* 406, 457-466.
- Hsieh, J., Liu, J.W., Harn, H.J., Hsueh, K.W., Rajamani, K., Deng, Y.C., Chia, C.M., Shyu, W.C., Lin, S.Z., Chiou, T.W., 2017. Human Olfactory Ensheathing Cell Transplantation Improves Motor Function in a Mouse Model of Type 3 Spinocerebellar Ataxia. *Cell Transplant* 26, 1611-1621.

- Huda, F., Fan, Y., Suzuki, M., Konno, A., Matsuzaki, Y., Takahashi, N., Chan, J.K., Hirai, H., 2016. Fusion of Human Fetal Mesenchymal Stem Cells with "Degenerating" Cerebellar Neurons in Spinocerebellar Ataxia Type 1 Model Mice. *PLoS One* 11, e0164202.
- Ioannou, M., Alissafi, T., Lazaridis, I., Deraos, G., Matsoukas, J., Gravanis, A., Mastorodemos, V., Plaitakis, A., Sharpe, A., Boumpas, D., Verginis, P., 2012. Crucial role of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in the regulation of central nervous system autoimmune disease. *J Immunol* 188, 1136-1146.
- Jadhav, V., Solaroglu, I., Obenaus, A., Zhang, J.H., 2007. Neuroprotection against surgically induced brain injury. *Surg Neurol* 67, 15-20; discussion 20.
- Johansson, C.B., Youssef, S., Koleckar, K., Holbrook, C., Doyonnas, R., Corbel, S.Y., Steinman, L., Rossi, F.M., Blau, H.M., 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-León, M., Martínez, S., 2010. Mesenchymal stem cells rescue Purkinje cells and improve motor functions in a mouse model of cerebellar ataxia. *Neurobiol Dis* 40, 415-423.
- Kim, S.U., de Vellis, J., 2005. Microglia in health and disease. *J Neurosci Res* 81, 302-313.
- Leyns, C.E.G., Holtzman, D.M., 2017. Glial contributions to neurodegeneration in tauopathies. *Molecular Neurodegeneration* 12, 50.
- Li, J., Imitola, J., Snyder, E.Y., Sidman, R.L., 2006. Neural stem cells rescue nervous purkinje neurons by restoring molecular homeostasis of tissue plasminogen activator and downstream targets. *J Neurosci* 26, 7839-7848.
- Li, Y.H., Feng, L., Zhang, G.X., Ma, C.G., 2015. Intranasal delivery of stem cells as therapy for central nervous system disease. *Exp Mol Pathol* 98, 145-151.
- Lindvall, O., Kokaia, Z., 2010. Stem cells in human neurodegenerative disorders--time for clinical translation? *J Clin Invest* 120, 29-40.

- Marigo, I., Bosio, E., Solito, S., Mesa, C., Fernández, A., Dolcetti, L., Ugel, S., Sonda, N., Biciato, S., Falisi, E., Calabrese, F., Basso, G., Zanovello, P., Cozzi, E., Mandruzzato, S., Bronte, V., 2010. Tumor-induced tolerance and immune suppression depend on the C/EBPbeta transcription factor. *Immunity* 32, 790-802.
- Melero-Jerez, C., Ortega, M.C., Moliné-Velázquez, V., Clemente, D., 2016a. Myeloid derived suppressor cells in inflammatory conditions of the central nervous system. *Biochim Biophys Acta* 1862, 368-380.
- Melero-Jerez, C., Ortega, M.C., Moliné-Velázquez, V., Clemente, D., 2016b. Myeloid derived suppressor cells in inflammatory conditions of the central nervous system. *Biochim Biophys Acta* 1862, 368-380.
- Mendonça, L.S., Nobrega, C., Hirai, H., Kaspar, B.K., Pereira de Almeida, L., 2015. Transplantation of cerebellar neural stem cells improves motor coordination and neuropathology in Machado-Joseph disease mice. *Brain* 138, 320-335.
- Messmann, J.J., Reisser, T., Leithäuser, F., Lutz, M.B., Debatin, K.M., Strauss, G., 2015. In vitro-generated MDSCs prevent murine GVHD by inducing type 2 T cells without disabling antitumor cytotoxicity. *Blood* 126, 1138-1148.
- Moliné-Velázquez, V., Cuervo, H., Vila-Del Sol, V., Ortega, M.C., Clemente, D., de Castro, F., 2011. Myeloid-derived suppressor cells limit the inflammation by promoting T lymphocyte apoptosis in the spinal cord of a murine model of multiple sclerosis. *Brain Pathol* 21, 678-691.
- Movahedi, K., Guillems, M., van den Bossche, J., van den Bergh, R., Gysemans, C., Beschin, A., de Baetselier, P., van Ginderachter, J.A., 2008. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood* 111, 4233-4244.
- Mullen, R.J., Eicher, E.M., Sidman, R.L., 1976. Purkinje cell degeneration, a new neurological mutation in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 208-212.

- Nagaraj, S., Gabrilovich, D.I., 2008. Tumor escape mechanism governed by myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res* 68, 2561-2563.
- Nakamura, K., Mieda, T., Suto, N., Matsuura, S., Hirai, H., 2015. Mesenchymal stem cells as a potential therapeutic tool for spinocerebellar ataxia. *Cerebellum* 14, 165-170.
- Oliveira Miranda, C., Marcelo, A., Silva, T.P., Barata, J., Vasconcelos-Ferreira, A., Pereira, D., Nóbrega, C., Duarte, S., Barros, I., Alves, J., Sereno, J., Petrella, L.I., Castelhana, J., Paiva, V.H., Rodrigues-Santos, P., Alves, V., Nunes-Correia, I., Nobre, R.J., Gomes, C., Castelo-Branco, M., Pereira de Almeida, L., 2018. Repeated Mesenchymal Stromal Cell Treatment Sustainably Alleviates Machado-Joseph Disease. *Mol Ther* 26, 2131-2151.
- Ostrand-Rosenberg, S., Sinha, P., 2009. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J Immunol* 182, 4499-4506.
- Ostrand-Rosenberg, S., Sinha, P., Beury, D.W., Clements, V.K., 2012. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells (MDSC), macrophages, and dendritic cells enhances tumor-induced immune suppression. *Semin Cancer Biol* 22, 275-281.
- Pawelec, G., Verschoor, C.P., Ostrand-Rosenberg, S., 2019. Myeloid-Derived Suppressor Cells: Not Only in Tumor Immunity. *Front Immunol* 10, 1099.
- Ravanidis, S., Bogie, J.F., Donders, R., Craeye, D., Mays, R.W., Deans, R., Gijbels, K., Bronckaers, A., Stinissen, P., Pinxteren, J., Hellings, N., 2015. Neuroinflammatory signals enhance the immunomodulatory and neuroprotective properties of multipotent adult progenitor cells. *Stem Cell Res Ther* 6, 176.
- Recio, J.S., Álvarez-Dolado, M., Díaz, D., Baltanás, F.C., Piquer-Gil, M., Alonso, J.R., Weruaga, E., 2011. Bone marrow contributes simultaneously to different neural types in the central nervous system through different mechanisms of plasticity. *Cell Transplant* 20, 1179-1192.
- Roederer, M., 2011. Interpretation of cellular proliferation data: avoid the panglossian. *Cytometry A* 79, 95-101.

- Saiwai, H., Kumamaru, H., Ohkawa, Y., Kubota, K., Kobayakawa, K., Yamada, H., Yokomizo, T., Iwamoto, Y., Okada, S., 2013. Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> Myeloid-derived suppressor cells play a critical role in the resolution of acute inflammation and the subsequent tissue repair process after spinal cord injury. *J Neurochem* 125, 74-88.
- Sarkar, J., Chaudhary, S., Jassim, S.H., Ozturk, O., Chamon, W., Ganesh, B., Tibrewal, S., Gandhi, S., Byun, Y.S., Hallak, J., Mahmud, D.L., Mahmud, N., Rondelli, D., Jain, S., 2013. CD11b+GR1+ myeloid cells secrete NGF and promote trigeminal ganglion neurite growth: implications for corneal nerve regeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54, 5920-5936.
- Sinha, P., Clements, V.K., Bunt, S.K., Albelda, S.M., Ostrand-Rosenberg, S., 2007. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response. *J Immunol* 179, 977-983.
- Talmadge, J.E., Gabrilovich, D.I., 2013. History of myeloid-derived suppressor cells. *Nat Rev Cancer* 13, 739-752.
- Tian, Z., Xu, L., Chen, Q., Feng, R., Lu, H., Tan, H., Kang, J., Wang, Y., Yan, H., 2019. Treatment of Surgical Brain Injury by Immune Tolerance Induced by Peripheral Intravenous Injection of Biotargeting Nanoparticles Loaded With Brain Antigens. *Front Immunol* 10, 743.
- Travis, Z.D., Sherchan, P., Hayes, W.K., Zhang, J.H., 2019. Surgically-induced brain injury: where are we now? *Chinese Neurosurgical Journal* 5, 29.
- Trellakis, S., Bruderek, K., Hutte, J., Elian, M., Hoffmann, T.K., Lang, S., Brandau, S., 2013. Granulocytic myeloid-derived suppressor cells are cryosensitive and their frequency does not correlate with serum concentrations of colony-stimulating factors in head and neck cancer. *Innate Immun* 19, 328-336.
- Valero, J., Berciano, M.T., Weruaga, E., Lafarga, M., Alonso, J.R., 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.



- Veglia, F., Perego, M., Gabrilovich, D., 2018. Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nat Immunol* 19, 108-119.
- Wang, T., Morgan, J.I., 2007. The Purkinje cell degeneration (pcd) mouse: an unexpected molecular link between neuronal degeneration and regeneration. *Brain Res* 1140, 26-40.
- Wang, Y., Sherchan, P., Huang, L., Akyol, O., McBride, D.W., Zhang, J.H., 2018. Multiple mechanisms underlying neuroprotection by secretory phospholipase A2 preconditioning in a surgically induced brain injury rat model. *Exp Neurol* 300, 30-40.
- Yang, F., Li, Y., Wu, T., Na, N., Zhao, Y., Li, W., Han, C., Zhang, L., Lu, J., 2016. TNF $\alpha$ -induced M-MDSCs promote transplant immune tolerance via nitric oxide. *J Mol Med (Berl)* 94, 911-920.
- Youn, J.I., Nagaraj, S., Collazo, M., Gabrilovich, D.I., 2008. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol* 181, 5791-5802.
- Zhang, W., Li, J., Qi, G., Tu, G., Yang, C., Xu, M., 2018. Myeloid-derived suppressor cells in transplantation: the dawn of cell therapy. *J Transl Med* 16, 19.
- Zhou, Z., French, D.L., Ma, G., Eisenstein, S., Chen, Y., Divino, C.M., Keller, G., Chen, S.H., Pan, P.Y., 2010. Development and function of myeloid-derived suppressor cells generated from mouse embryonic and hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 28, 620-632.
- Zhu, B., Kennedy, J.K., Wang, Y., Sandoval-García, C., Cao, L., Xiao, S., Wu, C., Elyaman, W., Khoury, S.J., 2011. Plasticity of Ly-6C(hi) myeloid cells in T cell regulation. *J Immunol* 187, 2418-2432.

## Figure legends

**Figure 1.** Proliferation analysis of T cells after their culture with IMCs or alone. A-D) Representative histograms showing the analysis by flow cytometry of control T cells alone (A), control T cells plus IMCs (B), activated T cells alone (C) and activated T cells plus IMCs (D). E) Chart showing the

precursor frequency for the four aforementioned conditions in A-D. Note how the culture with IMCs considerably reduced the proliferation of activated T cells. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*\* $p < 0.01$ , regarding control T cells alone; ### $p < 0.01$ , effect of IMCs on activated T cells. Ct-T, control T cells; Act-T, activated T cells.

