



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

AGRADECIMIENTOS

Quiero aprovechar estas líneas para agradecer a todas las personas que me han ayudado y me han apoyado a lo largo de estos meses en los que he llevado a cabo la realización de este proyecto.

En este tiempo, ha habido momentos en los que he disfrutado con el trabajo ya sea leyendo artículos que me parecieran interesantes o ya sea en las tareas de laboratorio. Por otro lado, también han estado esos otros de frustración por no comprender conceptos o no confiar en poder llevarlo a cabo a tiempo. Es en éstos últimos, cuando la labor de los que te rodean a veces juega un importante papel.

Primero agradecer a mis tutoras Clementina Rodellar e Inmaculada Martín, especialmente a esta última por guiarme desde el principio del mismo y estar disponible cuando me ha sido necesario.

A David Sanz y a Diego Mediano por estar siempre presentes en el transcurso del trabajo, explicarme los procedimientos que íbamos realizando y corregir mis fallos.

Al equipo de Paco Vázquez por llevar a cabo la obtención de las muestras y a todos aquellos que se han visto involucrados en esta tarea.

El superar esta asignatura supone el obtener un título que después de 5 años de carrera no ha sido fácil lograr. Por ello, quiero dar las gracias a quienes han confiado en mí cuando ni yo misma era capaz de hacerlo, Sergio y mis siete rosas.

ÍNDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	4
1. CÉLULAS MADRE	4
2. TERAPIA CELULAR y MODELOS ANIMALES.....	6
3. APLICACIONES DE LA TERAPIA CELULAR EN VETERINARIA	13
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	14
METODOLOGÍA.....	16
1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS	16
2. AISLAMIENTO DE LAS MSC.....	16
3. EXPANSIÓN DE MSC	17
4. CARACTERIZACIÓN DE MSC.....	17
5. DIFERENCIACIÓN NEUROGÉNICA.....	18
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
1. AISLAMIENTO, CULTIVO Y CAPACIDAD PROLIFERATIVA DE LAS MSC.....	20
2. CARACTERIZACIÓN DE MSC.....	20
3. DIFERENCIACIÓN NEUROGÉNICA.....	22
CONCLUSIONES	23
CONCLUSIONS	24
VALORACIÓN PERSONAL.....	25
BIBLIOGRAFÍA	26
ANEXO I	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO II	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO III	¡Error! Marcador no definido.

RESUMEN

Título: “Células mesenquimales ovinas para su uso como modelo de regeneración neuronal”.

Las células madre mesenquimales (MSC) son un tipo de células madre adultas con morfología fibroblastoide que derivan del mesodermo y que tienen las capacidades de autorrenovación y diferenciación. Éstas deben cumplir unas características para ser consideradas como tal (expresión de ciertos marcadores de superficie y diferenciación a linajes mesodérmicos). Se pueden obtener de una multitud de fuentes aunque las más comunes sean tejido adiposo y médula ósea. Por sus propiedades, las MSC se están proponiendo en terapia celular tanto en medicina humana como en modelos animales y clínica veterinaria. En este trabajo se muestra una revisión bibliográfica al respecto. Se ha estudiado su aplicación en varias enfermedades humanas (musculoesqueléticas, coronarias, hematológicas, inmunomediadas, etc.) así como en veterinaria, especialmente en el caso de las lesiones musculoesqueléticas en équidos. Además, en los últimos años se ha observado que éstas pueden diferenciarse a células de otras capas embrionarias como a neuronas, por lo que se plantea su uso en enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis múltiple, la esclerosis lateral amiotrófica, Pákinson, enfermedades priónicas así como lesiones de médula o nervios periféricos. El modelo ovino que se ha empleado en este trabajo es de utilidad por ser sensible al scrapie.

En este trabajo se han extraído muestras de dos fuentes; médula ósea (BM) y sangre periférica (PB), tanto de ovejas sanas como con síntomas de scrapie. A partir de éstas hemos conseguido aislar MSC que hemos caracterizado posteriormente mediante citometría para determinar marcadores de superficie y llevando a cabo las diferenciaciones a linajes mesodérmicos (adipogénico, osteogénico y condrogénico). Además, hemos realizado la diferenciación de estos cultivos a neurona. Las 4 diferenciaciones fueron posteriormente observadas al microscopio. Finalmente, en el caso de la diferenciación neurogénica se estudiaron marcadores de expresión neuronales.

Tras el proceso desarrollado, se obtuvo con éxito MSC de ambas fuentes, sin embargo no se aislaron en todas las muestras de PB. Además, se detectó con éxito la expresión del marcador de superficie *CD29* (integrina-I). En cuanto a la diferenciación mesodérmica, la adipogénica se ha obtenido con éxito no así en el caso de las otras dos, en las que posiblemente haya que adaptar nuevos protocolos. Por otro lado, la diferenciación a células neuronales de ambos orígenes se ha logrado a nivel morfológico. Finalmente, la enfermedad de scrapie no parece afectar a las características de las MSC de ninguna de las fuentes.

ABSTRACT

Title: "Ovine mesenchymal stem cells for their use as a neuronal regeneration model". Mesenchymal stem cells (MSC) are a kind of adult stem cells fibroblast-like from the mesodermal layer and with the capacity of self-renewal and differentiation. These cells have to display a number of features in order to be considered as such (expression of certain surface markers and differentiation into mesodermal lineages). They can be obtained from a variety of sources but the most common are fatty tissue and bone marrow. Because of their properties, the MSC have been proposed in cell therapy in both human medicine and animal models and in veterinary practice. In this work we submit a bibliographic review about this topic. Their applications have been studied in several human diseases (musculoskeletal, heart, blood, immune mediated, etc.) as well as in veterinary medicine, especially in the case of musculoskeletal horse injuries. Furthermore, during the last few years it has been reported that they can differentiate into cells of other embryonic germ layers as neurons, so they have been proposed like a therapy in neurodegenerative diseases such as multiple sclerosis, amyotrophic lateral sclerosis, Parkinson, prion diseases and spinal cord or peripheral nerves lesions. The animal model that we have used in this work is useful because sheep can suffer from scrapie, a neurodegenerative disease.

In this work we have collected samples from two sources, bone marrow (BM) and peripheral blood (PB), from healthy sheep and sheep with scrapie symptoms. From these sources, we isolated MSC and characterized them using flow cytometry to determine surface markers and performing mesodermal lineages differentiation (adipogenic, osteogenic and chondrogenic). In addition, we have differentiated these cultures to neuron-like cells. Then, we observed the four differentiations with the microscope. Finally, in the case of neurogenic differentiation we studied the expression of neuronal markers.

We successfully obtained MSC from both sources, however we did not isolate them from all PB samples. In addition, it was detected the expression of *CD29* surface marker successfully. Within the mesodermal differentiation, *in vitro* adipogenesis has been successfully obtained, but not osteogenesis and chondrogenesis, it might be necessary to adapt new protocols for ovine MSC differentiation. Furthermore, the differentiation into neuron-like cells has been achieved morphologically in both origins. Finally, scrapie disease does not seem to affect the characteristics of the MSC in any of the sources.

INTRODUCCIÓN

1. CÉLULAS MADRE

Definimos célula madre o troncal como aquella que es capaz de dividirse indefinidamente y diferenciarse a distintos tipos de células especializadas, tanto morfológicamente como de forma funcional. Las células madre se pueden dividir en función de su capacidad de diferenciarse a distintos tipos de tejidos (según su potencialidad) y según su origen [1].

En cuanto a su capacidad de diferenciación se clasifican en:

- Totipotenciales: corresponden con las células embrionarias que forman el blastómero hasta fase de mórula (8-16 células). Pueden generar cualquier tipo de célula y nuevos organismos, son capaces de producir tanto tejido embrionario (un embrión completo) como extraembrionario (placenta y anejos).
- Pluripotenciales: son las células que se encuentran en la masa interna del blastocisto (60-100 células) hasta el día 14 tras la fecundación. También son pluripotenciales las llamadas células madre embrionarias germinales, que se obtienen de las crestas germinales de fetos. En esta fase pueden generar cualquier tipo de célula.
- Multipotenciales: son células madre del organismo adulto, que en ciertas condiciones pueden generar algunos tipos celulares.
- Oligopotenciales: células del organismo adulto derivadas de las multipotenciales, conocidas como precursoras adultas, y que son capaces de producir, en ciertas circunstancias, un único tipo celular [2] [3].

