

EVALUACIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES OVINAS COMO MODELOS CELULARES IN VITRO DE SCRAPIE

Hernaiz^{1,2}, A., Domínguez-Estallo¹, L., Gómez-Redrado¹, S., López-Pérez^{1,2}, O., García², M., Garza², MC., Vázquez¹, F., Zaragoza¹, P., Badiola², JJ., Bolea², R., Filali¹, H., Martín-Burriel^{1,2}, I.

¹LAGENBIO, IA2, IIS, Universidad de Zaragoza, Zaragoza; ²CIEETE, IA2, IIS, Universidad de Zaragoza, Zaragoza; ahernaiz@unizar.es

INTRODUCCIÓN

Las células madre mesenquimales (MSCs) son células madre pluripotentes adultas caracterizadas por su capacidad de autorenovación y de diferenciación en células de origen mesodérmico (osteoblastos, adipocitos, condrocitos y miocitos). Estas células también son capaces de diferenciarse *in vitro* en células de origen neurogénico (Zeng et al., 2011; Alizadeh et al., 2019). Por otro lado, las MSCs expresan la proteína príon celular (PrP^C) y las MSCs murinas procedentes de médula ósea (BM-MSCs) son capaces de infectarse con una cepa de Gerstmann-Sträussler-Schneiker previamente adaptada en ratón *ex vivo* y mantener la infectividad en pasajes sucesivos (Akimov et al., 2009). Nuestro grupo de investigación ha descrito la presencia de PrP^C en MSCs ovinas derivadas de médula ósea (oBM-MSCs) tanto a nivel de transcripción como de proteína (Mediano et al., 2015). En ese mismo estudio, las oBM-MSCs derivadas de ovejas con scrapie mostraron un potencial de proliferación disminuido en comparación con las células obtenidas de ovejas sanas. Todos estos hallazgos, hacen de las MSCs unas buenas candidatas para el desarrollo de modelos *in vitro* de enfermedades priónicas. En este trabajo, presentamos el aislamiento de oBM-MSCs procedentes de ovejas con diferentes genotipos para el gen *PRNP* (ARQ/ARQ, ARQ/VRQ y VRQ/VRQ) y la evaluación de: su habilidad para diferenciarse en células madre neurales (NSCs), su capacidad para replicar el príon y su respuesta a la infección *in vitro* con priones.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las oBM-MSCs fueron extraídas de tres ovejas de raza *Rasa Aragonesa* de un año de edad portadoras de diferentes genotipos para el gen *PRNP*: ARQ/ARQ, ARQ/VRQ y VRQ/VRQ. El inóculo positivo consistía en un homogeneizado de cerebro (10% en PBS) de tres ovejas de raza *Rasa Aragonesa* de entre 2,5 y 3 años de edad y con los mismos genotipos para *PRNP*. El inóculo negativo procedía de dos ovejas de raza *Rasa Aragonesa* de entre 9 y 10 meses de edad y con genotipos ARQ/ARQ y VRQ/VRQ. El aislamiento de las MSCs se llevó a cabo mediante protocolos de centrifugación en gradientes Lymphoprep, aislamiento de células mononucleares y purificación de células adherentes. Una vez aisladas, dichas células se cultivaron utilizando "DMEM low glucose" (Sigma) con 10% de suero fetal bovino como medio de crecimiento. Para la diferenciación a NSCs, se procedió a cambiar el medio DMEM por el medio de diferenciación "PSC neural induction medium" (ThermoFisher). Se realizaron cambios de medio cada dos días durante un total de 9 días. Se analizó la expresión de cinco genes relacionados con la replicación del príon (Marbiah et al., 2014), tanto en las MSCs como en las NSCs. Para ello, se realizó la extracción de RNA utilizando el kit "Cells to cDNA" (applied biosystems). Posteriormente, para valorar la expresión de los genes se llevó a cabo q-PCR con el sistema StepOne usando "SYBRGreen master mix". Finalmente, ambos tipos celulares fueron infectados con inóculos de extracto cerebral (positivo y negativo) al 1%. Se evaluó la presencia de PrP^{Sc}, una vez eliminado el inóculo y lavado con PBS los cultivos, a las 48 horas (T1), 4 días (T2) y 9 días (T3) de estar en contacto con el inóculo mediante el kit de ELISA "BSE-Scrapie IDEXX". También, se estudió la toxicidad y la proliferación de los cultivos a los 9 días (T3) por medio de un ensayo MTT. Este estudio ha sido aprobado por la Comisión Ética de la Universidad de Zaragoza (PI44/18).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los tres cultivos de oBM-MSCs se diferenciaron hacia NSCs. La diferenciación fue comprobada por la reducción de la expresión del gen de pluripotencia *OCT4* y un ligero cambio morfológico de las células (resultados no mostrados). Se observó una disminución de la expresión de los genes relacionados con la replicación del prión en los cultivos de NSCs (condiciones neurogénicas) en comparación con los cultivos de MSCs (condiciones de crecimiento) (Figura 1). La disminución de la expresión de estos genes facilita la replicación del prión (Marbiah et al., 2014) por lo que nuestros resultados sugieren que las MSCs cultivadas en condiciones neurogénicas podrían ser más susceptibles a la infección y multiplicación del prión.