**Figure 2.** Cell cycle analysis of T cells after their culture with IMCs or alone. A) Bar chart representing the percentage of T cells in each phase of the cell cycle in the different experimental groups. B-E) Charts showing the statistical information represented in A separately: G2/M phase (B), S phase (C), G0/G1 phase (D) and sub-G1 phase (E). Note how IMCs not only reduced the T-cell proliferation, but also induced their apoptosis. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , regarding control T cells alone; # $p < 0.05$ , ### $p < 0.01$ , effect of IMCs on activated T cells. Ct-T, control T cells; Act-T, activated T cells.

**Figure 3.** Analysis of motor coordination of PCD mice. Latency to fall (s) was measured in untreated, transplanted and sham-operated mice at P25 and P30. Note how sham-operated animals exhibited an overall worsening in their motor skills, which was avoided by transplanting IMCs. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ .

**Figure 4.** Identification of transplanted cells in the cerebellum of recipient animals. A) Immunolabeling of GFP<sup>+</sup> IMCs (green) in the cerebellum of one transplanted PCD mouse; note how transplanted cells are located mainly in the lobule IV-V, where the injection was performed (asterisk). B) Immunolabeling of a single GFP<sup>+</sup> cell (green) further from the injection site. C) Magnification of the outlined area in B; note its ramified morphology. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar: 200  $\mu\text{m}$  (A), 50  $\mu\text{m}$  (B), 25  $\mu\text{m}$  (C).

**Figure 5.** Identification and count of Purkinje cells in the cerebellum of PCD mice at P30. A-C) Immunolabeling of Purkinje cells with CB (green); nuclei were counterstained with DAPI (purple). Note how the surviving Purkinje cells are fundamentally located in the lobule X at P30 (C). D) Chart

showing the linear density of Purkinje cells both in the whole vermis and just in the lobule X. Note the significant reduction in the density of Purkinje cells in the lobule X of sham-operated animals, as well as the neuroprotective effect achieved by transplanting IMCs. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ . Scale bar: 200  $\mu\text{m}$  (A), 50  $\mu\text{m}$  (B) y 1 mm (C).

**Figure 6.** Analysis of the density of apoptotic cells in untreated, transplanted and sham-operated PCD animals. Note how sham-operated animals presented a greater density of apoptotic cells, as well as the protective effect achieved by transplanting IMCs. Data are expressed as media  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ .

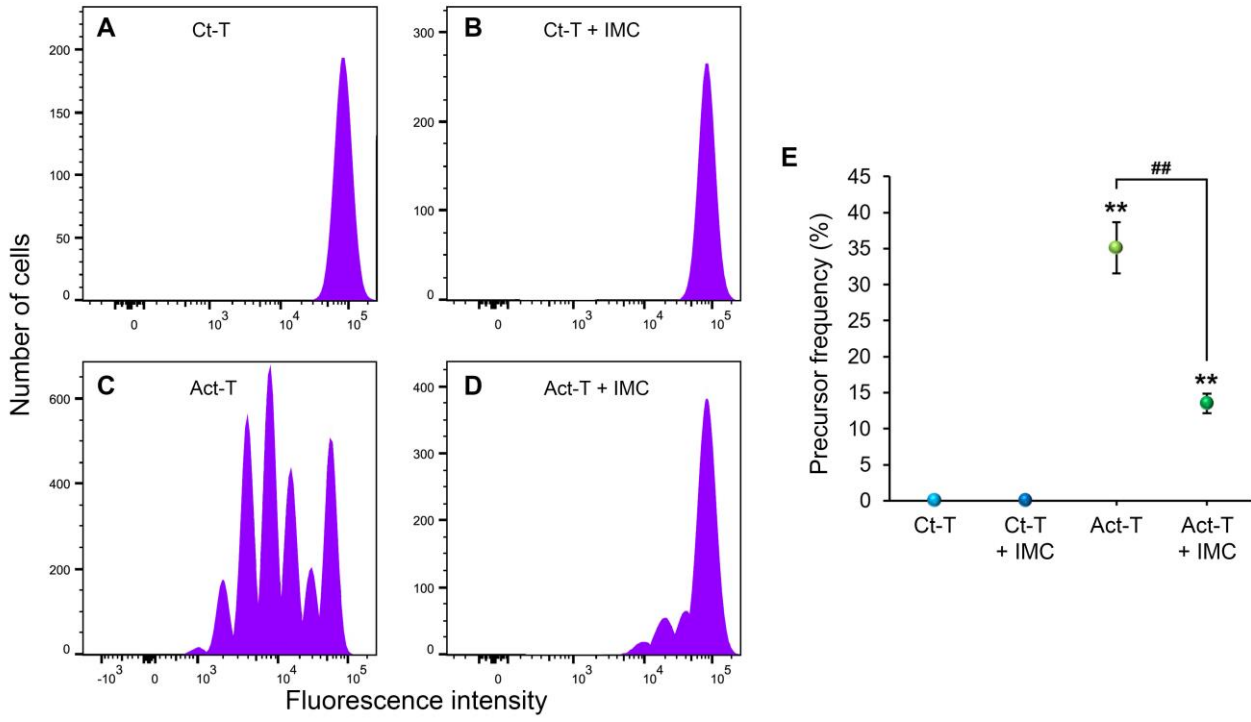


Figure 1

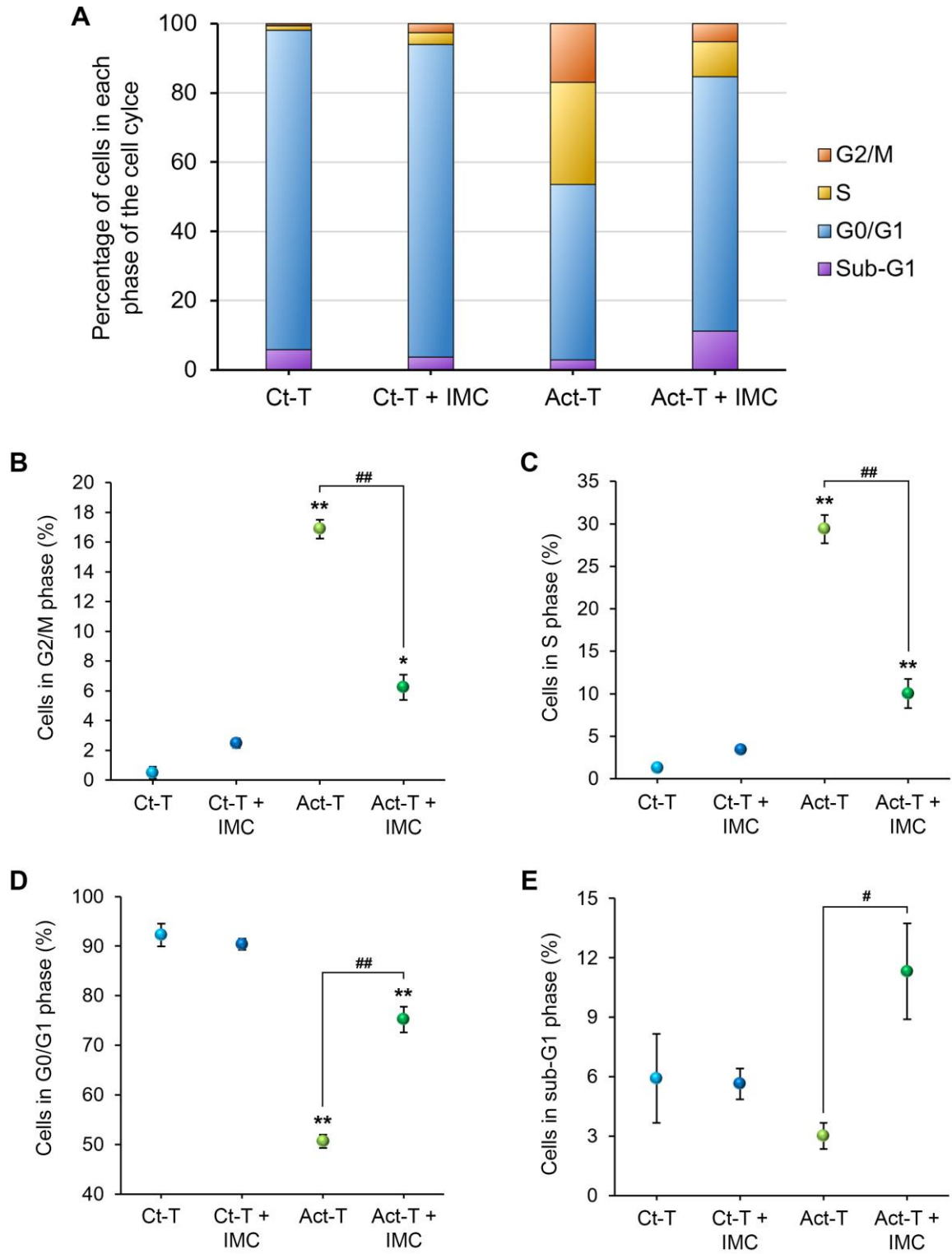


Figure 2

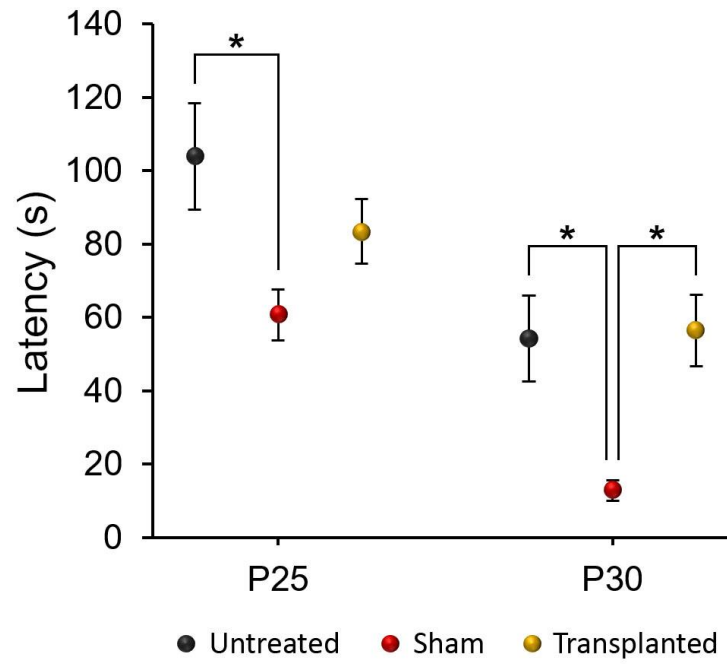


Figure 3

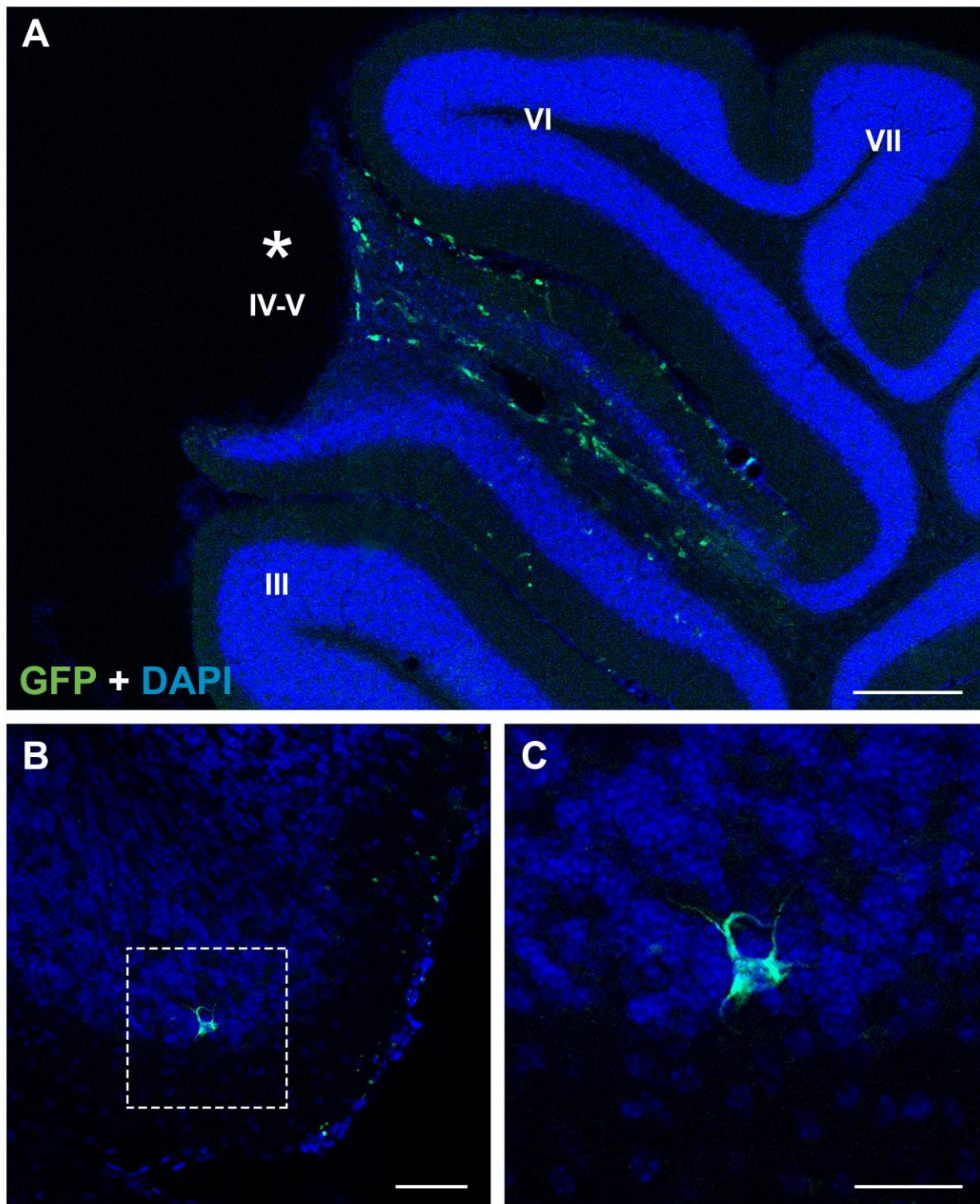


Figure 4

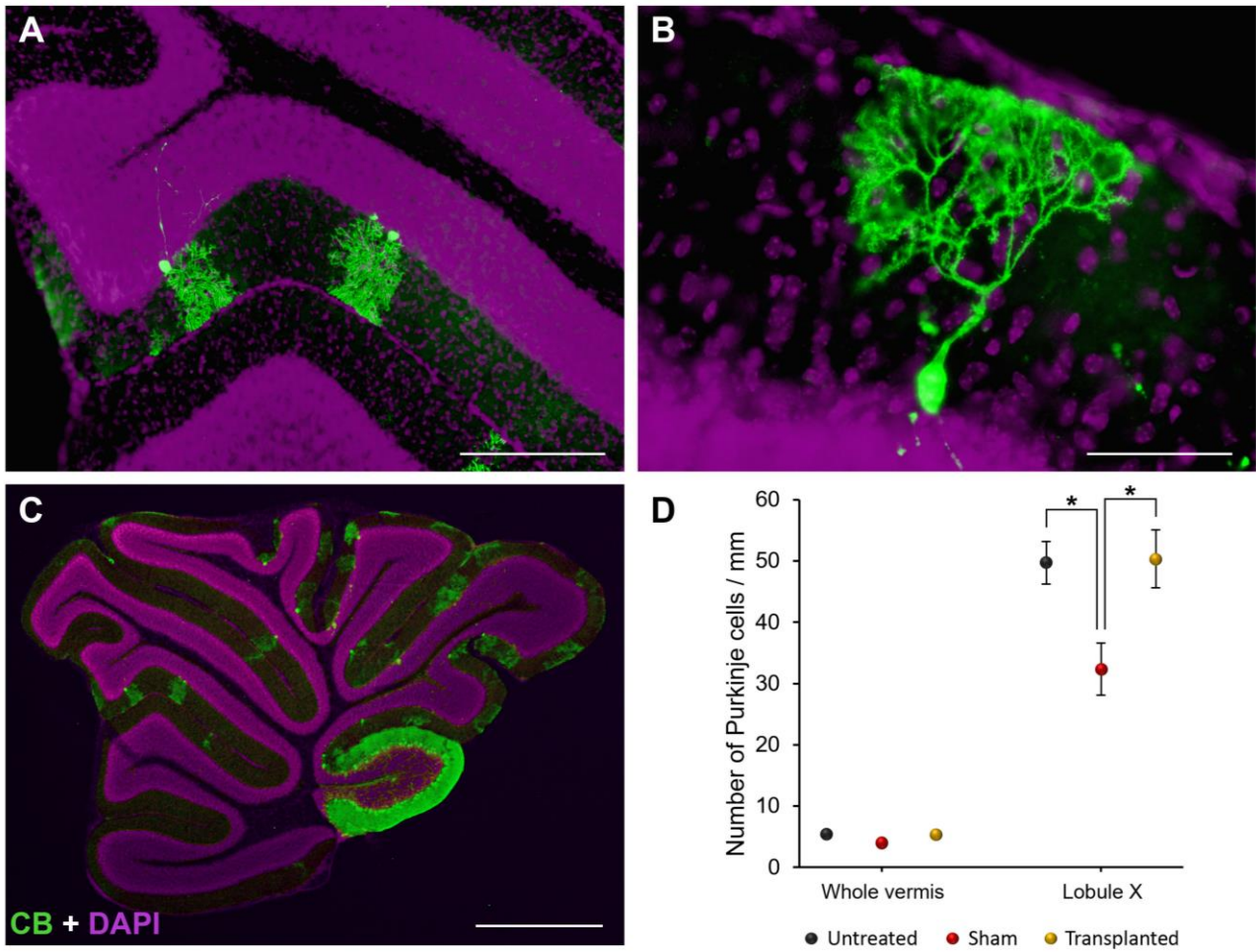


Figure 5



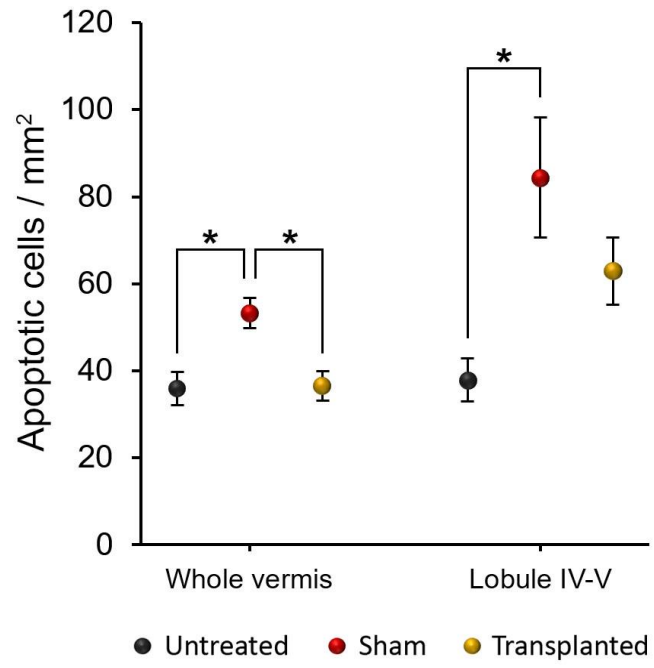


Figure 6



## **BIBLIOGRAFÍA**



- A**bbott LC, Sotelo C (2000) Ultrastructural analysis of catecholaminergic innervation in weaver and normal mouse cerebellar cortices. *J Comp Neurol* 426: 316-329.
- 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.
- Ajami B, Bennett JL, Krieger C, McNagny KM, Rossi FM (2011) Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. *Nat Neurosci* 14: 1142-1149.
- Akyol O, Sherchan P, Yilmaz G, Reis C, Ho WM, Wang Y, Huang L, Solaroglu I, Zhang JH (2018) Neurotrophin-3 provides neuroprotection via TrkC receptor dependent pErk5 activation in a rat surgical brain injury model. *Exp Neurol* 307: 82-89.
- Alcalde I (2003) Estudio neuroquímico del encéfalo del ratón mutante pcd y control. Trabajo de Grado de la Universidad de Salamanca.
- 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.
- B**abuska V, Houdek Z, Tuma J, Purkartova Z, Tumova J, Kralickova M, Vozeh F, Cendelin J (2015) Transplantation of Embryonic Cerebellar Grafts Improves Gait Parameters in Ataxic Lurcher Mice. *Cerebellum* 14: 632-641.
- Bacakova L, Zarubova J, Travnickova M, Musilkova J, Pajorova J, Slepicka P, Kasalkova NS, Svorcik V, Kolska Z, Motarjemi H, Molitor M (2018) Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells - a review. *Biotechnol Adv* 36: 1111-1126.
- Bae JS, Furuya S, Ahn SJ, Yi SJ, Hirabayashi Y, Jin HK (2005a) Neuroglial activation in Niemann-Pick Type C mice is suppressed by intracerebral transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Neurosci Lett* 381: 234-236.
- Bae JS, Furuya S, Shinoda Y, Endo S, Schuchman EH, Hirabayashi Y, Jin HK (2005b) 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, Modo 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.
- Baltanás FC, Casafont I, Lafarga V, Weruaga E, Alonso JR, Berciano MT, Lafarga M (2011a) Purkinje cell degeneration in pcd mice reveals large scale chromatin reorganization and gene silencing linked to defective DNA repair. *J Biol Chem* 286: 28287-28302.
- Baltanás FC, Casafont I, Weruaga E, Alonso JR, Berciano MT, Lafarga M (2011b) Nucleolar disruption and cajal body disassembly are nuclear hallmarks of DNA damage-induced neurodegeneration in purkinje cells. *Brain Pathol* 21: 374-388.
- Baltanás FC, Berciano MT, Valero J, Gómez C, Díaz D, Alonso JR, Lafarga M, Weruaga E (2013) Differential glial activation during the degeneration of Purkinje cells and mitral cells in the PCD mutant mice. *Glia* 61: 254-272.