Respecto a su origen se pueden dividir en:

- Células madre embrionarias: se han obtenido bien a partir de la masa celular interna del blastocisto en el estadio de embrión preimplantatorio o bien de la cresta gonadal. Son células pluripotenciales.
- Células madre adultas: éstas se pueden obtener bien de las reservas que el organismo adulto mantiene con el fin de reparar los daños que se producen en los tejidos o bien del cordón umbilical. Éstas son consideradas multipotentes [4]. Dentro de este grupo de células, además de las células madre mesenquimales, de las que se basa este trabajo, encontraríamos las iPS (células pluripotentes inducidas). Éstas han sido estudiadas en los últimos años. Se trata de células adultas que vuelven a su estado de pluripotencialidad mediante mecanismos de ingeniería genética [5] [6].

1.1 CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES (MSC)

Las MSC son una clase de células madre adultas con morfología fibroblastoide que derivan del mesodermo y que tienen las capacidades de autorrenovación y diferenciación.

Este tipo celular es capaz de diferenciarse a células de tejidos derivados de esta capa embrionaria como adipocitos, mioblastos, condrocitos o tenocitos. No obstante, ha sido estudiada su diferenciación a otros tejidos como lo es el tejido neuronal (ectodermo), células hepáticas o células pancreáticas (endodermo) [5].

En el año 2006, la ISCT (Internacional Society Cellular Therapy) propuso tres criterios para definir las células madre mesenquimales [7]:

- Deben ser adherentes en cultivo.
- Tienen que expresar los antígenos *CD73*, *CD90* y *CD105* en ausencia de antígenos hematopoyéticos como *CD34*, *CD45*, marcadores de monocitos, macrófagos y linfocitos B.
- Multipotencialidad de diferenciación a osteoblastos, adipocitos y condrocitos bajo condiciones estándar de cultivo.

La médula ósea es la principal fuente de aislamiento de MSC, aunque se han aislado de tejido adiposo, páncreas, hígado, músculo esquelético, dermis, membrana sinovial, hueso trabecular, tejidos fetales, tejido pulmonar, pulpa dental, ligamento periodontal, sangre de cordón umbilical y sangre periférica entre otros [8] [9].

1.1.1 MSC de médula ósea (BM-MSC)

Se han descrito diferentes tipos de células madre en la médula ósea: hematopoyéticas (HSC), mesenquimales (MSC), las células de la población lateral (*side population cells*, SP) y las células progenitoras adultas multipotenciales (MAPCs) [8].

Las MSC fueron aisladas por primera vez de la médula ósea por Friedenstein y colaboradores [10] y han sido consideradas la principal fuente de MSC durante mucho tiempo. En humanos el lugar habitual de extracción es la cresta ilíaca. Sin embargo, pese a que su obtención es un procedimiento un poco invasivo, a veces resulta en un bajo rendimiento en cuanto a MSC ya que la proporción de estas células en la médula ósea es baja respecto al total de las células nucleadas (representan en torno al 0.001–0.01% del total de éstas). Además, su habilidad de proliferación y diferenciación disminuye después de varios pases y con la edad. Estas desventajas han hecho que se busquen otras fuentes de MSC como el tejido adiposo [11] [12].

1.1.2 MSC de tejido adiposo (AT-MSC)

El tejido adiposo está constituido por adipocitos, preadipocitos, fibroblastos, células endoteliales, mesenquimales, inmunes y eritrocitos que las rodean y abastecen. Las AT-MSC fueron aisladas por primera vez en tejido adiposo humano en 1976 pero no fueron identificadas y caracterizadas hasta el 2001 [11].

Los estudios realizados por Zuk y colaboradores [13] mostraron que un gramo de tejido adiposo contiene 500 veces más MSC que en médula ósea. Además, se pueden obtener por métodos menos invasivos como son la liposucción o aspirando fragmentos de tejido adiposo subcutáneo. Debido a esto, se pueden obtener mayores cantidades de partida. Otras ventajas que presentan son la facilidad de expansión *in vitro* y para ser aisladas en el laboratorio mediante sedimentación, así como su elevada capacidad de autorrenovación. Éstas también son capaces de diferenciarse a tejidos tanto de origen mesodérmico como no mesodérmico [11] [14].

1.1.3 MSC derivadas de otros tejidos

Con anterioridad, se han descrito las fuentes más comunes de MSC, sin embargo, son múltiples las fuentes de las cuales se ha conseguido aislarlas en los últimos años. Una de estas, que puede significar un importante avance debido a que se trata de una técnica poco invasiva es a partir de sangre periférica (PB-MSC). El aislamiento de MSC de este origen ha sido descrito en una variedad de mamíferos como cobayas, conejos, perros, ratones, ratas, caballos y humanos[9].

Las células fibroblastoides derivadas de PB tienen la capacidad de autorrenovarse y originar células especializadas, características típicas de las células madre. El término *fibroblast-like* engloba a las unidades formadoras de colonias fibroblásticas (CFU-F), los fibrocitos y las células mesenquimales (MSC), aunque no están bien definidas las diferencias entre estas células [15].

2. TERAPIA CELULAR y MODELOS ANIMALES

La terapia celular se define como el trasplante de células vivas a un organismo con el propósito de reparar tejido y funciones perdidas [16]. Por su plasticidad, las MSC se consideran el tipo celular más importante en medicina regenerativa y son las más estudiadas. Sus ventajas incluyen su fácil aislamiento y alto rendimiento, plasticidad y habilidad de mediar en la inflamación, el promover el crecimiento y diferenciación celular y la reparación tisular mediante inmunomodulación e inmunosupresión. Además, a diferencia de algunas fuentes de origen embrionario, están exentas de implicaciones éticas y no forman teratomas garantizando la seguridad del hospedador [5].

Las MSC presentan la propiedad de pasar desapercibidas para el sistema inmunológico, ya que el huésped no genera ninguna respuesta frente a ellas, lo cual permite el trasplante de estas células de forma tanto autóloga como alogénica (entre pacientes entre especies diferentes) [17].

A continuación se presenta una revisión del uso de las MSC en terapia celular en distintas patologías (hasta ahora las mayores aplicaciones con MSC radican en tejidos musculoesqueléticos) dedicando un apartado especial a las enfermedades neurodegenerativas [18].

2.1 TERAPIA EN LESIONES MUSCULOESQUELÉTICAS

2.1.1 Lesiones óseas

Una de las principales aplicaciones clínicas de las MSC es la reparación de hueso, demostrado *in vivo* en ratones y perros con defectos cráneo-faciales y de huesos largos. Estudios sugieren que para garantizar la formación de hueso es necesario el uso de materiales naturales o sintéticos (transportadores de MSC) [8].

La forma en que actúan las MSC a nivel lesional no está del todo clara, parece ser que las moléculas quimiotácticas liberadas a nivel de la lesión desempeñan un papel esencial en la atracción de MSC, que se ha sabido que expresan hasta 19 receptores de estas moléculas [19].

Una aplicación importante en este campo ha sido como terapia para la osteogénesis imperfecta (OI). Se trata de una enfermedad congénita caracterizada por la malformación de los huesos, osteopenia, frecuentes fracturas y una corta estatura. Los primeros ensayos clínicos fueron realizados por Horwitz y colaboradores [20], que demostraron la factibilidad de combinar médula ósea alogénica y trasplante de MSC en niños con OI severa. [19] [21].

A este nivel, también se están estudiando en el caso de la periodontitis agresiva (PA) proceso caracterizado por su manifestación a temprana edad y por afectar severamente a uno o más dientes [22].

2.1.2 Lesiones cartilaginosas

El cartílago tiene una capacidad limitada de reparación intrínseca, defectos grandes se reparan por medio de la formación de tejido fibroso cuyas propiedades bioquímicas y biomecánicas son diferentes a las del cartílago hialino inicial. Como consecuencia de esta sustitución de tejido, el cartílago presenta una degeneración que puede derivar en osteoartritis [23].

Hasta la fecha, los tratamientos para lesiones del cartílago, han sido métodos invasivos como cirugía, autotrasplantes, injertos del paciente o implantación de condrocitos autólogos [23] [24].

La osteoartritis (OA) es una forma de artritis caracterizada por degeneración del cartílago articular, esclerosis subcondral e inflamación sinovial. Pese a su prevalencia, no hay tratamiento para revertir el proceso. Las MSC demuestran perspectivas prometedoras en su aplicación clínica en pacientes con artrosis. Estudios preclínicos han demostrado el potencial de BM-MSC para estimular la regeneración de cartílago y detener la destrucción progresiva de articulaciones. En estudios piloto como el llevado a cabo por Orozco y colaboradores [25] se trataron pacientes con BM-MSC autólogas inyectadas de forma intraarticular, observando una disminución de la zona pobre en cartílago y una mejora en la calidad del mismo [21].

Empleando el modelo caprino para osteoartritis, Murphy y colaboradores [26], lograron la recuperación del cartílago articular con formación de nuevo tejido [27].

