

Andrea García Rey

**CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS MADRE
MESENQUIMALES OVINAS Y DESARROLLO DE
MODELOS CELULARES IN VITRO DE ENFERMEDADES
PRIÓNICAS**

Trabajo de Fin de Grado

Dirigido por la Dra. Inma Martín Burriel

Tutora académica: Anna Ardévol Grau

Grado de Biotecnología



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza

Tarragona

Septiembre 2019

Este Trabajo de Fin de Grado se ha realizado en el Departamento de Anatomía, Embriología y Genética Animal de la Universidad de Zaragoza. Las tareas experimentales se han llevado a cabo en el Laboratorio de Genética Bioquímica (LAGENBIO) y en el Centro de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes (CIEETE).

ÍNDICE

RESUMEN.....	5
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1 Encefalopatías Espongiformes Transmisibles.....	6
1.1.1 Scrapie.....	7
1.1.2 Modelos celulares de enfermedades priónicas.....	8
1.2 Células madre mesenquimales (MSCs)	9
1.2.1 Caracterización de MSCs.....	10
1.2.2 Funciones biológicas y utilidades médicas.....	12
1.2.3 Potencial de las MSCs en el estudio de las enfermedades priónicas	12
2. HIPÓTESIS.....	14
3. OBJETIVOS	14
4. MATERIALES Y MÉTODOS	15
4.1 Cultivos celulares.....	15
4.2 Caracterización de las células mesenquimales ovinas	15
4.2.1 Determinación de marcadores de superficie	15
4.2.2 Capacidad de diferenciación hacia los linajes mesodérmicos	16
4.2.2.1 Diferenciación adipogénica.....	16
4.2.2.2 Diferenciación condrogénica	17
4.2.2.3 Diferenciación osteogénica.....	17
4.3 Capacidad de diferenciación neurogénica	17
4.3.1 Condiciones de cultivo	17
4.3.2 Análisis de expresión génica.....	18
4.3.2.1. Extracción de RNA total	18
4.3.2.2. RT-qPCR	18
4.3.3 Citometría de flujo: Determinación de la Nestina.....	19
4.4 Infección con Scrapie.....	20
4.4.1 Inóculos de extracto cerebral	20

4.4.2	Tratamiento de las células	20
4.5	Ensayo de viabilidad celular: MTT	21
4.6	Determinación de PrP^{sc} mediante Inmunoensayo ELISA	21
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
5.1	Caracterización de las células mesenquimales ovinas	22
5.1.1	Expresión de marcadores celulares de superficie mesenquimales.....	22
5.1.2	Capacidad de diferenciación en los linajes mesodérmicos.....	24
5.2	Capacidad de diferenciación neurogénica	27
5.2.1	Análisis morfológico	27
5.2.2	Análisis de expresión génica.....	28
5.2.3	Análisis del marcador intracelular Nestina.....	30
5.3	Efecto de la infección con Scrapie sobre la multiplicación y toxicidad priónica en las diferentes condiciones de cultivo	31
	Cultivo ARQ/ARQ	31
	Cultivo ARQ/VRQ	33
	Cultivo VRQ/VRQ.....	34
6.	CONCLUSIÓN.....	37
7.	BIBLIOGRAFÍA	38
8.	AUTOEVALUACIÓN	41
ANEXOS	42
Anexo 1	42
Anexo 2	42
Anexo 3	43
Anexo 4	44
Anexo 5	44