- Baltanás FC, Berciano MT, Tapia O, Narcis JO, Lafarga V, Díaz D, Weruaga E, Santos E, Lafarga M (2019) Nucleolin reorganization and nucleolar stress in Purkinje cells of mutant PCD mice. *Neurobiol Dis* 127: 312-322.
- Banks WA, Gray AM, Erickson MA, Salameh TS, Damodarasamy M, Sheibani N, Meabon JS, Wing EE, Morofuji Y, Cook DG, Reed MJ (2015) Lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier disruption: roles of cyclooxygenase, oxidative stress, neuroinflammation, and elements of the neurovascular unit. *J Neuroinflammation* 12: 223.
- Barnie PA, Zhang P, Lv H, Wang D, Su X, Su Z, Xu H (2017) Myeloid-derived suppressor cells and myeloid regulatory cells in cancer and autoimmune disorders. *Exp Ther Med* 13: 378-388.
- 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.
- Bastianelli E (2003) Distribution of calcium-binding proteins in the cerebellum. *Cerebellum* 2: 242-262.
- Baufeld C, O'Loughlin E, Calcagno N, Madore C, Butovsky O (2018) Differential contribution of microglia and monocytes in neurodegenerative diseases. *J Neural Transm (Vienna)* 125: 809-826.
- Bäurle J, Helmchen C, Grüsser-Cornehls U (1997) Diverse effects of Purkinje cell loss on deep cerebellar and vestibular nuclei neurons in Purkinje cell degeneration mutant mice: a possible compensatory mechanism. *J Comp Neurol* 384: 580-596.
- Becker 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.
- Beckinghausen J, Sillitoe RV (2019) Insights into cerebellar development and connectivity. *Neurosci Lett* 688: 2-13.
- Beers DR, Zhao W, Wang J, Zhang X, Wen S, Neal D, Thonhoff JR, Alsuliman AS, Shpall EJ, Rezvani K, Appel SH (2017) ALS patients' regulatory T lymphocytes are dysfunctional, and correlate with disease progression rate and severity. *JCI Insight* 2: e89530.
- Ben Menachem-Zidon O, Gropp M, Ben Shushan E, Reubinoff B, Shveiky D (2019) Systemically transplanted mesenchymal stem cells induce vascular-like structure formation in a rat model of vaginal injury. *PLoS One* 14: e0218081.
- Berezniuk I, Vu HT, Lyons PJ, Sironi JJ, Xiao H, Burd B, Setou M, Angeletti RH, Ikegami K, Fricker LD (2012) Cytosolic carboxypeptidase 1 is involved in processing alpha- and beta-tubulin. *J Biol Chem* 287: 6503-6517.
- Björkqvist M, Wild EJ, Thiele J, Silvestroni A, Andre R, Lahiri N, Raibon E, Lee RV, Benn CL, Soulet D, Magnusson A, Woodman B, Landles C, Pouladi MA, Hayden MR, Khalili-Shirazi A, Lowdell MW, Brundin P, Bates GP, Leavitt BR, Möller T, Tabrizi SJ (2008) A novel pathogenic pathway of immune activation detectable before clinical onset in Huntington's disease. *J Exp Med* 205: 1869-1877.
- Björkqvist M, Wild EJ, Tabrizi SJ (2009) Harnessing immune alterations in neurodegenerative diseases. *Neuron* 64: 21-24.
- 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.
- Bogdándi EN, Balogh A, Felgyinszki N, Szatmári T, Persa E, Hildebrandt G, Sáfrány G, Lumniczky K (2010) Effects of low-dose radiation on the immune system of mice after total-body irradiation. *Radiat Res* 174: 480-489.
- Boyko AA, Troyanova NI, Kovalenko EI, Sapozhnikov AM (2017) Similarity and Differences in Inflammation-Related Characteristics of the Peripheral Immune System of Patients with Parkinson's and Alzheimer's Diseases. *Int J Mol Sci* 18: 2633.

- Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM (2000) From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 290: 1775-1779.
- Brochard V, Combadière B, Prigent A, Laouar Y, Perrin A, Beray-Berthet V, Bonduelle O, Alvarez-Fischer D, Callebert J, Launay JM, Duyckaerts C, Flavell RA, Hirsch EC, Hunot S (2009) Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. *J Clin Invest* 119: 182-192.
- Bronte V, Wang M, Overwijk WW, Surman DR, Pericle F, Rosenberg SA, Restifo NP (1998) Apoptotic death of CD8+ T lymphocytes after immunization: induction of a suppressive population of Mac-1+/Gr-1+ cells. *J Immunol* 161: 5313-5320.
- Bronte V, Zanovello P (2005) Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol* 5: 641-654.
- Bronte V (2009) Myeloid-derived suppressor cells in inflammation: uncovering cell subsets with enhanced immunosuppressive functions. *Eur J Immunol* 39: 2670-2672.
- Bronte V, Brandau S, Chen SH, Colombo MP, Frey AB, Greten TF, Mandruzzato S, Murray PJ, Ochoa A, Ostrand-Rosenberg S, Rodríguez PC, Sica A, Umansky V, Vonderheide RH, Gabrilovich DI (2016) Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun* 7: 12150.
- Brown D, Lydon J, McLaughlin M, Stuart-Tilley A, Tyszkowski R, Alper S (1996) Antigen retrieval in cryostat tissue sections and cultured cells by treatment with sodium dodecyl sulfate (SDS). *Histochem Cell Biol* 105: 261-267.
- Browne TC, McQuillan K, McManus RM, O'Reilly JA, Mills KH, Lynch MA (2013) IFN- $\gamma$  Production by amyloid  $\beta$ -specific Th1 cells promotes microglial activation and increases plaque burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Immunol* 190: 2241-2251.
- Bruger AM, Dorhoi A, Esendagli G, Barczyk-Kahlert K, van der Bruggen P, Lipoldova M, Perecko T, Santibáñez J, Saraiva M, van Ginderachter JA, Brandau S (2019) How to measure the immunosuppressive activity of MDSC: assays, problems and potential solutions. *Cancer Immunol Immunother* 68: 631-644.
- Bunt SK, Clements VK, Hanson EM, Sinha P, Ostrand-Rosenberg S (2009) Inflammation enhances myeloid-derived suppressor cell cross-talk by signaling through Toll-like receptor 4. *J Leukoc Biol* 85: 996-1004.
- Burrell K, Hill RP, Zadeh G (2012) High-resolution in-vivo analysis of normal brain response to cranial irradiation. *PLoS One* 7: e38366.
- Busse M, Michler E, von Hoff F, Dobrowolny H, Hartig R, Frodl T, Busse S (2017) Alterations in the Peripheral Immune System in Dementia. *J Alzheimer's Dis* 58: 1303-1313.
- Butovsky O, Siddiqui S, Gabriely G, Lanser AJ, Dake B, Murugaiyan G, Doykan CE, Wu PM, Gali RR, Iyer LK, Lawson R, Berry J, Krichevsky AM, Cudkowicz ME, Weiner HL (2012) Modulating inflammatory monocytes with a unique microRNA gene signature ameliorates murine ALS. *J Clin Invest* 122: 3063-3087.
- C**apotondo A, Milazzo R, Garcia-Manteiga JM, Cavalca E, Montepeloso A, Garrison BS, Peviani M, Rossi DJ, Biffi A (2017) Intracerebroventricular delivery of hematopoietic progenitors results in rapid and robust engraftment of microglia-like cells. *Sci Adv* 3: e1701211.
- 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.
- Carrancio S, López-Holgado N, Sánchez-Guijo FM, Villarón E, Barbado V, Tabera S, Díez-Campelo M, Blanco J, San Miguel JF, del Cañizo MC (2008) Optimization of mesenchymal stem cell expansion procedures by cell separation and culture conditions modification. *Exp Hematol* 36: 1014-1021.

- Carrancio S, Blanco B, Romo C, Muntión S, López-Holgado N, Blanco JF, Briñón JG, San Miguel JF, Sánchez-Guijo FM, del Cañizo MC (2011) Bone marrow mesenchymal stem cells for improving hematopoietic function: an in vitro and in vivo model. Part 2: Effect on bone marrow microenvironment. *PLoS One* 6: e26241.
- Cassetta L, Baekkevold ES, Brandau S, Bujko A, Cassatella MA, Dorhoi A, Krieg C, Lin A, Loré K, Marini O, Pollard JW, Roussel M, Scapini P, Umansky V, Adema GJ (2019) Deciphering myeloid-derived suppressor cells: isolation and markers in humans, mice and non-human primates. *Cancer Immunol Immunother* 68: 687-697.
- Catorce MN, Gevorkian G (2016) LPS-induced Murine Neuroinflammation Model: Main Features and Suitability for Pre-clinical Assessment of Nutraceuticals. *Curr Neuropharmacol* 14: 155-164.
- Cazareth J, Guyon A, Heurteaux C, Chabry J, Petit-Paitel A (2014) Molecular and cellular neuroinflammatory status of mouse brain after systemic lipopolysaccharide challenge: importance of CCR2/CCL2 signaling. *J Neuroinflammation* 11: 132.
- Cendelin J, Purkartova Z, Kubik J, Ulbricht E, Tichanek F, Kolinko Y (2018) Long-Term Development of Embryonic Cerebellar Grafts in Two Strains of Lurcher Mice. *Cerebellum* 17: 428-437.
- Chang YK, Chen MH, Chiang YH, Chen YF, Ma WH, Tseng CY, Soong BW, Ho JH, Lee OK (2011) Mesenchymal stem cell transplantation ameliorates motor function deterioration of spinocerebellar ataxia by rescuing cerebellar Purkinje cells. *J Biomed Sci* 18: 54.
- Chen KA, Cruz PE, Lanuto DJ, Flotte TR, Borchelt DR, Srivastava A, Zhang J, Steindler DA, Zheng T (2011) Cellular fusion for gene delivery to SCA1 affected Purkinje neurons. *Mol Cell Neurosci* 47: 61-70.
- Chen X, Hu Y, Cao Z, Liu Q, Cheng Y (2018a) Cerebrospinal Fluid Inflammatory Cytokine Aberrations in Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Immunol* 9: 2122.
- Chen X, Wang S, Cao W (2018b) Mesenchymal stem cell-mediated immunomodulation in cell therapy of neurodegenerative diseases. *Cell Immunol* 326: 8-14.
- Chen Y, Shao JZ, Xiang LX, Dong XJ, Zhang GR (2008) Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 815-820.
- Ciaramella A, Salani F, Bizzoni F, Pontieri FE, Stefani A, Pierantozzi M, Assogna F, Caltagirone C, Spalletta G, Bossù P (2013) Blood dendritic cell frequency declines in idiopathic Parkinson's disease and is associated with motor symptom severity. *PLoS One* 8: e65352.
- Ciaramella A, Salani F, Bizzoni F, Orfei MD, Caltagirone C, Spalletta G, Bossù P (2016) Myeloid dendritic cells are decreased in peripheral blood of Alzheimer's disease patients in association with disease progression and severity of depressive symptoms. *J Neuroinflammation* 13: 18.
- Cicchetti F, Barker RA (2014) The glial response to intracerebrally delivered therapies for neurodegenerative disorders: is this a critical issue? *Front Pharmacol* 5: 139.
- Correale J, Marrodan M, Ysraelit MC (2019) Mechanisms of Neurodegeneration and Axonal Dysfunction in Progressive Multiple Sclerosis. *Biomedicines* 7: 14.
- Crespo C, Gracia-Llanes FJ, Gutiérrez-Mecinas M, Blasco-Ibáñez JM, Marqués-Marí AI, Nacher 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 (Eds.) *La olfacción en España*, 71-95. SBI, Salamanca.
- Crook KR, Liu P (2014) Role of myeloid-derived suppressor cells in autoimmune disease. *World J Immunol* 4: 26-33.