Aunque son resultados alentadores, la aplicación clínica de MSC en la OA y OI está aún inmadura y sus efectos deben investigarse más a fondo antes de pasar al tratamiento en humanos [21].

2.1.3 Lesiones tendinosas

Los tendones están formados principalmente por fibras de colágeno alineadas y presentan una limitada capacidad de regeneración propia, debido a la insuficiente irrigación. Tras una lesión, las propiedades biomecánicas quedan disminuidas. Los tratamientos que se han llevado a cabo hasta ahora no son capaces de devolver las propiedades mecánicas del tendón original.

Algunas terapias que están dando resultados positivos emplean factores de crecimiento como IGF (Insuline Growth Factor) así como el plasma rico en plaquetas (PRP). Experimentalmente las MSC están dando buenos resultados en conejos [28].

Este tipo de terapia se ha aplicado con éxito en la clínica equina para la recuperación de lesiones de tendones y ligamentos, aplicando tanto MSC de médula ósea como de tejido adiposo [27]. Además de ser un modelo para humana, esto supone un gran avance en el caso de la clínica de caballos dedicados al deporte, actividad de gran importancia económica.

2.2 TRATAMIENTO DE LESIONES CARDÍACAS

Pese a los avances en las opciones de tratamiento, la cardiopatía isquémica es una importante causa de mortalidad en el mundo occidental. Dentro de esta, el infarto de miocardio tiene especial trascendencia ya que el músculo cardíaco posee limitada capacidad de regeneración, por lo que la necrosis de una región lleva a la formación de una cicatriz fibrosa. [1] [29].

Algunos tratamientos para la fase aguda del infarto son fibrinólisis y angioplastia primaria que han tenido un gran impacto en el pronóstico de estos pacientes pero, desgraciadamente, no han conseguido detener la evolución de la enfermedad que prosigue hasta el desarrollo de la IC

(insuficiencia cardíaca) terminal. Para su tratamiento, el único recurso del que se dispone en la práctica clínica es el trasplante cardíaco, con limitaciones como la falta de donantes y la necesidad de tratamiento inmunosupresor de por vida [1]. El trasplante de cardiomiocitos fetales o mioblastos esqueléticos se ha propuesto como un método alternativo para el tratamiento de ataques de corazón [30]. Sin embargo, este proceso sigue siendo inviable dada la dificultad de obtención de células del donante y el porcentaje de fracasos asociados con la insuficiente función fisiológica.

La terapia basada en células madre destinada a la regeneración de miocardio dañado es una modalidad de tratamiento emergente [21]. Diversos estudios clínicos han mostrado que la inyección intracoronaria de BM-MSK podría representar un enfoque eficaz en el tratamiento de enfermedades del corazón [31].

Además de modelos animales murinos, han sido de gran utilidad en el estudio de este campo el cerdo en el caso de necrosis cardíaca y el perro con isquemia crónica [27].

2.3 TERAPIA HEMATOLÓGICA E INMUNOMODULADORA

Aunque el trasplante alogénico de HSC (células madre hematopoyéticas) es una terapia eficaz para varias patologías hematológicas (linfoma, mieloma y leucemia), el principal problema para su eficacia es la GVHD (enfermedad de injerto contra el huésped). La GVHD es una forma de rechazo caracterizado por el ataque de las células trasplantadas a las del huésped. Actualmente, se emplean los corticosteroides para el tratamiento inicial de GVHD. Sin embargo, los pacientes cuyo tratamiento inicial falla, muestran solo entre un 10-30 % de supervivencia a largo plazo.

Está documentado que las MSC poseen capacidades inmunosupresoras y producen citoquinas que pueden favorecer la hematopoyesis. Por estas razones, varios investigadores han tratado de utilizar MSC con el fin de facilitar el injerto de las HSC y disminuir la GVHD [32], así ha sido en el caso de la neoplasia maligna como lo es la leucemia mielógena [33].

Un estudio realizado por Xiao y colaboradores ha sugerido también el tratamiento con MSC de un donante relacionado en pacientes con anemia aplásica [34]. Otros ejemplos de enfermedades relacionadas con el sistema inmune en el que se están aplicando terapias basadas en MSC son la enfermedad de Crohn y el lupus eritematoso sistémico, en el que se han empleado ratones como modelo [21] [35].

2.4 TERAPIAS EN OTROS ÓRGANOS

Diversas observaciones clínicas han demostrado la eficacia de estas células en la mejora de daño tisular o la función después de lesión pulmonar, renal, hepática y oftalmológica.

A nivel endocrino, se pretende conseguir un tratamiento para la diabetes mellitus a partir de MSC con capacidad de diferenciarse en células productoras de insulina [1] [21].

Además de lo anterior, un campo en el que las MSC están siendo gran motivo de investigación tras descubrirse hace unos años su capacidad para diferenciarse también a tejido neurogénico, es en la terapia de enfermedades neurodegenerativas, aspecto en el que nos centraremos más.

2.5 ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

Las terapias celulares representan una nueva frontera en el tratamiento de enfermedades neurológicas. Las MSC presentan enfoques esperanzadores en el trabajo clínico neurológico debido a que además de las propiedades ya mencionadas, se ha comprobado su capacidad para liberar factores neuroprotectores. Los datos preclínicos muestran que las propiedades tróficas de las MSC y las sustancias bioactivas parecen suprimir efectivamente la neuroinflamación, disminuir lesiones locales, y reducir los síntomas de déficits neurológicos funcionales [21].

La mayoría de los ensayos en este ámbito están dirigidos al tratamiento de la esclerosis múltiple (EM), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), y lesión de la médula espinal (SCI). La EM es una enfermedad desmielinizante inflamatoria crónica del sistema nervioso central (SNC) que conduce a la lesión del SNC irreversible. Los enfoques terapéuticos hasta ahora para la EM han tratado de suprimir el control del sistema inmune del proceso inflamatorio que causa la desmielinización y el daño axonal. Sin embargo, los tratamientos actualmente disponibles para la EM son sólo parcialmente eficaces, especialmente en las fases progresivas de la enfermedad.

Connick y colaboradores [36] llevaron a cabo un estudio de fase IIA con MSC autólogas en EM secundaria progresiva. Se evaluó la seguridad y eficacia del tratamiento con estas células. Se infundieron diez pacientes con MSC autólogas administradas por vía intravenosa, tras lo cual fueron controlados clínicamente para evidenciar reacciones adversas. Se registraron eventos adversos inmediatos leves como prurito o fiebre en el 10 % tras la administración. Pese a los resultados preliminares prometedores en la determinación de la seguridad y la viabilidad de la intervención, se concluyó que podría ser necesario un período de seguimiento más largo.

La ELA es una enfermedad neurodegenerativa que afecta selectivamente a las neuronas motoras en el cerebro y la médula espinal, lo que conduce a una debilidad bulbar, respiratoria y de las extremidades. Los esfuerzos previos utilizando diversos agentes neuroprotectores tanto en EM progresiva como en ELA no mostraron resultados exitosos. Sobre la base de la experiencia preclínica y datos de los estudios clínicos, Karussis y colaboradores [37] iniciaron un ensayo exploratorio con BM-MSC autólogas en 34 pacientes con EM y ELA intratables. Después del cultivo, se les inyectó las MSC por vía intratecal o por vía intravenosa. Los 6-25 meses de

seguimiento no revelaron efectos adversos inmediatos o tardíos significativos, por el contrario, se observó estabilización clínica e incluso mejoría en algunos pacientes.

En general, estos datos ilustran claramente la viabilidad y la aceptable seguridad del trasplante autólogo de BM-MSc en pacientes con EM y ELA. Los datos obtenidos también demostraron por primera vez en enfermedades neurológicas humanas los efectos inmunomoduladores sistémicos de las MSC *in vivo*, descritos anteriormente en los estudios en animales. La posibilidad de neuroprotección y neuroregeneración en células de linaje neuronal o glial, aunque teóricamente viable, aún no se ha demostrado por estudios de neuroimagen. Se necesitan más ensayos controlados para evaluar la seguridad a largo plazo y la eficacia del trasplante de MSC.

En conjunto, estos estudios han mostrado que las MSC autólogas son seguras y viables en tratamientos para la esclerosis múltiple y ELA así como que pueden promover mejoras neurológicas, aunque son necesarios un mayor número de ensayos e investigaciones [21].