RESÚMEN

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) son un grupo de enfermedades neurodegenerativas letales que están causadas por la acumulación de la proteína prion en su isoforma patológica (PrP^{Sc}) en células nerviosas. El desconocimiento de los mecanismos moleculares y la ausencia de tratamiento específico, lleva a la creación de modelos celulares que permitan estudiar las EET en profundidad. El objetivo de este Trabajo Fin de Grado es evaluar el potencial de las células madre mesenquimales (MSCs), de distinto genotipo para el gen *PRNP*, para el desarrollo de modelos in vitro de las EET. Para ello, se utilizaron 3 cultivos de MSCs, confirmando en primer lugar el origen mesenquimal de las células mediante el estudio de su capacidad de diferenciación en los linajes mesodérmicos y la expresión de algunos marcadores de superficie específicos. Se estudió la plasticidad de las MSCs mediante la diferenciación hacia NSC (célula madre neuronal) en condiciones de crecimiento en monocapa (NSCs) y formación de neuroesferas (MSC-NP). Las MSCs fueron sometidas a estudios de infectividad tanto en condiciones basales como de diferenciación hacia NSCs, con cultivos e inóculos de *scrapie* procedentes de ovinos portadores de distintos genotipos para *PRNP*. Las MSCs fueron capaces de diferenciarse en adipocitos, condrocitos y osteocitos pero la expresión de marcadores de superficie fue variable. La diferenciación hacia NSC en monocapa mostró cambios en la morfología celular, aunque el análisis del marcador intracelular no validó la diferenciación. En la formación de neuroesferas, la baja expresión de genes de linaje mesodermal evidenció la pérdida de las características de origen mesodérmico en las células diferenciadas. Tanto en condiciones basales como de diferenciación, la inoculación con *scrapie* indujo la proliferación celular en los distintos cultivos. Los resultados sobre la multiplicación del prion variaron en función del genotipo celular.

Palabras clave: MSCs (Células madre mesenquimales), Scrapie, prion.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Encefalopatías espongiformes transmisibles

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) son enfermedades neurodegenerativas que afectan tanto a animales como a humanos y están caracterizadas por una degeneración progresiva del Sistema Nervioso Central (SNC) con la aparición de vacuolas en las neuronas. Las EET son enfermedades mortales que carecen de un tratamiento específico y de vacunas preventivas. El agente causal de estas enfermedades son los priones (*figura 1*). Los priones son formas alteradas de proteínas celulares inocuas que difieren en su conformación espacial, afectando así a la forma en la que son procesadas. En el tejido nervioso se expresa la proteína priónica celular (PrP^{C}) codificada por el gen *PRNP*. Esta proteína es soluble y sensible a la acción de proteasas, por lo que se digiere fácilmente. Sin embargo, existe una isoforma patológica de la proteína prion, PrP^{Res} , responsable de las patologías de tipo EET. La PrP^{Res} es resistente a la acción de proteasas por lo que no es procesada por la célula y permanece en el tejido nervioso resultando tóxica para las neuronas. Esta isoforma patológica tiene la capacidad de inducir la transformación de la PrP^{C} , no patológica, en moléculas de PrP^{Res} de manera que las isoformas patológicas se acumularán formando agregados en el tejido nervioso hasta dañarlo.

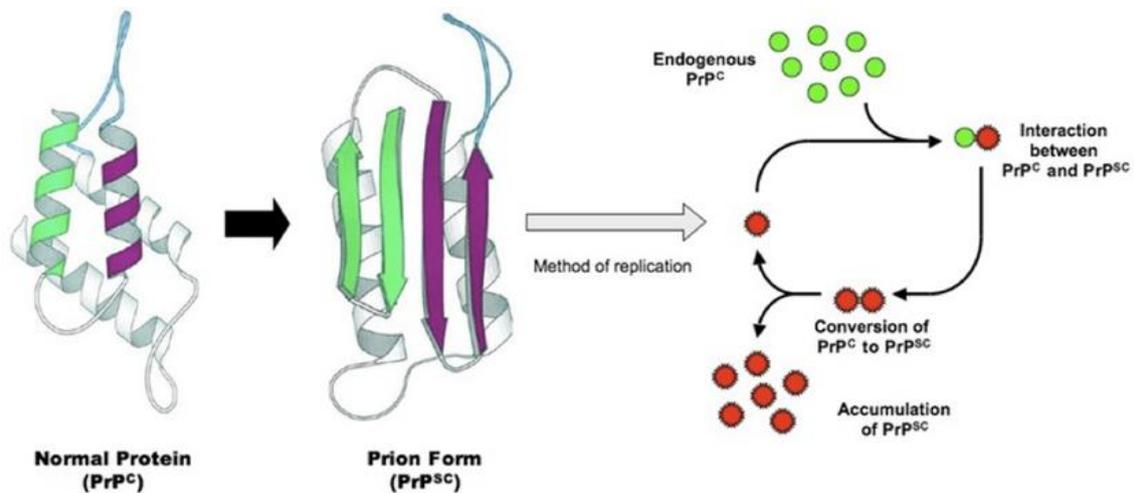


Figura 1. Mecanismo de conversión de la proteína priónica celular en su isoforma patológica(2).