- D'Angelo E, Casali S (2012) Seeking a unified framework for cerebellar function and dysfunction: from circuit operations to cognition. *Front Neural Circuits* 6: 116.
- Dantuma E, Merchant S, Sugaya K (2010) Stem cells for the treatment of neurodegenerative diseases. *Stem Cell Res Ther* 1: 37.
- Dantzer R (2018) Neuroimmune Interactions: From the Brain to the Immune System and Vice Versa. *Physiol Rev* 98: 477-504.
- Davydova TV, Fomina VG, Voskresenskaya NI, Doronina OA (2003) Phagocytic activity and state of bactericidal systems in polymorphonuclear leukocytes from patients with Alzheimer's disease. *Bull Exp Biol Med* 136: 355-357.
- De Sanctis F, Bronte V, Ugel S (2016) Tumor-Induced Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Microbiol Spectr* 4.
- De Vocht N, Praet J, Reekmans K, Le Blon D, Hoornaert C, Daans J, Berneman Z, van der Linden A, Ponsaerts P (2013) Tackling the physiological barriers for successful mesenchymal stem cell transplantation into the central nervous system. *Stem Cell Res Ther* 4: 101.
- DelaRosa O, Dalemans W, Lombardo E (2012) Mesenchymal stem cells as therapeutic agents of inflammatory and autoimmune diseases. *Curr Opin Biotechnol* 23: 978-983.
- Díaz D, Lepousez G, Gheusi G, Alonso JR, Lledo PM, Weruaga E (2012a) Bone marrow cell transplantation restores olfaction in the degenerated olfactory bulb. *J Neurosci* 32: 9053-9058.
- Díaz D, Recio JS, Weruaga E, Alonso JR (2012b) Mild cerebellar neurodegeneration of aged heterozygous PCD mice increases cell fusion of Purkinje and bone marrow-derived cells. *Cell Transplant* 21: 1595-1602.
- Díaz D, Muñoz-Castañeda R, Alonso JR, Weruaga E (2015) Bone Marrow-Derived Stem Cells and Strategies for Treatment of Nervous System Disorders: Many Protocols, and Many Results. *Neuroscientist* 21: 637-652.
- Díaz D, Piquer-Gil M, Recio JS, Martínez-Losa MM, Alonso JR, Weruaga E, Álvarez-Dolado M (2018) Bone marrow transplantation improves motor activity in a mouse model of ataxia. *J Tissue Eng Regen Med* 12: e1950-e1961.
- Díaz D, del Pilar C, Carretero J, Alonso JR, Weruaga E (2019) Daily bone marrow cell transplantations for the management of fast neurodegenerative processes. *J Tissue Eng Regen Med* 13: 1702-1711.
- Díaz-Montero CM, Salem ML, Nishimura MI, Garrett-Mayer E, Cole DJ, Montero AJ (2009) Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 58: 49-59.
- Dimarino AM, Caplan AI, Bonfield TL (2013) Mesenchymal Stem Cells in Tissue Repair. *Front Immunol* 4: 201.
- Doetsch F (2003) A niche for adult neural stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 13: 543-550.
- Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1997) Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17: 5046-5061.
- Dolcetti L, Peranzoni E, Ugel S, Marigo I, Fernández-Gómez A, Mesa C, Geilich M, Winkels G, Traggiai E, Casati A, Grassi F, Bronte V (2010) Hierarchy of immunosuppressive strength among myeloid-derived suppressor cell subsets is determined by GM-CSF. *Eur J Immunol* 40: 22-35.
- Dominici M, Le Blanc K, 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. *Cytotherapy* 8: 315-317.

- Drujont L, Carretero-Iglesia L, Bouchet-Delbos L, Beriou G, Merieau E, Hill M, Delneste Y, Cuturi MC, Louvet C (2014) Evaluation of the therapeutic potential of bone marrow-derived myeloid suppressor cell (MDSC) adoptive transfer in mouse models of autoimmunity and allograft rejection. *PLoS One* 9: e100013.
- Dubbelaar ML, Kracht L, Eggen BJL, Boddeke E (2018) The Kaleidoscope of Microglial Phenotypes. *Front Immunol* 9: 1753.
- E**ggenhofer E, Benseler V, Kroemer A, Popp FC, Geissler EK, Schlitt HJ, Baan CC, Dahlke MH, Hoogduijn MJ (2012) Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion. *Front Immunol* 3: 297.
- 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.
- Escartin C, Bonvento G (2008) Targeted activation of astrocytes: a potential neuroprotective strategy. *Mol Neurobiol* 38: 231-241.
- Evans MC, Couch Y, Sibson N, Turner MR (2013) Inflammation and neurovascular changes in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Cell Neurosci* 53: 34-41.
- F**ernández-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.
- Fiala M, Lin J, Ringman J, Kermani-Arab V, Tsao G, Patel A, Lossinsky AS, Graves MC, Gustavson A, Sayre J, Sofroni E, Suárez T, Chiappelli F, Bernard G (2005) Ineffective phagocytosis of amyloid-beta by macrophages of Alzheimer's disease patients. *J Alzheimer's Dis* 7: 221-232.
- Filiano AJ, Xu Y, Tustison NJ, Marsh RL, Baker W, Smirnov I, Overall CC, Gadani SP, Turner SD, Weng Z, Peerzade SN, Chen H, Lee KS, Scott MM, Beenhakker MP, Litvak V, Kipnis J (2016) Unexpected role of interferon-gamma in regulating neuronal connectivity and social behaviour. *Nature* 535: 425-429.
- Fink AJ, Englund C, Daza RA, Pham D, Lau C, Nivison M, Kowalczyk T, Hevner RF (2006) Development of the deep cerebellar nuclei: transcription factors and cell migration from the rhombic lip. *J Neurosci* 26: 3066-3076.
- Fischer UM, Harting MT, Jiménez F, Monzón-Posadas WO, Xue H, Savitz SI, Laine GA, Cox CS (2009) Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. *Stem Cells Dev* 18: 683-692.
- Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP (1968) Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 6: 230-247.
- 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.
- Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV (1974) Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* 17: 331-340.
- Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen PS, Lassmann H (2009) The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain* 132: 1175-1189.
- Fu HQ, Yang T, Xiao W, Fan L, Wu Y, Terrando N, Wang TL (2014) Prolonged neuroinflammation after lipopolysaccharide exposure in aged rats. *PLoS One* 9: e106331.

- Fuzzati-Armentero MT, Cerri S, Blandini F (2019) Peripheral-Central Neuroimmune Crosstalk in Parkinson's Disease: What Do Patients and Animal Models Tell Us? *Front Neurol* 10: 232.
- G**abrilovich DI, Bronte V, Chen SH, Colombo MP, Ochoa A, Ostrand-Rosenberg S, Schreiber H (2007) The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res* 67: 425.
- Gabrilovich DI, Nagaraj S (2009) Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9: 162-174.
- Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V (2012) Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol* 12: 253-268.
- Gabrilovich DI (2017) Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Immunol Res* 5: 3-8. Gammon K (2014) Neurodegenerative disease: brain windfall. *Nature* 515: 299-300.
- 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.
- Giménez-Llort L, Maté I, Manassra R, Vida C, de la Fuente M (2012) Peripheral immune system and neuroimmune communication impairment in a mouse model of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1262: 74-84.
- Gimeno R, Barquinero J (2011) Myeloid-derived suppressor cells (MDSC): Another player in the orchestra. *Inmunología* 30: 45-53.
- Gitler AD, Dhillon P, Shorter J (2017) Neurodegenerative disease: models, mechanisms, and a new hope. *Dis Models Mech* 10: 499-502.
- Glickstein M, Sultan F, Voogd J (2011) Functional localization in the cerebellum. *Cortex* 47: 59-80.
- Gómez-Perdiguero E, Klapproth K, Schulz C, Busch K, Azzoni E, Crozet L, Garner H, Trouillet C, de Bruijn MF, Geissmann F, Rodewald HR (2015) Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* 518: 547-551.
- González H, Elgueta D, Montoya A, Pacheco R (2014) Neuroimmune regulation of microglial activity involved in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *J Neuroimmunol* 274: 1-13.
- González H, Pacheco R (2014) T-cell-mediated regulation of neuroinflammation involved in neurodegenerative diseases. *J Neuroinflammation* 11: 201.
- Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC (1996) Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 183: 1797-1806.
- 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.
- 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.
- Grillo MA (1970) Cytoplasmic inclusions resembling nucleoli in sympathetic neurons of adult rats. *J Cell Biol* 45: 100-117.
- Guo Y, Su L, Wu J, Zhang D, Zhang X, Zhang G, Li T, Wang J, Liu C (2012) Assessment of the green fluorescence protein labeling method for tracking implanted mesenchymal stem cells. *Cytotechnology* 64: 391-401.
- Gupta P, Sil S, Ghosh R, Ghosh A, Ghosh T (2018) Intracerebroventricular A $\beta$ -Induced Neuroinflammation Alters Peripheral Immune Responses in Rats. *J Mol Neurosci* 66: 572-586.

- Hakim R, Covacu R, Zachariadis V, Frostell A, Sankavaram SR, Brundin L, Svensson M (2019) Mesenchymal stem cells transplanted into spinal cord injury adopt immune cell-like characteristics. *Stem Cell Res Ther* 10: 115.
- Halász N, Johansson O, Hokfelt 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.
- Halász N (1990) Morphological basis of information processing in the olfactory bulb. En: Schild D (Ed.) *Chemosensory Information Processing*, 175-190. Springer-Verlag, Berlin.
- Han Y, Li X, Zhang Y, Chang F, Ding J (2019) Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine. *Cells* 8: 886.
- 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.
- Hatzistergos KE, Quevedo H, Oskouei BN, Hu Q, Feigenbaum GS, Margitich IS, Mazhari R, Boyle AJ, Zambrano JP, Rodríguez JE, Dulce R, Pattany PM, Valdes D, Revilla C, Heldman AW, McNiece I, Hare JM (2010) Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. *Circ Res* 107: 913-922.
- He Z, Hua J, Qian D, Gong J, Lin S, Xu C, Wei G, Meng H, Yang T, Zhou B, Song Z (2016) Intravenous hMSCs Ameliorate Acute Pancreatitis in Mice via Secretion of Tumor Necrosis Factor-alpha Stimulated Gene/Protein 6. *Sci Rep* 6: 38438.
- Herrmann RP, Sturm MJ (2014) Adult human mesenchymal stromal cells and the treatment of graft versus host disease. *Stem Cells Cloning* 7: 45-52.
- Highfill SL, Rodríguez PC, Zhou Q, Goetz CA, Koehn BH, Veenstra R, Taylor PA, Panoskaltsis-Mortari A, Serody JS, Munn DH, Tolar J, Ochoa AC, Blazar BR (2010) Bone marrow myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) inhibit graft-versus-host disease (GVHD) via an arginase-1-dependent mechanism that is up-regulated by interleukin-13. *Blood* 116: 5738-5747.
- Higuera GA, Iaffaldano G, Bedar M, Shpak G, Broersen R, Munshi ST, Dupont C, Gribnau J, de Vrij FMS, Kushner SA, de Zeeuw CI *et al.* (2017) An expandable embryonic stem cell-derived Purkinje neuron progenitor population that exhibits in vivo maturation in the adult mouse cerebellum. *Sci Rep* 7: 8863.
- Hirota J, Shimizu S (2012) Chapter 5.2 - Routes of Administration. En: Hedrich HJ (Ed.) *The Laboratory Mouse (Second Edition)*, 709-725. Academic Press, Boston.
- Hosomi S, Koyama Y, Watabe T, Ohnishi M, Ogura H, Yamashita T, Shimazu T (2019) Myeloid-Derived Suppressor Cells Infiltrate the Brain and Suppress Neuroinflammation in a Mouse Model of Focal Traumatic Brain Injury. *Neuroscience* 406: 457-466.
- Hsieh J, Liu JW, Harn HJ, Hsueh KW, Rajamani K, Deng YC, Chia CM, Shyu WC, Lin SZ, Chiou TW (2017) Human Olfactory Ensheathing Cell Transplantation Improves Motor Function in a Mouse Model of Type 3 Spinocerebellar Ataxia. *Cell Transplant* 26: 1611-1621.
- Huang B, Pan PY, Li Q, Sato AI, Levy DE, Bromberg J, Divino CM, Chen SH (2006) Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res* 66: 1123-1131.
- Huang B, Tabata Y, Gao JQ (2012) Mesenchymal stem cells as therapeutic agents and potential targeted gene delivery vehicle for brain diseases. *J Control Release* 162: 464-473.

Huda F, Fan Y, Suzuki M, Konno A, Matsuzaki Y, Takahashi N, Chan JK, Hirai H (2016) Fusion of Human Fetal Mesenchymal Stem Cells with "Degenerating" Cerebellar Neurons in Spinocerebellar Ataxia Type 1 Model Mice. *PLoS One* 11: e0164202.

**I**oannou M, Alissafi T, Lazaridis I, Deraos G, Matsoukas J, Gravanis A, Mastorodemos V, Plaitakis A, Sharpe A, Boumpas D, Verginis P (2012) Crucial role of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in the regulation of central nervous system autoimmune disease. *J Immunol* 188: 1136-1146.

Ito M (2006) Cerebellar circuitry as a neuronal machine. *Prog Neurobiol* 78: 272-303.