La lesión de la médula espinal (SCI) puede causar un devastador deterioro funcional y sensorial, déficit neurológico y parálisis permanente. Pese a los métodos disponibles para el tratamiento de SCI, el pronóstico sigue siendo a menudo pobre y el proceso de recuperación es lento e ineficiente. Numerosos estudios preclínicos han demostrado que las MSC pueden mejorar la recuperación anatómica y funcional en modelos animales con SCI. En un ensayo clínico fase I, Ra y colaboradores [38] infundieron por vía intravenosa a 8 pacientes varones que habían sufrido SCI con AT-MSc autólogas. Tras 3 meses de seguimiento, la seguridad de las MSC se demostró al no detectarse efectos adversos graves. Años más tarde, Mendonça y colaboradores [39] llevaron a cabo un ensayo de fase I en el que participaron 14 pacientes con lesión medular traumática crónica a los que se les inyectó un número fijo de células en la lesión. Los pacientes mostraron diversas mejoras en la sensibilidad táctil, y 8 pacientes, en particular, mostraron aumento en la función motora del miembro inferior. Se apreciaron correlaciones estadísticas significativas entre las mejoras en la función neuronal y el tamaño y nivel de la lesión.

El Párkinson es otra enfermedad degenerativa de elevada prevalencia que afecta al sistema nervioso en el área encargada de coordinar la actividad, el tono muscular y los movimientos.

Se trata de un proceso crónico que pertenece a un grupo de trastornos que tienen su origen en la degeneración y muerte progresiva de unas neuronas, las dopaminérgicas, cuyo neurotransmisor primario es la dopamina y que cumplen funciones en el sistema nervioso central. Hasta la fecha, la opción terapéutica ha sido la administración de levodopa, precursor de la dopamina, con graves efectos secundarios a largo plazo. También se ha propuesto la estimulación quirúrgica cerebral profunda así como el trasplante de tejido fetal, no exento de

controversia. Por ello, se pretende utilizar neuronas con el fenotipo dopaminérgico formadas a partir de ESC, MSC, iPS o NSC (células madre neuronales) como alternativa terapéutica. Como modelos de humana además del murino ha sido de utilidad el mono [40].

La enfermedad de Huntington es una rara enfermedad también neurodegenerativa de origen hereditario. Se caracteriza por una degeneración de las neuronas que causa movimientos incontrolados, pérdida de facultades intelectuales y alteraciones emocionales. Su patogénesis no está del todo clara, lo que dificulta las intervenciones terapéuticas. Con el trasplante de tejido fetal en las regiones afectas parecía haber mejoría, pero no está exento de riesgos como el sobrecrecimiento neuronal tras el trasplante. También se han realizado experimentos en ratón y primates con NSC. Así mismo, se han empleado en ratones transgénicos BM-MSC genéticamente modificadas para expresar el factor neurotrófico derivado del cerebro (FNDG), observándose mejoría en el comportamiento de los animales. También se han reportado estudios con AT-MSC mejorando la función motora en los ratones transgénicos [40].

En el campo de las lesiones de nervios periféricos también se abre un abanico de ensayos clínicos. El tratamiento estándar son los injertos autólogos pero las fuentes son limitadas, y es inviable para tratar lesiones extensas o múltiples. Se han descrito diferentes técnicas para complementar esta terapia, como por ejemplo el uso de biocámaras o plasma rico en plaquetas. Sin embargo, este procedimiento no tiene ningún efecto directo sobre la neuroregeneración ni en la resolución de lesiones graves. Las MSC pueden derivar *in vitro* hacia diferentes linajes, incluyendo células de Schwann. Diversos trabajos han demostrado que las MSC puede promover la regeneración nerviosa en roedores, perros y primates. Para su aplicación clínica humana se requiere la estandarización del procedimiento, incluyendo la dosis óptima a utilizar. En un modelo ovino se realizó un estudio seccionando 1cm de nervio y posterior reparación con una biocámara Neurolac™, en cuyo hueco se aplicó entre $30\text{-}50 \times 10^6$ MSC de hueso esponjoso cultivadas. Los resultados se compararon con controles. Se utilizó el nervio radial (sensible) y el tibial (motor) de 7 ovejas. A los 6 meses se observó una significativa mielinización de fibras nerviosas y conducción creciente, frente a los controles. Estos resultados sugieren que la aplicación de MSC en un andamio biodegradable en lesiones nerviosas promueve buenos resultados en términos de regeneración y recuperación funcional [41].

El scrapie y la encefalopatía espongiforme bovina son enfermedades neurodegenerativas fatales causadas por la acumulación de una proteína plegada de forma anómala (PrP^{res}), la forma patológica de la proteína priónica celular (PrP^{c}). En humanos, un ejemplo de encefalopatía espongiforme transmisible (TSE) es la enfermedad de Creutzfeld-Jakob (CJD). Un par de estudios han demostrado la prolongación de la supervivencia de ratones infectados con priones tras el

tratamiento con MSC y han identificado las sustancias quimiotácticas que favorecen la llegada de las MSC al SNC tras la inyección de las mismas por vía intravenosa [42].

Desde hace décadas, la investigación de priones ha progresado mucho, pero aún hay que profundizar en los mecanismos de replicación de los priones, toxicidad celular, las diferencias en la susceptibilidad genética, barrera de las especies o la naturaleza de las cepas de priones. Estos estudios pueden ser desarrollados en modelos murinos, aunque el desarrollo de modelos celulares para la replicación priónica podría reducir los costes económicos así como el tiempo y también sirven para la investigación básica y las pruebas de posibles tratamientos. Las MSC se pueden diferenciar a células neuronales, expresar PrP^c y ser infectadas por priones *in vitro*. Por tanto, las MSC además de ser empleadas en terapia, se proponen como modelo celular para la investigación de este tipo de procesos. Así mismo, se ha observado la presencia de la proteína mal plegada en MSC de médula ósea de pacientes con CJD, por lo que también se han propuesto como método de diagnóstico [42].

En este proyecto el modelo animal ha sido el ovino. Además de para el estudio de las enfermedades priónicas, ha sido propuesto como modelo en un amplio rango de investigaciones biomédicas, como enfermedades respiratorias, cardiomiopatías y desórdenes neuronales [9].

3. APLICACIONES DE LA TERAPIA CELULAR EN VETERINARIA

En el campo de la veterinaria, dado que las MSC tienen el potencial para diferenciarse a células del tejido musculoesquelético, son candidatas para la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa en el paciente equino. Lesiones del cartílago, fracturas óseas y lesiones tendinosas son muy comunes en los atletas equinos. Estas lesiones son conocidas por sus largos tiempos de recuperación. Con la aplicación de las MSC en ingeniería de tejidos se espera una curación más rápida y, además, una regeneración completa después de lesiones musculoesqueléticas, aunque se necesita investigación adicional para identificar los métodos óptimos [43] [27].

Por otro lado, el modelo canino para medicina humana, en estudios de procesos regenerativos, puede tener, además, un impacto significativo también para la clínica veterinaria. La mayoría de éstos se relacionan con problemas ortopédicos como artrosis crónica, que deriva en cojeras o problemas óseos. De este modo, se ha mostrado como una importante alternativa terapéutica para el tratamiento de la displasia de cadera, afección común en canes [27].

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Las células madre mesenquimales (MSC) son células madre multipotentes con capacidad de diferenciarse hacia varios linajes mesenquimales. Esta cualidad las hace buenas candidatas para su uso en terapia celular. Se pueden aislar de una gran variedad de tejidos, incluyendo la médula ósea y el tejido adiposo (fuentes más comunes) [9]. Sin embargo, las MSC también se pueden aislar a partir de sangre periférica y otras muchas fuentes (páncreas, hígado, membrana sinovial, hueso trabecular...) [8] .

Por su capacidad de diferenciación a tejidos mesodérmicos se han empleado ampliamente como tratamiento de lesiones musculoesqueléticas. Debido a sus propiedades inmunomoduladoras también se han propuesto como terapia en enfermedades inmunomediadas. Además, estudios recientes han evidenciado la capacidad de estas células para diferenciarse a otro tipo de linajes como lo son los cardiomiocitos (lo que ha dado lugar a avances prometedores en el campo de las enfermedades cardiovasculares) o a otro tipo de células como lo son los astrocitos o las neuronas [21] [9]. Debido a esto, se han presentado las MSC como candidatas para ser empleadas en terapia celular en enfermedades degenerativas, hasta ahora con pocas posibilidades terapéuticas como lo son el Parkinson, las encefalopatías espongiformes, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Huntington, lesiones de médula espinal y nervios periféricos...[etc](#) [41] [21].

Cabe destacar el importante papel que juegan los animales como modelo para las investigaciones para humana. El más extendido es el murino, sin embargo, como modelos animales más grandes, el cerdo se ha empleado en lesiones cardíacas, y el équido y el canino han sido útiles en lesiones musculoesqueléticas. En cuanto a las enfermedades neurodegenerativas, el modelo utilizado en este trabajo, el ovino, ha sido muy empleado debido a ser una especie sensible a scrapie, prototipo de enfermedad priónica. Estos animales están siendo utilizados tanto para la investigación como modelo, como para el uso de estas terapias por su interés en la clínica veterinaria.