La propagación de estas enfermedades se da por infección a causa de la ingesta de alimentos o al uso de material quirúrgico o trasplantes contaminados con la proteína prion anómala. No obstante, las EET no están calificadas como infecciones propiamente dichas debido a que el agente causal no se reproduce a sí mismo en las

células afectadas, sino que induce a la PrP^C a cambiar su conformación transformándola así en patológica(1).

Algunas de las EET más conocidas son el Scrapie, tanto ovino como caprino, y la encefalopatía espongiforme bovina (EEB), más conocida como 'la enfermedad de las vacas locas'. La EEB se caracteriza por su capacidad de transmitirse a los humanos, dando lugar a la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob(1).

1.1.1 Scrapie

El Scrapie es una de las EET más conocidas y la primera que se describió ya en el siglo XVIII. Tras varias investigaciones en 1936 en Francia sobre estas enfermedades, se consiguió transmitir la enfermedad a ovejas y cabras inoculando extractos de médula ósea de animales enfermos. Desde entonces, el Scrapie se considera un buen modelo para el estudio de las EET. La PrP^{Sc} (Proteína prion causante del Scrapie, otra forma de denominar a la PrP^{Res}) es transmisible y presenta propiedades de resistencia a tiempos prolongados de incubación a altas temperaturas, al tratamiento con formaldehído, a la radiación ultravioleta y a las radiaciones ionizantes(1).

Tras varios estudios realizados en animales infectados con Scrapie de forma natural y experimental, se evidenció la existencia de factores genéticos que influenciaban en la susceptibilidad del hospedador a padecer la enfermedad. Dentro de una misma raza de animales que habían sido sometidos a una inyección subcutánea de extracto de cerebro infeccioso (SSBP/1 Sheep Scrapie Brain Pool 1), se obtuvieron una línea sensible a la enfermedad y otra resistente. Los animales resistentes a la infección por vía subcutánea, no padecieron signos clínicos de Scrapie. Sin embargo, cuando la inyección se producía vía intracerebral, los animales resistentes terminaban desarrollando la enfermedad(2).

Tabla 1. Clasificación de los polimorfismos del gen PRNP en función de la susceptibilidad del individuo y el nivel de riesgo de sufrir la patología.

Categoría de riesgo	Genotipo	Susceptibilidad
Riesgo 1	ARR/ARR	Alta resistencia genética
Riesgo 2	ARR/ARQ, ARR/ARH, ARR/AHQ	Resistencia genética
Riesgo 3	AHQ/AHQ, AHQ/ARQ, ARH/ARH, ARH/ARQ, ARQ/ARQ	Baja resistencia genética
Riesgo 4	ARR/VRQ	Susceptibilidad genética
Riesgo 5	AHQ/VRQ, ARH/VRQ, ARQ/VRQ, VRQ/VRQ	Alta susceptibilidad genética

Tras el descubrimiento del gen *PRNP* que codificaba para la PrP^C y al ver que ésta proteína tenía las mismas características que el agente causal del Scrapie, se realizaron estudios genéticos en los que relacionaron distintas variantes de este gen con la aparición de la enfermedad, principalmente aquellas de los codones 136, 154 y 171(2). Estas variantes se combinan en haplotipos que se definen como un código de tres letras en la que cada una representa el aminoácido presente en cada uno de los anteriores codones. Así pues, se estudiaron los diferentes genotipos del gen *PRNP* en estos codones para clasificar los niveles de riesgo a padecer la enfermedad (tabla 1).