**J**aarsma D, Ruigrok TJ, Caffè R, Cozzari C, Levey AI, Mugnaini E, Voogd J (1997) Cholinergic innervation and receptors in the cerebellum. *Prog Brain Res* 114: 67-96.

Jadhav V, Solaroglu I, Obenaus A, Zhang JH (2007) Neuroprotection against surgically induced brain injury. *Surg Neurol* 67: 15-20.

Jairani PS, Aswathy PM, Krishnan D, Menon RN, Verghese J, Mathuranath PS, Gopala S (2019) Apolipoprotein E Polymorphism and Oxidative Stress in Peripheral Blood-Derived Macrophage-Mediated Amyloid-Beta Phagocytosis in Alzheimer's Disease Patients. *Cell Mol Neurobiol* 39: 355-369.

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-León M, Martínez S (2010) Mesenchymal stem cells rescue Purkinje cells and improve motor functions in a mouse model of cerebellar ataxia. *Neurobiol Dis* 40: 415-423.

Joyce N, Annett G, Wirthlin L, Olson S, Bauer G, Nolte JA (2010) Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease. *Regen Med* 5: 933-946.

**K**abat M, Bobkov I, Kumar S, Grumet M (2020) Trends in mesenchymal stem cell clinical trials 2004-2018: Is efficacy optimal in a narrow dose range? *Stem Cells Transl Med* 9: 17-27.

Kabba JA, Xu Y, Christian H, Ruan W, Chenai K, Xiang Y, Zhang L, Saavedra JM, Pang T (2018) Microglia: Housekeeper of the Central Nervous System. *Cell Mol Neurobiol* 38: 53-71.

Kalinina E, Biswas R, Berezniuk I, Hermoso A, Avilés FX, Fricker LD (2007) A novel subfamily of mouse cytosolic carboxypeptidases. *FASEB J* 21: 836-850.

Kano M, Watanabe T, Uesaka N, Watanabe M (2018) Multiple Phases of Climbing Fiber Synapse Elimination in the Developing Cerebellum. *Cerebellum* 17: 722-734.

Karakaya M, Paketci C, Altmueller J, Thiele H, Hoelker I, Yis U, Wirth B (2019) Biallelic variant in AGTPBP1 causes infantile lower motor neuron degeneration and cerebellar atrophy. *Am J Med Genet A* 179: 1580-1584.

Karantalis V, Hare JM (2015) Use of mesenchymal stem cells for therapy of cardiac disease. *Circ Res* 116: 1413-1430.

Kassis I, Vaknin-Dembinsky A, Karussis D (2011) Bone marrow mesenchymal stem cells: agents of immunomodulation and neuroprotection. *Curr Stem Cell Res Ther* 6: 63-68.

Keaney J, Campbell M (2015) The dynamic blood-brain barrier. *FEBS J* 282: 4067-4079.

Kemp K, Gordon D, Wraith DC, Mallam E, Hartfield E, Uney J, Wilkins A, Scolding N (2011) Fusion between human mesenchymal stem cells and rodent cerebellar Purkinje cells. *Neuropathol Appl Neurobiol* 37: 166-178.

- Khalili MA, Anvari M, Hekmati-Moghadam SH, Sadeghian-Nodoushan F, Fesahat F, Miresmaeili SM (2012) Therapeutic benefit of intravenous transplantation of mesenchymal stem cells after experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 21: 445-451.
- Kim EJ, Kim N, Cho SG (2013) The potential use of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Mol Med* 45: e2.
- Kim KN, Oh SH, Lee KH, Yoon DH (2006) Effect of human mesenchymal stem cell transplantation combined with growth factor infusion in the repair of injured spinal cord. *Acta Neurochir Suppl* 99: 133-136.
- Kim SU, de Vellis J (2005) Microglia in health and disease. *J Neurosci Res* 81: 302-313.
- King IL, Dickendesher TL, Segal BM (2009) Circulating Ly-6C<sup>+</sup> myeloid precursors migrate to the CNS and play a pathogenic role during autoimmune demyelinating disease. *Blood* 113: 3190-3197.
- King KY, Goodell MA (2011) Inflammatory modulation of HSCs: viewing the HSC as a foundation for the immune response. *Nat Rev Immunol* 11: 685-692.
- 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. *Exp Brain Res* 99: 191-204.
- Kraitchman DL, Tatsumi M, Gilson WD, Ishimori T, Kedziorek D, Walczak P, Segars WP, Chen HH, Fritzges D, Izbudak I, Young RG, Marcelino M, Pittenger MF, Solaiyappan M, Boston RC, Tsui BM, Wahl RL, Bulte JW (2005) Dynamic imaging of allogeneic mesenchymal stem cells trafficking to myocardial infarction. *Circulation* 112: 1451-1461.
- Kurtz A (2008) Mesenchymal stem cell delivery routes and fate. *Int J Stem Cells* 1: 1-7.
- 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**andis 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.
- LaVail MM, Blanks JC, Mullen RJ (1982) Retinal degeneration in the pcd cerebellar mutant mouse. I. Light microscopic and autoradiographic analysis. *J Comp Neurol* 212: 217-230.
- Le Blanc K (2006) Mesenchymal stromal cells: Tissue repair and immune modulation. *Cytotherapy* 8: 559-561.
- Le Blanc K, Mougiakakos D (2012) Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat Rev Immunol* 12: 383-396.
- Le Page A, Bourgade K, Lamoureux J, Frost E, Pawelec G, Larbi A, Witkowski JM, Dupuis G, Fülöp T (2015) NK Cells are Activated in Amnesic Mild Cognitive Impairment but not in Mild Alzheimer's Disease Patients. *J Alzheimer's Dis* 46: 93-107.
- Le Page A, Lamoureux J, Bourgade K, Frost EH, Pawelec G, Witkowski JM, Larbi A, Dupuis G, Fulop T (2017) Polymorphonuclear Neutrophil Functions are Differentially Altered in Amnesic Mild Cognitive Impairment and Mild Alzheimer's Disease Patients. *J Alzheimer's Dis* 60: 23-42.
- Le Page A, Dupuis G, Frost EH, Larbi A, Pawelec G, Witkowski JM, Fulop T (2018) Role of the peripheral innate immune system in the development of Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* 107: 59-66.

- Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, Kota DJ, Ylostalo J, Larson BL, Semprun-Prieto L, Delafontaine P, Prockop DJ (2009) Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell* 5: 54-63.
- Leibacher J, Henschler R (2016) Biodistribution, migration and homing of systemically applied mesenchymal stem/stromal cells. *Stem Cell Res Ther* 7: 7.
- León-Rico D, Fernández-García M, Aldea M, Sánchez R, Peces-Barba M, Martínez-Palacio J, Yáñez RM, Almarza E (2015) Comparison of haematopoietic stem cell engraftment through the retro-orbital venous sinus and the lateral vein: alternative routes for bone marrow transplantation in mice. *Lab Anim* 49: 132-141.
- Leyns CEG, Holtzman DM (2017) Glial contributions to neurodegeneration in tauopathies. *Mol Neurodegener* 12: 50.
- Li J, Baud O, Vartanian T, Volpe JJ, Rosenberg PA (2005) Peroxynitrite generated by inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase mediates microglial toxicity to oligodendrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 9936-9941.
- Li J, Imitola J, Snyder EY, Sidman RL (2006) Neural stem cells rescue nervous purkinje neurons by restoring molecular homeostasis of tissue plasminogen activator and downstream targets. *J Neurosci* 26: 7839-7848.
- Li J, Ramenaden ER, Peng J, Koito H, Volpe JJ, Rosenberg PA (2008) Tumor necrosis factor alpha mediates lipopolysaccharide-induced microglial toxicity to developing oligodendrocytes when astrocytes are present. *J Neurosci* 28: 5321-5330.
- Li N, Hua J (2017) Interactions between mesenchymal stem cells and the immune system. *Cell Mol Life Sci* 74: 2345-2360.
- Li YH, Feng L, Zhang GX, Ma CG (2015) Intranasal delivery of stem cells as therapy for central nervous system disease. *Exp Mol Pathol* 98: 145-151.
- Lindvall O, Kokaia Z, Martínez-Serrano A (2004) Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work. *Nat Med* 10 Suppl: S42-50.
- Lindvall O, Kokaia Z (2010) Stem cells in human neurodegenerative disorders--time for clinical translation? *J Clin Invest* 120: 29-40.
- Liu B, Ye B, Zhu X, Huang G, Yang L, Zhu P, Du Y, Wu J, Meng S, Tian Y, Fan Z (2017) IL-7/Ralpha glutamylation and activation of transcription factor Sall3 promote group 3 ILC development. *Nat Commun* 8: 231.
- Lois C, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A (1996) Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271: 978-981.
- Lopes PC (2016) LPS and neuroinflammation: a matter of timing. *Inflammopharmacology* 24: 291-293.
- Lopes Pinheiro MA, Kooij G, Mizee MR, Kamermans A, Enzmann G, Lyck R, Schwaninger M, Engelhardt B, de Vries HE (2016) Immune cell trafficking across the barriers of the central nervous system in multiple sclerosis and stroke. *Biochim Biophys Acta* 1862: 461-471.
- Lucin KM, Wyss-Coray T (2009) Immune activation in brain aging and neurodegeneration: too much or too little? *Neuron* 64: 110-122.
- Lumnitzky K, Szatmari T, Safrany G (2017) Ionizing Radiation-Induced Immune and Inflammatory Reactions in the Brain. *Front Immunol* 8: 517.
- M**altman DJ, Hardy SA, Przyborski SA (2011) Role of mesenchymal stem cells in neurogenesis and nervous system repair. *Neurochem Int* 59: 347-356.
- Marcet P, Santos N, Borlongan CV (2017) When friend turns foe: central and peripheral neuroinflammation in central nervous system injury. *Neuroimmunol Neuroinflamm* 4: 82-92.

- Marchena M, Lara J, Aijón J, Germain F, de la Villa P, Velasco A (2011) The retina of the PCD/PCD mouse as a model of photoreceptor degeneration. A structural and functional study. *Exp Eye Res* 93: 607-617.
- Marigo I, Bosio E, Solito S, Mesa C, Fernández A, Dolcetti L, Ugel S, Sonda N, Biciato S, Falisi E, Calabrese F, Basso G, Zanovello P, Cozzi E, Mandruzzato S, Bronte V (2010) Tumor-induced tolerance and immune suppression depend on the C/EBPbeta transcription factor. *Immunity* 32: 790-802.
- Martinez-Outschoorn UE, Lin Z, Whitaker-Menezes D, Howell A, Lisanti MP, Sotgia F (2012) Ketone bodies and two-compartment tumor metabolism: stromal ketone production fuels mitochondrial biogenesis in epithelial cancer cells. *Cell Cycle* 11: 3956-3963.
- Massengale M, Wagers AJ, Vogel H, Weissman IL (2005) Hematopoietic cells maintain hematopoietic fates upon entering the brain. *J Exp Med* 201: 1579-1589.
- Matsuura S, Shuvaev AN, Iizuka A, Nakamura K, Hirai H (2014) Mesenchymal stem cells ameliorate cerebellar pathology in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 1. *Cerebellum* 13: 323-330.
- 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.
- McManus RM, Heneka MT (2017) Role of neuroinflammation in neurodegeneration: new insights. *Alzheimer's Res Ther* 9: 14.
- Meirelles LaS, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI (2009) Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev* 20: 419-427.
- Melero-Jerez C, Ortega MC, Moliné-Velázquez V, Clemente D (2016) Myeloid derived suppressor cells in inflammatory conditions of the central nervous system. *Biochim Biophys Acta* 1862: 368-380.
- Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, Scadden DT, Ma'ayan A, Enikolopov GN, Frenette PS (2010) Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 466: 829-834.
- Mendonça LS, Nobrega C, Hirai H, Kaspar BK, Pereira de Almeida L (2015) Transplantation of cerebellar neural stem cells improves motor coordination and neuropathology in Machado-Joseph disease mice. *Brain* 138: 320-335.
- Messmann JJ, Reisser T, Leithäuser F, Lutz MB, Debatin KM, Strauss G (2015) In vitro-generated MDSCs prevent murine GVHD by inducing type 2 T cells without disabling antitumor cytotoxicity. *Blood* 126: 1138-1148.
- Meyerrose T, Olson S, Pontow S, Kalomoiris S, Jung Y, Annett G, Bauer G, Nolte JA (2010) Mesenchymal stem cells for the sustained in vivo delivery of bioactive factors. *Adv Drug Deliv Rev* 62: 1167-1174.
- Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKecher SR (2000) Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 290: 1779-1782.
- Miall RC (2013) Cerebellum: Anatomy and Function. En: Pfaff DW (Ed.) *Neuroscience in the 21st Century: From Basic to Clinical*, 1149-1167. Springer, New York.
- 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.