En este trabajo se ha planteado [analizar la bibliografía sobre el uso de MSC en terapia celular e investigar el potencial neurogénico de MSC ovinas obtenidas de animales sanos y enfermos de scrapie con el fin de analizar el efecto de la enfermedad en las mismas.](#)

Debido al volumen de tiempo y dedicación que supone el trabajo con cultivos celulares de MSC en relación a los créditos del proyecto de fin de grado, me incorporé en el estudio que comenzaba el grupo de investigación participando en los momentos clave del proceso, como lo son la extracción de muestras, cultivo, realización de pases, diferenciación, preparación de

tinciones, observación de diferenciaciones al microscopio y discusión de resultados que se describen a lo largo del documento.

Los objetivos principales de este trabajo de fin de grado son:

1-Realizar una revisión bibliográfica de las investigaciones realizadas con MSC con fines terapéuticos.

2-~~Revisión-Revisar~~ el papel experimental de los animales como modelos para tratamiento en humana.

3-Cultivar MSC de distintas fuentes (sangre periférica y médula ósea de ovino), tanto de animales control como de infectados de enfermedad neurodegenerativa (scrapie).

4- Caracterizar las células obtenidas mediante el análisis de marcadores de superficie y su potencial de diferenciación.

5- Analizar su potencial neurogénico mediante diferenciación en medio de cultivo y posterior análisis morfológico y de expresión de marcadores.

METODOLOGÍA

1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Las muestras utilizadas para este trabajo se obtuvieron de 4 ovejas rasa aragonesa, de entre 2 y 5 años. 2 procedían de rebaños de la región que habían sido llevadas al Centro de Investigación en Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes (CIEETE) con sintomatología compatible con scrapie (diagnóstico confirmado a posteriori). Las otras 2 procedían del rebaño experimental del CIEETE. Los procedimientos seguidos para la toma de muestras fueron aprobados por el Comité de Ética para la Experimentación animal de la Universidad de Zaragoza (proyecto PI06/12). Las muestras se obtuvieron de 2 fuentes distintas en cada oveja:

-Médula ósea: los veterinarios del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Zaragoza encargados de la extracción la realizaron con agujas Jameshdi 13G en la cabeza humeral previa sedación y anestesia con Rompun y Xilazina. Las muestras fueron recogidas en jeringuillas estériles con heparina y traspasadas a tubos *Falcon* con PBS (tampón fosfato salino).

-Sangre periférica: Se obtuvieron aproximadamente 20ml de la vena yugular, lugar de rutina para la extracción de sangre en esta especie. La muestra fue recogida en tubos heparinizados.

2. AISLAMIENTO DE LAS MSC

Las muestras de BM en PBS se depositaron sobre el doble de volumen de *Lymphoprep*TM (Sigma). Se centrifugó durante 20 minutos a 1750 r.p.m sin aceleración ni deceleración. La interfase de células nucleadas (con aspecto nublado) fue recogida. Posteriormente fueron lavadas 3 veces con PBS. Se centrifugaron y el pellet obtenido fue resuspendido en medio de crecimiento. Tras estos pasos, las células se sembraron a una densidad de 2.000.000 células/cm² (céls/cm²).

Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 1500g durante 15 minutos sin aceleración ni deceleración y se recogieron las células mononucleadas. Éstas se precipitaron por centrifugación durante 20 minutos a 1700 r.p.m con aceleración y deceleración mínimas. Las células se lavaron dos veces con PBS y se sembraron a la misma densidad que las de médula ósea.

Las células de ambos orígenes se cultivaron en medio de crecimiento ,formado por DMEM bajo en glucosa (Sigma-Aldrich) suplementado con 1% de L-glutamina, 1% de penicilina/estreptomicina y suero fetal bovino (FBS) en cantidad variable, un 10% en el caso de las células procedentes de médula ósea y un 15% en las de sangre periférica.

Las muestras fueron lavadas con PBS a las 24, 48 y 72 horas para eliminar las células no adherentes. Las condiciones en las que se mantuvieron fueron: 37°C, 5% de CO₂ y 20% de O₂.

3. EXPANSIÓN DE MSC

De las células mononucleadas que se sembraron, se recuperaron adherentes después de que unas pocas se fijaran en la superficie de la placa y se dividieran. Posteriormente, las MSC se expandieron a lo largo de 2 pases, momento en el que se obtuvo cantidad suficiente para continuar los experimentos. Los cambios de pase se realizaron cuando las células alcanzaban el 80% de confluencia. Para ello se despegaron las células de la superficie de la placa mediante tripsina/EDTA. Posteriormente una alícuota se tiñó con azul de *Trypan* para facilitar el conteo en la cámara de Neubauer. Después fueron resembradas a una densidad de 5.000 céls/cm².

4. CARACTERIZACIÓN DE MSC

Con las células ya aisladas, hubo que comprobar si se trataban efectivamente de MSC. Para ello, se comprobó su capacidad proliferativa, expresión de marcadores de superficie y capacidad de diferenciación a linajes mesodérmicos.

4.1 CAPACIDAD PROLIFERATIVA

Para medir esta capacidad se emplean dos datos [44].

- Doblaje celular (CD), calculado como $CD = \ln(N_f/N_i) / \ln(2)$
- Tiempo de doblaje (DT), calculado con la fórmula $DT = CT/CD$

Donde N_f es el nº de células al final del pase, N_i el número inicial y CT es el nº de días en cultivo.

4.2 EXPRESIÓN DE MARCADORES DE SUPERFICIE DE MSC

La expresión de marcadores de superficie se realizó mediante citometría de flujo en el servicio de separación celular y citometría del CIBA (Centro de Investigaciones Biomédicas de Aragón) con las células en pase 2, haciendo uso del panel de anticuerpos utilizado para la caracterización de MSC humanas (Tabla 1 del Anexo I).

4.3 CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN A LINAJES MESODÉRMICOS

Las MSC deben ser capaces de diferenciarse a los linajes mesodérmicos. Se sembraron tanto cultivos control (con el medio de cultivo estándar) como cultivos en medios de diferenciación. Los medios fueron cambiados cada 3 días.

4.3.1 Diferenciación adipogénica

Las células se sembraron a una densidad de 5.000 cél/cm² y se cultivaron en medio adipogénico durante 14 días. El medio de diferenciación se compone de medio de crecimiento suplementado con 1 µM de dexametasona, 200 µM de indometacina, 15% suero de conejo y 500 µM de IBMX

(isobutil-metilxantina). Para la visualización de las células diferenciadas pasados los 14 días, se llevó a cabo su fijación con formalina y posteriormente se empleó la tinción con *Oil Red*.

4.3.2 Diferenciación condrogénica

Para dicha diferenciación, las células se mantuvieron en medio condrogénico durante 21 días, las células se sembraron a una densidad de 50.000 céls/cm². Dicho medio está suplementado con 1.8 ng/ml de TGFβ-3, 10% de ITS+*Universal Culture Supplement Premix*, 56 μM de ascorbato-2-fosfato, 9 nM de dexametasona y 1% de P/S (penicilina/estreptomicina). A los 21 días se analizaron mediante visualización microscópica previa fijación con formalina y tinción. Para la misma se empleó *Alcian Blue* diluido en ácido clorhídrico 0.1 M hasta ajustar a un pH de 1, para así revelar los glucosaminoglucanos de la matriz extracelular.

4.3.3 Diferenciación osteogénica

Las células fueron cultivadas durante 21 días y sembradas a densidad de 20.000 céls/cm². El medio de diferenciación estaba formado por medio de crecimiento con 0.1 μM de dexametasona, 10 mM de β-glicerofosfato y 0.1 mM de ascorbato-2-fosfato. Para observar las células al microscopio se tiñeron con *Alizarín Red* a pH 4.6, previa fijación con etanol.

5. DIFERENCIACIÓN NEUROGÉNICA

Uno de los objetivos de este proyecto era conseguir la diferenciación de las MSC a células neuronales. Para esta diferenciación se empleó Medio Neurogénico comercial *HyClone*. (Thermo Scientific). Las células fueron sembradas a una densidad de 7.500 células/cm². Se mantuvieron en cultivo durante 3 días, momento en el cual se realizaron las fotografías de las mismas.

Para comprobar esa diferenciación a neurona, las células por un lado se observaron al microscopio (en este caso no se tiñen previamente). Por otro lado, debían ser analizados por RT-qPCR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real) los marcadores neurogénicos: *NFM* (polipéptido medio de neurofilamento), *NES* (nestina) y *TUBB3* (tubulina beta clase 3).