1.1.2 Modelos celulares de enfermedades priónicas

Se han desarrollado modelos celulares para la detección y multiplicación de cepas priónicas que permiten estudiar las EET. Los primeros cultivos en ser infectados *in vitro* con priones fueron células neuronales. Estas células mostraron una acumulación de PrP^{Sc} que resultaba infecciosa. Además, también se han utilizado líneas tumorales. Por ejemplo, un estudio en células de neuroblastoma infectadas con Scrapie (ScN2A) reveló una mayor acumulación de PrP^{Sc} en células de crecimiento lento y en células que habían sido tratadas con ácido retinoico, debido a que éste aumenta la cantidad de PrP^C en células no infectadas. Sin embargo, hay estudios que demuestran que los niveles de expresión de PrP^C total y la capacidad de respuesta de la célula a la infección no están relacionados. Esto sugiere la existencia de factores auxiliares cuya expresión sea responsable de la susceptibilidad de la célula al prion(3).

Aunque se ha descrito la susceptibilidad de las células neuronales al prion, esta susceptibilidad difiere entre especies. Los modelos murinos muestran una susceptibilidad limitada a cepas priónicas obtenidas de otras especies como la ovina, por lo que requieren una adaptación de la cepa a la especie antes de conseguir la infección. Este proceso requiere del pase de la cepa por ratones para la creación de una PrP^{Sc} heteróloga que nos permita cruzar la barrera entre especies murinas y ovinas(3). Para solventar estos problemas, se han creado modelos de ratón transgénico capaces de expresar la PrP ovina. Sin embargo, para el estudio del scrapie sería necesario crear tantos ratones como haplotipos existentes del gen *PRNP* ovino. Una de las limitaciones que presentan los modelos celulares murinos es que el cambio fenotípico que puede sufrir el cultivo cuando las células han sido infectadas con el prion es muy sutil y la mayoría de las veces no muestran el efecto citotóxico del prion.

Las células diana del prion son las células neuronales y diversos estudios han mostrado que la infección de neuronas primarias conducía a una muerte celular tras la propagación del prion. Sin embargo, el uso de cultivos primarios neuronales requiere

el sacrificio del animal y no es viable en especies naturalmente susceptibles a los priones como la especie humana(3). En 2006 se propuso el estudio de la propagación priónica *in vitro* en células madre neurales (NSCs). Las NSCs son capaces de diferenciarse en las células del SNC y propagar la proteína prion a partir de homogenizados de cerebro de ovino infectados, aunque la diferenciación neurogénica puede acortar los tiempos de infección. Hay estudios que demuestran el aislamiento de NSC a partir de tejido nervioso central ovino derivado del hipocampo o la zona ventricular. Aun así, el uso de las NSC se encuentra limitado debido a la inaccesibilidad de nichos celulares en el cerebro(3).

Otros tipos celulares más accesibles pueden expresar PrP^C, como las células madre hematopoyéticas y mesenquimales (MSCs), interviniendo en la proliferación y capacidad de autorenovación de éste tipo de células(3). En el caso de MSCs, la expresión de la PrP^C disminuye en función de los pasos celulares viéndose limitada su capacidad de proliferación. Diversos ensayos biológicos demostraron la propagación de diferentes cepas de proteína prion en MSCs derivadas del bazo y médula ósea de ratón. Estas MSCs eran capaces de multiplicar la cepa priónica responsable de la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, una vez adaptada a la especie murina. De esta manera, se demostró que las células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea eran capaces de multiplicar priones sin necesidad de haber sido diferenciadas previamente a células neurales(3). Esta capacidad junto con el fácil aislamiento de estas células a partir de individuos adultos las propone como buenas candidatas para el desarrollo de modelos celulares en especies naturalmente susceptibles a las enfermedades priónicas, como el ovino o el humano.