- Moliné-Velázquez V, Cuervo H, Vila-Del Sol V, Ortega MC, Clemente D, de Castro F (2011) Myeloid-derived suppressor cells limit the inflammation by promoting T lymphocyte apoptosis in the spinal cord of a murine model of multiple sclerosis. *Brain Pathol* 21: 678-691.
- Molon B, Ugel S, Del Pozzo F, Soldani C, Zilio S, Avella D, de Palma A, Mauri P, Monegal A, Rescigno M, Savino B, Colombo P, Jonjic N, Pecanic S, Lazzarato L, Fruttero R, Gasco A, Bronte V, Viola A (2011) Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells. *J Exp Med* 208: 1949-1962.
- Moravan MJ, Olschowka JA, Williams JP, O'Banion MK (2011) Cranial irradiation leads to acute and persistent neuroinflammation with delayed increases in T-cell infiltration and CD11c expression in C57BL/6 mouse brain. *Radiat Res* 176: 459-473.
- Moravan MJ, Olschowka JA, Williams JP, O'Banion MK (2016) Brain radiation injury leads to a dose- and time-dependent recruitment of peripheral myeloid cells that depends on CCR2 signaling. *J Neuroinflammation* 13: 30.
- Morganti JM, Jopson TD, Liu S, Gupta N, Rosi S (2014) Cranial irradiation alters the brain's microenvironment and permits CCR2+ macrophage infiltration. *PLoS One* 9: e93650.
- Morrison SJ, Scadden DT (2014) The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* 505: 327-334.
- Movahedi K, Guilliams M, van den Bossche J, van den Bergh R, Gysemans C, Beschin A, De Baetselier P, van Ginderachter JA (2008) Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood* 111: 4233-4244.
- 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.
- Muñoz-Castañeda R, Díaz D, Peris L, Andrieux A, Bosc C, Muñoz-Castañeda JM, Janke C, Alonso JR, Moutin MJ, Weruaga E (2018) Cytoskeleton stability is essential for the integrity of the cerebellum and its motor- and affective-related behaviors. *Sci Rep* 8: 3072.
- Muñoz-Eliás G, Marcus AJ, Coyne TM, Woodbury D, Black IB (2004) Adult bone marrow stromal cells in the embryonic brain: engraftment, migration, differentiation, and long-term survival. *J Neurosci* 24: 4585-4595.
- N**agaraj S, Gupta K, Pisarev V, Kinarsky L, Sherman S, Kang L, Herber DL, Schneck J, Gabrilovich DI (2007) Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nat Med* 13: 828-835.
- Nagaraj S, Gabrilovich DI (2008) Tumor escape mechanism governed by myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res* 68: 2561-2563.
- Nakamura K, Mieda T, Suto N, Matsuura S, Hirai H (2015) Mesenchymal stem cells as a potential therapeutic tool for spinocerebellar ataxia. *Cerebellum* 14: 165-170.
- 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.
- Oliveira Miranda C, Marcelo A, Silva TP, Barata J, Vasconcelos-Ferreira A, Pereira D, Nóbrega C, Duarte S, Barros I, Alves J, Sereno J, Petrella LI, Castelhana J, Paiva VH, Rodrigues-Santos P, Alves V, Nunes-Correia I, Nobre RJ, Gomes C, Castelo-Branco M, Pereira de Almeida L (2018) Repeated Mesenchymal Stromal Cell Treatment Sustainably Alleviates Machado-Joseph Disease. *Mol Ther* 26: 2131-2151.
- 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.

- Ostrand-Rosenberg S, Sinha P (2009) Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J Immunol* 182: 4499-4506.
- Ostrand-Rosenberg S, Sinha P, Beury DW, Clements VK (2012) Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells (MDSC), macrophages, and dendritic cells enhances tumor-induced immune suppression. *Semin Cancer Biol* 22: 275-281.
- P**an PY, Ma G, Weber KJ, Ozao-Choy J, Wang G, Yin B, Divino CM, Chen SH (2010) Immune stimulatory receptor CD40 is required for T-cell suppression and T regulatory cell activation mediated by myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Cancer Res* 70: 99-108.
- Park SI, Lim JY, Jeong CH, Kim SM, Jun JA, Jeun SS, Oh WI (2012) Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell therapy promotes functional recovery of contused rat spinal cord through enhancement of endogenous cell proliferation and oligogenesis. *J Biomed Biotechnol* 2012: 362473.
- Pawelec G, Verschoor CP, Ostrand-Rosenberg S (2019) Myeloid-Derived Suppressor Cells: Not Only in Tumor Immunity. *Front Immunol* 10: 1099.
- Phinney DG, Prockop DJ (2007) Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells* 25: 2896-2902.
- Pinching AJ, Powell TP (1971) The neuron types of the glomerular layer of the olfactory bulb. *J Cell Sci* 9: 305-345.
- Pinho S, Frenette PS (2019) Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20: 303-320.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-147.
- Pittenger MF, Discher DE, Peault BM, Phinney DG, Hare JM, Caplan AI (2019) Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *NPJ Regen Med* 4: 22.
- Premer C, Blum A, Bellio MA, Schulman IH, Hurwitz BE, Parker M, Dermarkarian CR, DiFede DL, Balkan W, Khan A, Hare JM (2015) Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Restore Endothelial Function in Heart Failure by Stimulating Endothelial Progenitor Cells. *EBioMedicine* 2: 467-475.
- Price JL, Sprich WW (1975) Observations on the lateral olfactory tract of the rat. *J Comp Neurol* 162: 321-336.
- Prinz M, Erny D, Hagemeyer N (2017) Ontogeny and homeostasis of CNS myeloid cells. *Nat Immunol* 18: 385-392.
- Q**in L, Wu X, Block ML, Liu Y, Breese GR, Hong JS, Knapp DJ, Crews FT (2007) Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia* 55: 453-462.
- R**ansohoff RM, Brown MA (2012) Innate immunity in the central nervous system. *J Clin Invest* 122: 1164-1171.
- Ransohoff RM, Schafer D, Vincent A, Blachère NE, Bar-Or A (2015) Neuroinflammation: Ways in Which the Immune System Affects the Brain. *Neurotherapeutics* 12: 896-909.
- Ravanidis S, Bogie JF, Donders R, Craeye D, Mays RW, Deans R, Gijbels K, Bronckaers A, Stinissen P, Pinxteren J, Hellings N (2015) Neuroinflammatory signals enhance the immunomodulatory and neuroprotective properties of multipotent adult progenitor cells. *Stem Cell Res Ther* 6: 176.
- Ray S, Britschgi M, Herbert C, Takeda-Uchimura Y, Boxer A, Blennow K, Friedman LF, Galasko DR, Jutel M, Karydas A, Kaye JA, Leszek J, Miller BL, Minthon L, Quinn JF, Rabinovici GD, Robinson WH, Sabbagh

- MN, So YT, Sparks DL, Tabaton M, Tinklenberg J, Yesavage JA, Tibshirani R, Wyss-Coray T (2007) Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins. *Nat Med* 13: 1359-1362.
- Reagan MR, Rosen CJ (2016) Navigating the bone marrow niche: translational insights and cancer-driven dysfunction. *Nat Rev Rheumatol* 12: 154-168.
- Recio JS, Weruaga E, Gómez C, Valero J, Briñón JG, Alonso JR (2007) Changes in the connections of the main olfactory bulb after mitral cell selective neurodegeneration. *J Neurosci Res* 85: 2407-2421.
- 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 de la 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* 20: 1179-1192.
- Reeber SL, Otis TS, Sillitoe RV (2013) New roles for the cerebellum in health and disease. *Front Syst Neurosci* 7: 83.
- Rodríguez de la Vega M, Sevilla RG, Hermoso A, Lorenzo J, Tanco S, Díez A, Fricker LD, Bautista JM, Avilés FX (2007) Nna1-like proteins are active metalloproteases of a new and diverse M14 subfamily. *FASEB J* 21: 851-865.
- Roederer M (2011) Interpretation of cellular proliferation data: avoid the panglossian. *Cytom A* 79: 95-101.
- Rogowski K, van Dijk J, Magiera MM, Bosc C, Deloulme JC, Bosson A, Peris L, Gold ND, Lacroix B, Bosch Grau M, Bec N, Larroque C, Desagher S, Holzer M, Andrieux A, Moutin MJ, Janke C (2010) A family of protein-deglutamylation enzymes associated with neurodegeneration. *Cell* 143: 564-578.
- S**aiwai H, Kumamaru H, Ohkawa Y, Kubota K, Kobayakawa K, Yamada H, Yokomizo T, Iwamoto Y, Okada S (2013) Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> Myeloid-derived suppressor cells play a critical role in the resolution of acute inflammation and the subsequent tissue repair process after spinal cord injury. *J Neurochem* 125: 74-88.
- Salvadori M, Cesari N, Murgia A, Puccini P, Riccardi B, Dominici M (2019) Dissecting the Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of MSCs to Overcome Limitations in Their Clinical Translation. *Mol Ther Methods Clin Dev* 14: 1-15.
- Sándor N, Walter FR, Bocsik A, Sántha P, Schilling-Tóth B, Léner V, Varga Z, Kahán Z, Deli MA, Sáfrány G, Hegyesi H (2014) Low dose cranial irradiation-induced cerebrovascular damage is reversible in mice. *PLoS One* 9: e112397.
- Sarkar J, Chaudhary S, Jassim SH, Ozturk O, Chamon W, Ganesh B, Tibrewal S, Gandhi S, Byun YS, Hallak J, Mahmud DL, Mahmud N, Rondelli D, Jain S (2013) CD11b<sup>+</sup>GR1<sup>+</sup> myeloid cells secrete NGF and promote trigeminal ganglion neurite growth: implications for corneal nerve regeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54: 5920-5936.
- Scherzer CR, Eklund AC, Morse LJ, Liao Z, Locascio JJ, Fefer D, Schwarzschild MA, Schlossmacher MG, Hauser MA, Vance JM, Sudarsky LR, Standaert DG, Growdon JH, Jensen RV, Gullans SR (2007) Molecular markers of early Parkinson's disease based on gene expression in blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 955-960.
- Schneider SP, Macrides F (1978) Laminar distributions of interneurons in the main olfactory bulb of the adult hamster. *Brain Res Bull* 3: 73-82.
- Seo JH, Cho SR (2012) Neurorestoration induced by mesenchymal stem cells: potential therapeutic mechanisms for clinical trials. *Yonsei Med J* 53: 1059-1067.