5.1 ANÁLISIS DE MARCADORES GÉNICOS NEURONALES

Llegados a este punto, fue imposible continuar el protocolo con las mismas células puesto que para alguno de los animales no habíamos obtenido suficientes. Debido a esto, para poder continuar con el proceso, se optó por descongelar células del laboratorio: 6 cultivos de BM-MSC (3 sanas y 3 enfermas) y otros 6 de PB-MSC (3 sanas y 3 con scrapie).

5.1.1 Extracción del RNA y síntesis de DNA complementario

Como etapa previa a la RT-qPCR fue necesaria la extracción de RNA a partir de las células y posterior conversión a cDNA (DNA complementario). Este proceso se realizó a partir de las

células en placa de cultivo mediante el *kit Cells to cDNA II* de Ambion (Applied Biosystems) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

5.1.2 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

Se utilizó este método para el análisis de los marcadores neuronales mencionados. Los cebadores habían sido previamente diseñados [9]. Los niveles de expresión de cada fragmento génico se detecta mediante el uso de fluoróforos (SYBR Green en este caso) que se unen al fragmento que se ha amplificado y emiten distinta cantidad de fluorescencia según el número de copias que se hayan sintetizado. En cada ciclo de PCR se mide la fluorescencia emitida y se obtiene una curva cuando se completan todos los ciclos (normalmente unos 40) para cada muestra. Esta curva tiene un valor característico que es el Ct (*cycle threshold*) o ciclo en el que la muestra atraviesa un umbral de fluorescencia, del cual valores bajos corresponden a expresión elevada del marcador. Para una cuantificación absoluta se requiere de la elaboración de una recta patrón con diferentes concentraciones del fragmento que se quiere amplificar [45]. En nuestro caso la cuantificación no ha sido absoluta sino que de forma relativa se han comparado los niveles de expresión entre células diferenciadas y no diferenciadas.

El aparato empleado para el estudio ha sido *StepOne™ Real Time System*. La reacción se realizó en una placa con pocillos con las muestras por triplicado. En los pocillos se añadió cDNA, cebador, agua ultrapura y la mezcla comercial utilizada con SYBR® Green (Applied Biosystems).

Las condiciones que se aplicaron para el ensayo fueron un paso inicial de 10 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos compuestos por 3 segundos a 95°C y 30 segundos a la temperatura de hibridación de cada cebador. Tras la amplificación se obtuvieron las curvas de disociación que indican la amplificación de uno o más fragmentos.

La cuantificación de la expresión génica se ha evaluado analizando también genes housekeeping (HK) o normalizadores. Éstos son genes constitutivos que tienen niveles de expresión constantes en todas las células. Se trata de genes relacionados con el funcionamiento basal de las funciones celulares. Estos genes nos permiten normalizar la expresión de los genes de interés para solventar posibles variaciones debidas al pipeteo o en la eficiencia de la síntesis de cDNA [46]. De esta manera, aunque una muestra tenga más cDNA se puede comparar con otra aunque tenga menos ya que esta diferencia se iguala al normalizar con el HK.

En este trabajo el HK usado para normalizar los datos ha sido G6PDH (Glucosa-6-Fosfato deshidrogenasa). Luego, se empleó la prueba estadística *t de Student* para valorar las diferencias entre el grupo control y diferenciado (significativos si $P < 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. AISLAMIENTO, CULTIVO Y CAPACIDAD PROLIFERATIVA DE LAS MSC

El número de células mononucleadas purificadas de la médula ósea fue variable, con contajes entre 430.000 y 7.860.000. Esta variación no dependió del estado del animal sino del volumen de muestra que se pudo extraer de la cabeza humeral. Al final del pase 0 se obtuvieron valores más similares de células adherentes, variando entre 490.000 y 580.000. Las células se expandieron hasta pase 2, momento en el cual se realizaron los experimentos de diferenciación.

Se observó que las células extraídas de ambos orígenes presentaban una morfología fibroblastoide, primer indicio de que se trataban de MSC [5].

El número de células obtenidas a partir de médula fue variable consiguiéndose a final del pase 2 entre 1.700.000 y 5.940.000 células adherentes, según la muestra. Los tiempos de doblaje (DT) fueron muy variables entre individuos. Otros trabajos han descrito diferencias en proliferación en las MSC obtenidas de médula ósea en esta especie [47].

En cuanto a sangre periférica, sólo una muestra llegó a expandirse hasta pase 2, si bien, ésta muestra alcanzó las 7.500.000 células al final del pase. Al igual que ocurre en otras especies, el número de unidades formadoras de colonias obtenido a partir de sangre periférica fue mucho menor que el obtenido de médula ósea [48]. La mayor proliferación observada en este caso podría ser debida a la variación individual, estudios recientes del equipo con el que se ha realizado el trabajo no encontraron diferencias significativas entre BM-MSC y PB-MSC analizando un número mayor de individuos [49].

Los datos específicos para cada cultivo y pase aparecen en las Tablas 2 y 3 del Anexo I.

2. CARACTERIZACIÓN DE MSC

Además de la capacidad de adherencia al plástico, su morfología fibroblastoide y su capacidad de proliferación, para completar la caracterización se estudió la expresión de marcadores de superficie y se analizó la capacidad de diferenciación de los distintos cultivos.

2.1 EXPRESIÓN DE MARCADORES DE SUPERFICIE DE MSC

La expresión de marcadores de superficie fue evaluada mediante citometría de flujo. Los marcadores fueron examinados en los 5 cultivos que llegaron hasta pase 2 (4 BM-MSC y 1 PB-MSC). Los resultados se muestran en la Tabla 1 del Anexo I. Tras analizar todo el panel de anticuerpos utilizado para la especie humana en el servicio de separación celular del CIBA, sólo se observó intensa inmunoreactividad para el marcador *CD29*. En la Figura 1 se muestra un ejemplo de las imágenes de citometría para este marcador.

La caracterización de los marcadores de superficie a través de citometría de flujo supone un reto para las MSC derivadas de ovino, ya que los anticuerpos comerciales están diseñados para reaccionar contra antígenos humanos y murinos, mostrando, en general, una baja reactividad frente a las moléculas de otras especies [50].

2.2 CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN A LINAJES MESODÉRMICOS

2.2.1 Potencial adipogénico

Los cultivos mantenidos en condiciones de adipogénesis y sus correspondientes controles fueron analizados al microscopio. Se pudieron observar las gotas lipídicas de distintos tamaños en el interior de las células cultivadas en medio adipogénico tal y como se muestra en la Figura 1 del Anexo II. Para asegurar que se trataban de gotas lipídicas se realizó la tinción *Oil Red*, con afinidad por los ácidos grasos. Esta gran capacidad de diferenciación hacia linajes adipogénicos ha sido descrita previamente para las MSC ovinas.

2.2.2 Diferenciación condrogénica

Las células del cultivo con medio para la diferenciación condrogénica y sus controles se tiñeron con *Alcian Blue*, que presenta afinidad por los glucosaminoglicanos de la matriz extracelular, con el fin de visualizar las formaciones nodulares de color azul típicas de esta diferenciación. Sin embargo, pese a emplear los medios de cultivo indicados en la bibliografía [51], no se observó diferenciación (Figura 1 del Anexo II). Apenas hubo diferencia alguna entre el grupo diferenciado y el control. La diferenciación condrogénica se suele realizar en 3D, en cultivos en micromasas, cultivo que parece facilitar esta diferenciación. Los problemas para diferenciar las MSC ovinas extraídas de sangre periférica ha sido observada previamente por el equipo en el que se realizó el trabajo utilizando el mismo protocolo de diferenciación [9]. La diferenciación en micromasas tampoco ha dado buenos resultados en MSC ovinas obtenidas de médula ósea [52].

2.2.3 Diferenciación osteogénica

Las células se tiñeron en este caso con *Alizarín Red* para así, observar las formaciones nodulares rojizas que reflejan la mineralización y por tanto correcta diferenciación de las células. Al igual que en el caso anterior, a pesar de seguir el protocolo utilizado con éxito previamente en el grupo de investigación [9] [49], a nivel morfológico no se observaron diferencias entre el grupo control y las diferenciadas. El protocolo utilizado se describió para su utilización en MSC obtenidas de caballo y contiene β -glicerolfosfato, que es la fuente de iones fosfato más utilizada [44]. En estudios anteriores del grupo tampoco se aprecian diferenciaciones tan claras como las observadas para la especie equina [9]. Se ha descrito que esta fuente de glicerol podría no ser la más adecuada para las diferenciaciones en MSC de esta especie, señalando NaH_2PO_4 como

fuentes alternativas para ovino [53]. Nuestros resultados confirman esta falta de mineralización (Figura 1 del Anexo II) aconsejando variar el protocolo de diferenciación para las MSC ovinas.