1.2 Células madre mesenquimales (MSCs)

Las MSCs son células madre adultas originadas a partir de la capa germinal del mesodermo, formado durante el desarrollo embrionario. Estas células tienen capacidad de autorenovación y diferenciación. Son células pequeñas y alargadas con morfología fibroblastoide y un gran núcleo redondo. Son células que crecen adheridas a la superficie de cultivo. Su fácil aislamiento y expansión hacen que sean unas buenas candidatas para estudios biológicos, si bien a diferencia de las células madre embrionarias, tienen una capacidad de proliferación finita *in vitro*.

La principal fuente de obtención de MSCs es la médula ósea, que además de MSCs contiene células madre hematopoyéticas(3). Las MSCs se caracterizan por ser células multipotentes con la capacidad de diferenciarse *in vitro* en las células de los tejidos especializados del linaje mesodérmico; osteocitos, condrocitos, adipocitos,

fibroblastos, miocitos y astrocitos (figura 2). Además, éstas células presentan una gran plasticidad, lo que les permite diferenciarse en células provenientes de diferentes capas embrionarias, como las células del sistema nervioso y las células hepáticas(4).

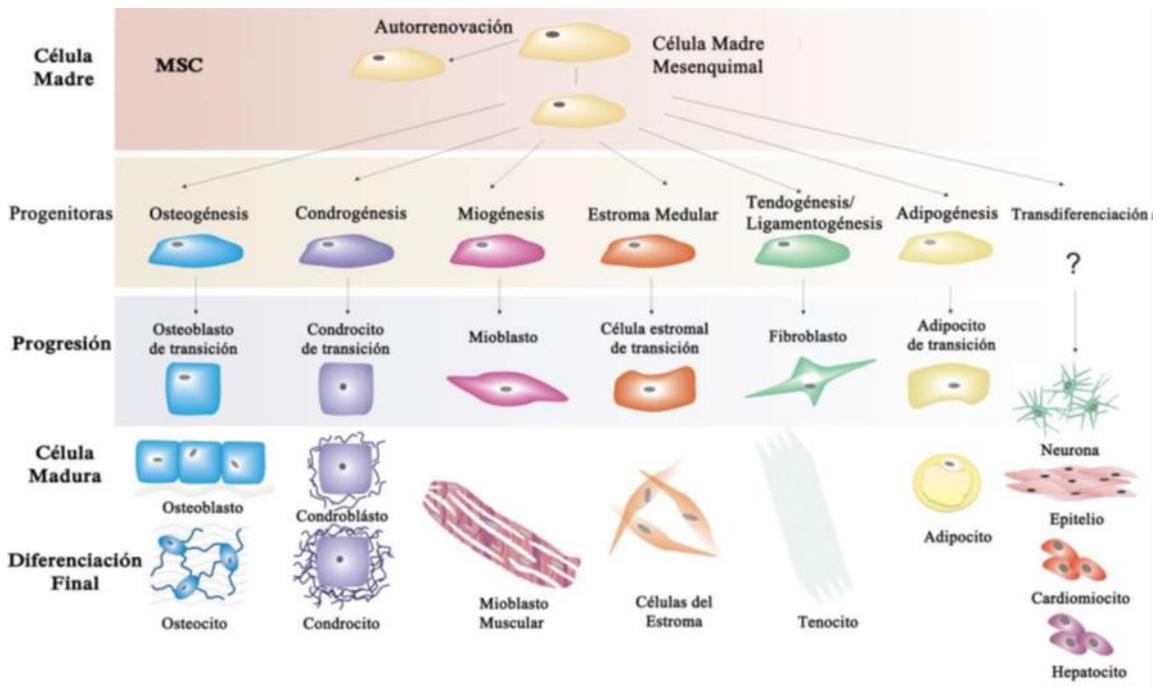


Figura 2. Potencial de diferenciación de las MSCs(4).

1.2.1 Caracterización de MSCs

Para caracterizar las MSCs es necesario estudiar una serie de parámetros relacionados con sus capacidades de proliferación, diferenciación en los linajes mesodérmicos y la expresión de marcadores de superficie. Un cultivo celular de MSCs podemos considerarlo como tal, cuando las células son capaces de proliferar en condiciones estándar adheridas al plástico de la placa, expresan marcadores de superficie específicos de MSCs como CD105 (endoglina), CD73 (5' nucleotidasa) y CD90 (Thy-1) y son capaces de diferenciarse *in vitro* en los linajes mesodérmicos osteoblasto, adipocito y condrocito(3), cuándo son expuestas a medios de cultivo de diferenciación característicos.