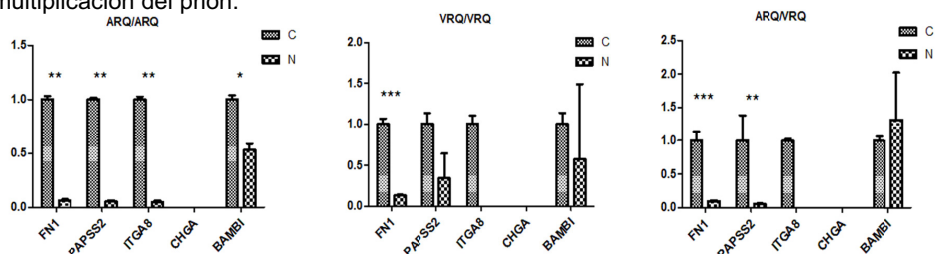


Figura 1. Análisis de la expresión de genes relacionados con la replicación del prión mediante qPCR en MSCs (C) y NSCs (N) en los cultivos. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Tras la inoculación de los cultivos de MSCs y NSCs con el inóculo de scrapie, se observó una disminución de la señal de PrP^{Sc} durante los primeros días y un aumento significativo de la misma tras la retirada del inóculo a partir de los 5 días en el cultivo ARQ/ARQ, tanto en condiciones neurogénicas como de crecimiento. El cultivo VRQ/VRQ mostró, en condiciones de crecimiento, una elevada intensidad de señal de PrP^{Sc} inmediatamente después de la retirada del inóculo. Sin embargo, esta señal fue disminuyendo a lo largo del tiempo de cultivo. Estos resultados sugieren una elevada capacidad para captar el prión por parte de las células y una posible toxicidad del prión en los cultivos infectados. Por último, el cultivo ARQ/VRQ presentó una señal intermedia de PrP^{Sc} tras la retirada del inóculo. Esta señal se mantuvo más o menos constante a lo largo del tiempo en las células en condiciones de crecimiento mientras que en las células en condiciones neurogénicas se vio un incremento progresivo de la misma. Por tanto, las MSCs son capaces de multiplicar el prión durante los primeros días de cultivo, pero esta capacidad podría estar condicionada por su genotipo.

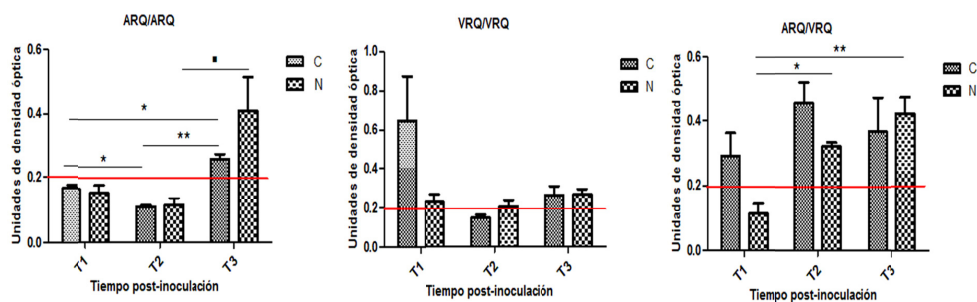


Figura 2. Determinación de PrP^{Sc} mediante ELISA a las 48 horas (T1), 4 días (T2) y 9 días (T3) post-inoculación en MSCs (C) y NSCs (N). La línea roja representa el umbral del kit ELISA. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Finalmente, analizamos la proliferación de las MSCs en condiciones estándar de crecimiento y tras la inoculación con extracto cerebral de ovino control y de ovino con scrapie (Figura 3). En condiciones estándar de crecimiento, los cultivos de MSCs (ARQ/ARQ, VRQ/VRQ y ARQ/VRQ) mostraron diferencias en las tasas de proliferación. La variabilidad entre