3. DIFERENCIACIÓN NEUROGÉNICA

Tras 3 días en cultivo diferenciado *HyClone* (Thermo Scientific) se observaron las células al microscopio. Se visualizaron cambios morfológicos evidentes como retracción del citoplasma hacia el núcleo, elongaciones finas y ramificaciones de lo que se deduce que tanto las BM-MSc como las PB-MSc que se han aislado conservan su capacidad de diferenciación neurogénica. No se observaron diferencias a nivel morfológico entre los cultivos de MSC obtenidos de médula ósea y el de sangre periférica ni tampoco entre los cultivos provenientes de ovino con scrapie y los controles (Figura 2 del Anexo II).

3.1 ANÁLISIS DE MARCADORES GÉNICOS. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL

Los marcadores neurogénicos se analizaron mediante RT-qPCR. Mediante la prueba estadística Shapiro-Wilk se comprobó que los datos de expresión seguían una distribución normal ($p > 0,05$), y por lo tanto se puede aplicar la *t de Student* para comparar grupos.

No se observan cambios significativos en los niveles de expresión de los marcadores neurogénicos en los cultivos diferenciados con respecto a los controles (Figura 1 del Anexo III). Esto puede deberse a que las desviaciones son muy grandes y es complicado conseguir diferencias significativas. Además, el estudio de expresión se realiza en un único momento que podría no ser el óptimo en la cinética de expresión de los distintos genes.

Al igual que en la diferenciación morfológica, no se observaron diferencias significativas entre los cultivos provenientes de animales sanos y de ovino con scrapie (Figura 1 del Anexo III). La falta de diferencias entre las características estudiadas de las MSC de animales enfermos y sanos resulta prometedor para su uso en terapia para las enfermedades priónicas.

CONCLUSIONES

Tras la realización de este trabajo se pueden extraer una serie de conclusiones que se recopilan a continuación:

-La bibliografía consultada demuestra la utilización creciente de las MSC en terapia celular tanto en medicina humana como en modelos animales y clínica veterinaria. Pese a esto, bien es cierto que se requiere un mayor número de investigaciones con el fin de obtener las alternativas terapéuticas más adecuadas, así como conocer más a fondo el modo de actuación de las mismas.

-En este trabajo se ha conseguido aislar MSC de las dos fuentes de las que se han tomado muestras. Sin embargo, el aislamiento se ha logrado en todas las muestras de BM pero no en el caso de PB, confirmándose así la menor presencia de este tipo celular en sangre periférica.

- La caracterización de las MSC ovinas por marcadores de superficie supone un reto pues la mayoría de los anticuerpos comerciales están diseñados para reaccionar contra antígenos de otras especies como la humana o murina. Se ha realizado la diferenciación a linajes mesodérmicos con éxito en el caso de adipogénesis, no así en el caso de osteogénesis y condrogénesis. De estudios previos y de este mismo, se puede deducir que es posible que se deban cambiar las condiciones de diferenciación a estos dos linajes para adaptarlas a la especie ovina.

-Tras el análisis de las imágenes obtenidas de los cultivos diferenciados a neurona, se puede deducir que la diferenciación a este linaje tanto de las BM-MSC como las PB-MSC se ha llevado a cabo con éxito, por lo que estas células conservan su capacidad de diferenciación neurogénica. La expresión de marcadores de superficie no muestra diferencias significativas entre cultivos control y diferenciados, podría deberse a la gran variabilidad de los cultivos y a que el estudio de expresión de marcadores se realiza en un único momento que podría no ser el óptimo en la cinética de expresión de éstos.

-No se han observado diferencias significativas entre los datos referentes a animales con signos de scrapie y sanos (tanto en el aislamiento como en la caracterización y diferenciación neurogénica). Por ello, se concluye que tanto las células de individuos enfermos como de sanos mantienen similares características por lo que la enfermedad no parece afectarles, resultado prometedor para el uso de estas células en terapia celular de las enfermedades priónicas.

CONCLUSIONS

After the execution of this work we can obtain a number of conclusions that are summarized below:

-The literature demonstrates the growing use of MSC in cell therapy in both human and animal medicine and veterinary clinical models. Despite this, it is true that more research is required in order to obtain the most suitable therapeutic alternatives as well as to learn more about the mechanism of action of these cells.

-In this work, we have isolated MSC from the two sources analysed. However, isolation was achieved in all BM samples but only in one PB, confirming the reduced presence of this cell type in peripheral blood.

-Characterization of sheep MSC using surface markers is a challenge because most commercial antibodies are designed to react to antigens of other species such as murine or human. We have achieved mesodermal differentiation lineages successfully in the case of adipogenesis, but not in the case of osteogenesis and chondrogenesis. Based in previous studies and this one, we can deduce that perhaps it is necessary to change the conditions of these two lineages differentiation to suit sheep.

-After analyzing the images obtained from neuronal differentiated cultures, we can deduce that neurogenic differentiation from both sources (BM-MSC and PB- MSC) has been achieved successfully, so these cells retain their neurogenic differentiation capacity. The expression of surface markers shows no significant differences between control and differentiated cultures, maybe due to the high cultures variability and because we study the expression in a single moment that might not be the best one in the kinetics of expression.

-No significant differences were observed between the data concerning animals with signs of scrapie and healthy sheep (neither in isolation and characterization nor in neurogenic differentiation). Therefore, it is concluded that both the cells of healthy individuals and those of ill animals have similar characteristics so the disease does not seem to affect them and it is a promising result for the use of these cells in cell therapy of prion diseases.

VALORACIÓN PERSONAL

El cursar esta asignatura me ha permitido ampliar mis conocimientos en varios campos, especialmente en aquellos relacionados con la Genética, asignatura que había sido impartida en 2º curso. En concreto, me ha permitido conocer la manera con la que se trabaja con células madre mesenquimales, concepto que no habíamos estudiado a lo largo de los 5 años de carrera y por lo tanto nuevo para mí.

Este proyecto me ha hecho adquirir una mayor experiencia en prácticas tales como:

- Aprender a realizar búsquedas bibliográficas a partir de diferentes buscadores de artículos científicos y así conocer el estado del arte en materia de terapia celular.

- Ganar experiencia a nivel práctico también, involucrándome a lo largo del proceso, desde la obtención de las muestras de los animales vivos.

- Adquirir mayor destreza en el laboratorio haciendo uso de los materiales necesarios para este trabajo (pipetas, centrífuga, cabina de flujo laminar, cultivos en *Falcon* y pocillos, termociclador para la realización de RT-qPCR (*StepOne™ Real Time System*)...

- Preparar tinciones específicas para comprobar las diferenciaciones y posteriormente conocer las estructuras microscópicas que nos ayudan a valorar dicha diferenciación.

- Saber interpretar los resultados obtenidos una vez realizado el proceso.

- Para la organización de los diferentes datos han sido necesarias herramientas informáticas como Excel, el programa SPSS para cálculos de estadística y por último EndNote para archivar la bibliografía.

Finalmente, pese a que el desarrollo de este trabajo ha sido más prolongado de lo que en un principio imaginaba, ha sido un campo que me ha resultado novedoso y que ha permitido ampliar mi experiencia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Prósper, F., et al., *Trasplante celular y terapia regenerativa con células madre*. Anales del Sistema Sanitario de Navarra, 2006. **29**: p. 219-234.
2. Millás Mur, J., *Las células madre y la medicina regenerativa. De las células madre embrionarias a la reprogramación celular*. Therapeía :estudios y propuestas en ciencias de la salud, 2010. **2**: p. 13-27.
3. Mejía Rivera, O., *En el jardín de Mendel*. 2012, Colombia: Universidad de Antioquia. 205.
4. López Farré, A.M.M., C., *Libro de la salud cardiovascular del hospital clínico San Carlos y la fundación BBVA*. 2009, Madrid: Fundación BBVA. 694.
5. Zomer, H.D., et al., *Mesenchymal and induced pluripotent stem cells: general insights and clinical perspectives*. Stem Cells and Cloning : Advances and Applications, 2015. **8**: p. 125-134.
6. Mariano, E.D., et al., *Adult stem cells in neural repair: Current options, limitations and perspectives*. World Journal of Stem Cells, 2015. **7**(2): p. 477-482.
7. Dominici M.;Le Blanc, K.M., I.; Slaper-Cortenbach,I.; Marini,F.; Krause, D.; Deans,R.;Keating,A.;Prockop,D.;Horwitz,E., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-317.
8. Arévalo Romero, A.J.P.G., D.M.; Rodríguez Pardo, V.M., *Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas*. NOVA-Publicación científica en ciencias biomédicas., 2007. **5**: p. 8.
9. Lyahyai, J., et al., *Isolation and characterization of ovine mesenchymal stem cells derived from peripheral blood*. BMC Vet Res, 2012. **8**: p. 169.
10. Friedenstein, A.J., R.K. Chailakhjan, and K.S. Lalykina, *THE DEVELOPMENT OF FIBROBLAST COLONIES IN MONOLAYER CULTURES OF GUINEA-PIG BONE MARROW AND SPLEEN CELLS*. Cell Proliferation, 1970. **3**(4): p. 393-403.
11. Morcos, M.W., H. Al-Jallad, and R. Hamdy, *Comprehensive Review of Adipose Stem Cells and Their Implication in Distraction Osteogenesis and Bone Regeneration*. BioMed Research International, 2015. **2015**: p. 842975.
12. Caplan, A.I., *Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine*. Journal of Cellular Physiology, 2007. **213**(2): p. 341-347.
13. Zuk, P.A.Z., M.; Mizuno,H.;Huang,J.; Futrell, J.W.;Katz,A.J.;Benhaim,P.;Lorenz,H.P.;Hedrick,M.H., *Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies*. 2001. **7**(2): p. 211-228.