En cuanto a la tasa de crecimiento celular, es característica de cada especie. En la especie ovina la variabilidad de proliferación de las MSCs dificulta la estimación predictiva de MSCs que se obtendría de un determinado individuo para desarrollar un modelo de estudio(4).

El fenotipo de las MSCs en cuanto a la expresión de marcadores de superficie nos permite diferenciarlas de otros tipos celulares que podrían haber contaminado el cultivo. Por ello es importante analizar la expresión de algunos antígenos de superficie

característicos de MSCs humanas y asegurar la ausencia de otros característicos de células hematopoyéticas o endoteliales (tabla 2). Este tipo de estudios no es sencillo en especies distintas a la humana, rata y ratón por la falta de anticuerpos comerciales. Sin embargo, se están desarrollando estudios intentando establecer una correspondencia entre marcadores de la especie humana y su uso para la caracterización de MSCs ovinas(4). Se ha demostrado, por citometría de flujo, que las MSCs ovinas derivadas de médula ósea (BM-MSCs) expresan los marcadores de superficie CD29, CD73 y CD90 pero no CD105(5). Por otro lado, estas células presentan una expresión positiva para los marcadores CD29, CD36, CD73, CD90 y CD166 mediante análisis por RT-qPCR(5).

Tabla 2. Marcadores de superficie analizados en MSCs humanas(4).

Tipo de marcador	Antígeno	Detección
Endoglina	CD105	Positiva
Nucleotidasa 5' terminal	CD73	Positiva
Thy-1	CD90	Positiva
Proteína tirosina fosfatasa	CD45	Negativa
Antígeno células precursoras hematopoyéticas	CD34	Negativa
Receptor LPS/ Mac 1	CD14/CD11b	Negativa
IGα asociada/ CVID3	CD79 α /CD19	Negativa
Complejo mayor de histocompatibilidad	HLA-DR	Negativa
<u>OTRAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN</u>		
HCAM	CD44	Positiva
NCAM	CD56	Positiva
VCAM	CD106	Positiva
ALCAM	CD166	Positiva
PECAM-1	CD 31	Negativa
<u>OTRAS INTEGRINAS</u>		
VLA-α1	CD49a	Positiva
VLA-α2	CD49b	Positiva
VLA-α3	CD49c	Positiva
VLA-α4	CD49d	Negativa
VLA Subunidad β	CD29	Positiva

1.2.2 Funciones biológicas y utilidades médicas

Las MSCs tienen una serie de propiedades biológicas que las hacen interesantes para utilizarlas en terapias celulares.

La función multipotente de las MSCs las hace útiles en terapias de regeneración de tejidos. El trasplante de MSCs en pacientes con tejidos dañados demostró una mejora en la degeneración del mismo. Estudios preclínicos muestran que las MSCs trasplantadas son capaces de moverse a lo largo de los vasos sanguíneos, pasar a través de la pared endotelial y llegar a los nichos donde residen habitualmente o migrar a tejidos dañados. Esto se debe a la capacidad de migración y proliferación que tienen dichas células(6).

Las propiedades paracrinas e inmunomoduladoras permiten el uso de MSCs para la reparación de daños en el SNC producidos por la muerte neuronal que causan las enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o el Parkinson. Gracias al efecto paracrino, las MSCs son capaces de liberar factores de inhibición angiogénicos, neurogénicos, neuroprotectores, sinaptogénicos y cicatrizantes permitiendo así que puedan actuar de forma autónoma sin la necesidad de un contacto célula-célula. Estas propiedades confieren a las MSCs un efecto neuroprotector(3).