- Shashi V, Magiera MM, Klein D, Zaki M, Schoch K, Rudnik-Schöneborn S, Norman A, Lopes Abath Neto O, Dusl M, Yuan X *et al.* (2018) Loss of tubulin deglutamyase CCP1 causes infantile-onset neurodegeneration. *EMBO J* 37: e100540.
- Sheffer R, Gur M, Brooks R, Salah S, Daana M, Fraenkel N, Eisenstein E, Rabie M, Nevo Y, Jalas C, Elpeleg O, Edvardson S, Harel T (2019) Biallelic variants in AGTPBP1, involved in tubulin deglutamylation, are associated with cerebellar degeneration and motor neuropathy. *Eur J Hum Genet* 27: 1419-1426.
- Shepherd GM (1972) Synaptic organization of the mammalian olfactory bulb. *Physiol Rev* 52: 864-917.
- Shi C (2012) Recent progress toward understanding the physiological function of bone marrow mesenchymal stem cells. *Immunology* 136: 133-138.
- Shimomura O (2005) The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *J Microsc* 217: 1-15.
- Shipley MT, Ennis M, Puche AC (2004) CHAPTER 29 - Olfactory System. En: Paxinos G (Ed.) *The Rat Nervous System (Third Edition)*, 923-964. Academic Press, Burlington.
- 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.
- Sinha P, Clements VK, Bunt SK, Albelda SM, Ostrand-Rosenberg S (2007) Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response. *J Immunol* 179: 977-983.
- Sofroniew MV, Vinters HV (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119: 7-35.
- Solleiro-Villavicencio H, Rivas-Arancibia S (2018) Effect of Chronic Oxidative Stress on Neuroinflammatory Response Mediated by CD4<sup>+</sup> T Cells in Neurodegenerative Diseases. *Front Cell Neurosci* 12: 114.
- Sommer A, Winner B, Prots I (2017) The Trojan horse - neuroinflammatory impact of T cells in neurodegenerative diseases. *Mol Neurodegener* 12: 78.
- Sotelo C (2004) Cellular and genetic regulation of the development of the cerebellar system. *Prog Neurobiol* 72: 295-339.
- Steel CD, Stephens AL, Hahto SM, Singletary SJ, Ciavarrá RP (2008) Comparison of the lateral tail vein and the retro-orbital venous sinus as routes of intravenous drug delivery in a transgenic mouse model. *Lab Anim (NY)* 37: 26-32.
- Stephenson J, Nutma E, van der Valk P, Amor S (2018) Inflammation in CNS neurodegenerative diseases. *Immunology* 154: 204-219.
- Strahlendorf JC, Hubbard GD (1983) Serotonergic interactions with rat cerebellar Purkinje cells. *Brain Res Bull* 11: 265-269.
- Streit WJ (2002) Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* 40: 133-139.
- T**almadge JE, Gabrilovich DI (2013) History of myeloid-derived suppressor cells. *Nat Rev Cancer* 13: 739-752.
- Tanabe S, Yamashita T (2018) The role of immune cells in brain development and neurodevelopmental diseases. *Int Immunol* 30: 437-444.
- Tang Y, Le W (2016) Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol* 53: 1181-1194.
- Tian Z, Xu L, Chen Q, Feng R, Lu H, Tan H, Kang J, Wang Y, Yan H (2019) Treatment of Surgical Brain Injury by Immune Tolerance Induced by Peripheral Intravenous Injection of Biotargeting Nanoparticles Loaded With Brain Antigens. *Front Immunol* 10: 743.

- Tierney WM, Uhlendorf TL, Lemus AJJ, Ortega BA, Magaña J, Ochoa J, van Trigt W, Cruz A, Kopyov A, Kopyov OV, Cohen RW (2020) Transplanted Human Neural Progenitor Cells Attenuate Motor Dysfunction and Lengthen Longevity in a Rat Model of Ataxia. *Cell Transplant* 29: 1-12.
- Tögel F, Westenfelder C (2007) Adult bone marrow-derived stem cells for organ regeneration and repair. *Dev Dyn* 236: 3321-3331.
- Travis ZD, Sherchan P, Hayes WK, Zhang JH (2019) Surgically-induced brain injury: where are we now? *Chin Neurosurg J* 5: 29.
- Trellakis S, Bruderek K, Hutte J, Elian M, Hoffmann TK, Lang S, Brandau S (2013) Granulocytic myeloid-derived suppressor cells are cryosensitive and their frequency does not correlate with serum concentrations of colony-stimulating factors in head and neck cancer. *Innate Immun* 19: 328-336.
- 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, 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 (1998) Rate of neuronal fallout in a transsynaptic cerebellar model. *Brain Res Bull* 47: 219-222.
- U**ccelli A, Moretta L, Pistoia V (2008) Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 8: 726-736.
- Uccelli A, Benvenuto F, Laroni A, Giunti D (2011) Neuroprotective features of mesenchymal stem cells. *Best Pract Res Clin Haematol* 24: 59-64.
- 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, 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 Welie I, Smith IT, Watt AJ (2011) The metamorphosis of the developing cerebellar microcircuit. *Curr Opin Neurobiol* 21: 245-253.
- Varatharaj A, Galea I (2017) The blood-brain barrier in systemic inflammation. *Brain Behav Immun* 60: 1-12.
- Veglia F, Perego M, Gabrilovich D (2018) Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nat Immunol* 19: 108-119.
- Vela JM, Dalmau I, González B, Castellano B (1995) Morphology and distribution of microglial cells in the young and adult mouse cerebellum. *J Comp Neurol* 361: 602-616.
- Villarón EM, Almeida J, López-Holgado N, Alcoceba M, Sánchez-Abarca LI, Sánchez-Guijo FM, Alberca M, Pérez-Simón JA, San Miguel JF, del Cañizo MC (2004) Mesenchymal stem cells are present in peripheral blood and can engraft after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 89: 1421-1427.
- Volkman R, Offen D (2017) Concise Review: Mesenchymal Stem Cells in Neurodegenerative Diseases. *Stem Cells* 35: 1867-1880.
- Voogd J, Glickstein M (1998) The anatomy of the cerebellum. *Trends Cogn Sci* 2: 307-313.
- W**ang JA, Fan YQ, Li CL, He H, Sun Y, Lv BJ (2005) Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells transplanted into damaged rabbit heart to improve heart function. *J Zhejiang Univ Sci B* 6: 242-248.

- 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.
- Wang Y, Sherchan P, Huang L, Akyol O, McBride DW, Zhang JH (2018) Multiple mechanisms underlying neuroprotection by secretory phospholipase A2 preconditioning in a surgically induced brain injury rat model. *Exp Neurol* 300: 30-40.
- 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.
- White JJ, Sillitoe RV (2013) Development of the cerebellum: from gene expression patterns to circuit maps. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2: 149-164.
- Wiersema A, Dijk F, Dontje B, van der Want JJ, de Haan G (2008) Cerebellar heterokaryon formation increases with age and after irradiation. *Stem Cell Res* 1: 150-154.
- Williams GP, Marmion DJ, Schonhoff AM, Jurkuvenaite A, Won WJ, Standaert DG, Kordower JH, Harms AS (2020) T cell infiltration in both human multiple system atrophy and a novel mouse model of the disease. *Acta Neuropathol* 139: 855-874.
- Wolmarans E, Nel S, Durandt C, Mellet J, Pepper MS (2018) Side Population: Its Use in the Study of Cellular Heterogeneity and as a Potential Enrichment Tool for Rare Cell Populations. *Stem Cells Int* 2018: 2472137.
- Wyss-Coray T, Mucke L (2002) Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. *Neuron* 35: 419-432.
- Yang F, Li Y, Wu T, Na N, Zhao Y, Li W, Han C, Zhang L, Lu J (2016) TNF $\alpha$ -induced M-MDSCs promote transplant immune tolerance via nitric oxide. *J Mol Med* 94: 911-920.
- Yardeni T, Eckhaus M, Morris HD, Huizing M, Hoogstraten-Miller S (2011) Retro-orbital injections in mice. *Lab Anim* 40: 155-160.
- Ye B, Li C, Yang Z, Wang Y, Hao J, Wang L, Li Y, Du Y, Hao L, Liu B, Wang S, Xia P, Huang G, Sun L, Tian Y, Fan Z (2014) Cytosolic carboxypeptidase CCP6 is required for megakaryopoiesis by modulating Mad2 polyglutamylation. *J Exp Med* 211: 2439-2454.
- Ye B, Liu B, Hao L, Zhu X, Yang L, Wang S, Xia P, Du Y, Meng S, Huang G, Qin X, Wang Y, Yan X, Li C, Hao J, Zhu P, He L, Tian Y, Fan Z (2018) Klf4 glutamylation is required for cell reprogramming and early embryonic development in mice. *Nat Commun* 9: 1261.
- Yoo SW, Kim SS, Lee SY, Lee HS, Kim HS, Lee YD, Suh-Kim H (2008) Mesenchymal stem cells promote proliferation of endogenous neural stem cells and survival of newborn cells in a rat stroke model. *Exp Mol Med* 40: 387-397.
- Youn JI, Nagaraj S, Collazo M, Gabilovich DI (2008) Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol* 181: 5791-5802.
- Young MR, Newby M, Wepsic HT (1987) Hematopoiesis and suppressor bone marrow cells in mice bearing large metastatic Lewis lung carcinoma tumors. *Cancer Res* 47: 100-105.
- Zeng HY, Zhu XA, Zhang C, Yang LP, Wu LM, Tso MO (2005) Identification of sequential events and factors associated with microglial activation, migration, and cytotoxicity in retinal degeneration in rd mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: 2992-2999.

- Zhang Q, Fujino M, Xu J, Li XK (2015) The Role and Potential Therapeutic Application of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Allo- and Autoimmunity. *Mediators Inflamm* 2015: 421927.
- Zhang W, Ghetti B, Lee W-H (1997) Decreased IGF-I gene expression during the apoptosis of Purkinje cells in pcd mice. *Dev Brain Res* 98: 164-176.
- Zhang W, Li J, Qi G, Tu G, Yang C, Xu M (2018) Myeloid-derived suppressor cells in transplantation: the dawn of cell therapy. *J Transl Med* 16: 19.
- Zhao J, Bi W, Xiao S, Lan X, Cheng X, Zhang J, Lu D, Wei W, Wang Y, Li H, Fu Y, Zhu L (2019) Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice. *Sci Rep* 9: 5790.
- Zheng B, von See MP, Yu E, Gunel B, Lu K, Vazin T, Schaffer DV, Goodwill PW, Conolly SM (2016) Quantitative Magnetic Particle Imaging Monitors the Transplantation, Biodistribution, and Clearance of Stem Cells In Vivo. *Theranostics* 6: 291-301.
- Zhou T, Zhao L, Zhan R, He Q, Tong Y, Tian X, Wang H, Zhang T, Fu Y, Sun Y, Xu F, Guo X, Fan D, Han H, Chui D (2014) Blood-brain barrier dysfunction in mice induced by lipopolysaccharide is attenuated by dapsone. *Biochem Biophys Res Commun* 453: 419-424.
- Zhou Z, French DL, Ma G, Eisenstein S, Chen Y, Divino CM, Keller G, Chen SH, Pan PY (2010) Development and function of myeloid-derived suppressor cells generated from mouse embryonic and hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 28: 620-632.
- Zhu B, Kennedy JK, Wang Y, Sandoval-García C, Cao L, Xiao S, Wu C, Elyaman W, Khoury SJ (2011) Plasticity of Ly-6C(hi) myeloid cells in T cell regulation. *J Immunol* 187: 2418-2432.
- Zlokovic BV (2011) Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat Rev Neurosci* 12: 723-738.
- Zondler L, Müller K, Khalaji S, Bliedehäuser C, Ruf WP, Grozdanov V, Thiemann M, Fundel-Clemes K, Freischmidt A, Holzmann K, Strobel B, Weydt P, Witting A, Thal DR, Hefnerich AM, Hengerer B, Gottschalk KE, Hill O, Kluge M, Ludolph AC, Danzer KM, Weishaupt J (2016) Peripheral monocytes are functionally altered and invade the CNS in ALS patients. *Acta Neuropathol* 132: 391-411.