14. Caspar-Bauguil, S., et al., *Adipose tissues as an ancestral immune organ: Site-specific change in obesity*. FEBS Letters, 2005. **579**(17): p. 3487-3492.
15. Gómez-Ochoa, I.L.-L.P.C., E.; Villarroya-Aparicio, A.; y Marín-Redondo, M., *Células mesenquimales y fibrocitos en sangre periférica. Condiciones de cultivo*. Reumatología clínica, 2007. **3**.
16. Moreno Cuevas, J.E.L.-F., R.; y González-Garza, T., *Terapia celular: La medicina del futuro*, in *Revista digital de postgrado, investigación y extensión del campus Monterrey*. 2003: Monterrey (México).
17. Grinnemo, K.H., et al., *Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium*. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. **127**(5): p. 1293-1300.
18. Lamas López, J.R., *Medicina regenerativa aplicada al tratamiento de las patologías musculoesqueléticas*. Reumatología clínica, 2014. **10**: p. 139-140.
19. Shao, J., W. Zhang, and T. Yang, *Using mesenchymal stem cells as a therapy for bone regeneration and repairing*. Biological Research, 2015. **48**(1): p. 1-7.
20. Horwitz, E.M., et al., *Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta*. Nat Med, 1999. **5**(3): p. 309-313.
21. Squillaro, T., Peluso, G., Galderisi, U., *Clinical Trials with Mesenchymal Stem Cells: An Update*. Cell transplantation, 2015: p. 53.
22. Pérez Borrego, A., et al., *Utilización de células madre en el tratamiento de defectos óseos periodontales*. Revista Cubana de Estomatología, 2009. **46**: p. 122-128.
23. Manuel Fuentes-Boquete, I., Arufe Gonda, M.C., Díaz Prado, S.M., Hermida Gómez, T., de Toro Santos, F.J., Blanco García, F.J., *Tratamiento de lesiones del cartílago articular con terapia celular*. Reumatología clínica, 2007. **3**.
24. Shelbourne, K.D., S. Jari, and T. Gray, *Outcome of Untreated Traumatic Articular Cartilage Defects of the Knee. A Natural History Study*, 2003. **85**(suppl 2): p. 8-16.
25. Orozco, L., et al., *Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: a pilot study*. Transplantation, 2013. **95**(12): p. 1535-1541.
26. Murphy, J.M., et al., *Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis*. Arthritis & Rheumatism, 2003. **48**(12): p. 3464-3474.
27. Riaño G., N., Vera A., V., & Villamil J., L., *Las células madre mesenquimales desde la perspectiva de las ciencias veterinarias*. Revista Medicina Veterinaria, 2007: p. 19-27.
28. Gaspar, D., et al., *Progress in cell-based therapies for tendon repair*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2015. **84**: p. 240-256.

29. Wang, J., L. Liao, and J. Tan, *Mesenchymal-stem-cell-based experimental and clinical trials: current status and open questions*. Expert opinion on biological therapy, 2011. **11**(7): p. 893-909.
30. Delcarpio, J.B. and W.C. Claycomb, *Cardiomyocyte Transfer into the Mammalian Heart*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1995. **752**(1): p. 267-285.
31. Chen, S.-L., et al., *Improvement of cardiac function after transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in patients with acute myocardial infarction*. Chinese medical journal, 2004. **117**(10): p. 1443-1448.
32. Le Blanc, K., et al., *Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study*. The Lancet, 2008. **371**(9624): p. 1579.
33. Lee, S.T., et al., *Treatment of high-risk acute myelogenous leukaemia by myeloablative chemoradiotherapy followed by co-infusion of T cell-depleted haematopoietic stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells from a related donor with one fully mismatched human leucocyte antigen haplotype*. British Journal of Haematology, 2002. **118**(4): p. 1128-1131.
34. Xiao, Y., et al., *Efficacy and safety of mesenchymal stromal cell treatment from related donors for patients with refractory aplastic anemia*. Cytotherapy, 2013. **15**(7): p.760.
35. Deng, W., Han,Q.,Liao,L.,You,S., Deng,H.,Zhao, R., *Effects of Allogeneic Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells on T and B Lymphocytes from BXSb Mice*. DNA and Cell Biology, 2005. **24**.
36. Connick, P., et al., *The mesenchymal stem cells in multiple sclerosis (MSCIMS) trial protocol and baseline cohort characteristics: an open-label pre-test: post-test study with blinded outcome assessments*. Trials, 2011. **12**: p. 62-62.
37. Karussis, D., et al., *Neuroprotection in multiple sclerosis*. Clinical neurology and neurosurgery, 2006. **108**(3): p. 250-254.
38. Ra, J.C., et al., *Safety of intravenous infusion of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in animals and humans*. Stem cells and development, 2011. **20**(8): p. 1297-1308.
39. Mendonça, M.V.P., et al., *Safety and neurological assessments after autologous transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells in subjects with chronic spinal cord injury*. Stem Cell Research & Therapy, 2014. **5**(6): p. 126.
40. Kim, S.U., H.J. Lee, and Y.B. Kim, *Neural stem cell-based treatment for neurodegenerative diseases*. Neuropathology, 2013. **33**(5): p. 491-504.

41. Casañas, J., et al., *Peripheral nerve regeneration after experimental section in ovine radial and tibial nerves using synthetic nerve grafts, including expanded bone marrow mesenchymal cells: morphological and neurophysiological results*. Injury. **45**: p. S2-S6.
42. Mediano, D.R., et al., *The Potential of Mesenchymal Stem Cell in Prion Research*. Zoonoses and Public Health, 2015. **62**(3): p. 165-178.
43. Govoni, K.E., *horse especies symposium: Use of mesenchymal stem cells in fracture repair in horses*. journal of animal science, 2015.
44. Ranera, B., et al., *Comparative study of equine bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells*. Equine Veterinary Journal, 2012. **44**(1): p. 33-42.
45. Ferreira, I.D., V.E. do Rosário, and P.V.L. Cravo, *Real-time quantitative PCR with SYBR Green I detection for estimating copy numbers of nine drug resistance candidate genes in Plasmodium falciparum*. Malaria Journal, 2006. **5**: p. 1-1.
46. Eisenberg, E.L., E., *Human housekeeping genes, revisited*. Trends in Genetics, 2013. **29**(10): p. 569-574.
47. Rhodes, N., et al., *Heterogeneity in proliferative potential of ovine mesenchymal stem cell colonies*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2004. **15**(4): p. 397.
48. Chong, P.-P., et al., *Human peripheral blood derived mesenchymal stem cells demonstrate similar characteristics and chondrogenic differentiation potential to bone marrow derived mesenchymal stem cells*. Journal of Orthopaedic Research, 2012. **30**(4): p. 634-642.
49. Mediano, D.R., et al., *Characterization of Mesenchymal Stem Cells in sheep naturally infected with scrapie*. Journal of General Virology, 2015.
50. De Schauwer, C., et al., *Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity*. Theriogenology. **75**(8): p. 1431-1443.
51. Jäger, M., et al., *Ovine cord blood accommodates multipotent mesenchymal progenitor cells. in vivo*, 2006. **20**(2): p. 205-214.
52. Mrugala, D., et al., *Phenotypic and functional characterisation of ovine mesenchymal stem cells: application to a cartilage defect model*. Annals of the rheumatic diseases, 2008. **67**(3): p. 288-295.
53. Kalaszczynska, I., et al., *Substantial Differences Between Human and Ovine Mesenchymal Stem Cells in Response to Osteogenic Media: How to Explain and How to Manage?* BioResearch Open Access, 2013. **2**(5): p. 356-363.