donantes ya ha sido descrita en diferentes especies incluida la ovina (Rhodes et al., 2004; Lyahyai et al., 2012). Por otro lado, la inoculación de las células con extracto cerebral modificó las tasas de proliferación en todos los cultivos. En los cultivos inoculados con extracto cerebral de ovino control se observó una disminución de la viabilidad celular, a diferencia de los inoculados con extracto cerebral de ovino con scrapie en los que se produjo un aumento de la tasa de proliferación. Se ha comprobado que las células mesenquimales humanas (hMSCs) son capaces de migrar hacia las lesiones neuropatológicas en ratones infectados con la proteína prión (Song et al., 2009) y, además, han sido identificados *in vitro* factores quimiotácticos involucrados en la migración de hMSCs hacia lesiones cerebrales causadas por priones (Song et al., 2011). Nuestros resultados muestran que los extractos cerebrales de ovino con scrapie también inducen una mayor proliferación de las MSCs *in vitro*.

En conclusión, aunque aún sean necesarios más estudios, nuestros resultados exponen el potencial que presentan las MSCs para el desarrollo *in vitro* de modelos celulares de enfermedades priónicas.

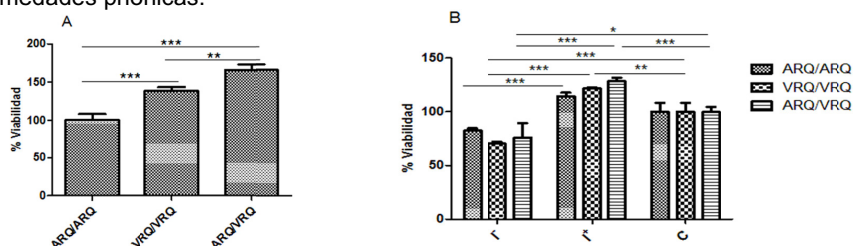


Figura 3. Proliferación de MSCs tras 9 días de cultivo en condiciones estándar de crecimiento (A). Proliferación en presencia de inóculo negativo (I^-) e inóculo positivo (I^+) en relación con su cultivo en condiciones estándar de crecimiento (C: 100% viabilidad) (B). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Zeng G et al. 2011. *Mol Cell Biochem.* 357(1-2):331-41.
- Alizadeh R et al. 2019. *J Chem Neuroanat.* 96:126-133.
- Akimov S et al. 2009. *Folia Neuropathol.* 47(2): p. 205-14.
- Mediano DR et al. 2015. *J Gen Virol.* 96(12):3715-26.
- Marbiah MM et al. 2014. *EMBO J.* 33(14):1527-47.
- Rhodes NP et al. 2004. *J Mater Sci Mater Med.* 15(4):397-402.
- Lyahyai J et al. 2012. *BMC Vet Res.* 8:169.
- Song CH et al. 2009. *J Virol.* 83(11):5918-27.
- Song CH et al. 2011. *J Virol.* 85(21):11069-78.

EVALUATION OF OVINE MESENCHYMAL STEM CELLS AS IN VITRO MODELS OF SCRAPIE

ABSTRACT: Mesenchymal stem cells (MSCs) are adult pluripotent stem cells characterized by their ability to both, self-renewal and differentiation into mesodermal tissues. In addition, these cells can transdifferentiate *in vitro* into cells with neurogenic origin and undifferentiated MSCs express the cellular prion protein (PrP^C). Our group described the presence of PrP^C on bone marrow derived ovine MSCs (oBM-MSCs) at both transcript and protein levels. In this work, we analyzed the potential of oBM-MSCs to develop *in vitro* models of scrapie. First, we isolated MSCs from bone marrow of sheep carrying different genotypes for *PRNP* gene (ARQ/ARQ, ARQ/VRQ and VRQ/VRQ) and differentiated them into neural stem cells (NSCs). The expression of genes involved in prion replication was downregulated in NSCs. We inoculated both MSCs and NSCs with scrapie inoculum (scrapie brains from sheep with similar genotypes) and detected an increment of PrP^{Sc} signal using ELISA test. However, PrP^{Sc} multiplication seemed to be genotype-dependent. Finally, prion infection induced MSC replication. Our results confirm the potential of ovine MSC to study prion diseases *in vitro*.

Keywords: mesenchymal stem cells; scrapie; ovine; prions.