Gracias a la capacidad inmunomoduladora, las MSCs se han propuesto tanto para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como inflamatorias ya que algunas enfermedades neurodegenerativas están asociadas a respuestas inmunitarias incorrectas. Las MSCs ejercen un efecto inmunosupresor gracias a la secreción de citoquinas, lo que les permite reparar los tejidos dañados. Estas células migran hacia el lugar donde se ha producido el daño y una vez allí comienzan a secretar factores de crecimiento e inmunoreguladores ejerciendo así un efecto terapéutico sobre el lugar del daño(7). La producción de factores tróficos en las zonas cercanas al daño tisular podría optimizarse aplicando una acción paracrina dirigida a las células progenitoras residentes en el tejido o células parenquimatosas. De esta manera, se mejoraría la capacidad de las células para metabolizar, proliferar, diferenciarse y migrar, limitando así el daño adicional en el tejido(6).

1.2.4 Potencial de las MSCs en el estudio de las enfermedades priónicas

Las MSC son buenas candidatas para la creación de modelos celulares que faciliten el estudio de enfermedades neurodegenerativas, debido a su capacidad para diferenciarse en neuronas y células gliales. Además, estas células liberan una serie de factores angiogénicos con los que ejercen un efecto neuroprotector. Su potencial uso para terapia celular en enfermedades priónicas se ha evaluado en bioensayos,

mostrando la capacidad de las MSC para proteger el SNC con el trasplante de MSCs humanas en ratones infectados con priones(5).

Las MSCs ovinas además de expresar la PrP^C, son capaces de diferenciarse en células de tipo neuronal si acondicionamos el medio de crecimiento con los factores de diferenciación adecuados. Durante el proceso de diferenciación neurogénica, la expresión de la PrP^C en las MSCs aumenta, por lo que se podría facilitar la infección de dichas células para crear modelos de estudio *in vitro* de la replicación e infectividad de priones sin necesidad de un periodo de adaptación previo(3).

La línea de investigación en la que he realizado este TFG tiene por objetivo desarrollar un modelo celular ovino que permita estudiar la enfermedad del Scrapie y los mecanismos genéticos implicados en la susceptibilidad, multiplicación y respuesta a la toxicidad del prion. Este grupo ha caracterizado MSCs aisladas de médula ósea ovina (BMO) con y sin scrapie, determinando cambios fenotípicos muy sutiles(5). A diferencia de las MSCs murinas, las BMO no son capaces de multiplicar el prion a lo largo de los pases(4) sin embargo, estudios recientes del grupo han mostrado que estas células pueden multiplicar la PrP^{Sc} tras ser infectadas con una mezcla de inóculos procedente de cerebros de ovejas con scrapie portadoras de distintos genotipos para el gen *PRNP* (ARQ/ARQ, ARQ/VRQ y VRQ/VRQ). Esta multiplicación se produce pocos días después de la inoculación con scrapie y parece depender del genotipo del cultivo para *PRNP*(8). En estudios previos, se sometió a las MSCs a diferenciación hacia NSCs, estas células mostraron ligeros cambios al someterlas a condiciones de diferenciación neurogénica, pero modificaron la expresión de genes relacionados con la capacidad de multiplicar el prion(9). Una vez sometidas a la infección con scrapie, las células diferenciadas mostraron una respuesta muy similar a las MSCs en crecimiento(5).

Al ser inoculadas con una mezcla de genotipos, no se pudo diferenciar la respuesta individualizada a cada uno de ellos. En el presente trabajo nos hemos propuesto continuar estos estudios evaluando la respuesta a la infección con scrapie de las MSCs ovinas en función del genotipo del gen *PRNP* tanto del cultivo celular como del inóculo de scrapie. Para ello utilizaremos células procedentes de individuos con genotipos susceptibles a padecer la enfermedad (ARQ/ARQ, ARQ/VRQ y VRQ/VRQ) e inóculos de Scrapie con los mismos genotipos (A/A, V/V A/V).

2. HIPÓTESIS

La susceptibilidad genética del ovino a padecer la enfermedad tiene un claro componente genético, siendo las variantes genéticas en los codones 136, 154 y 171 del gen *PRNP* las que más influyen en la susceptibilidad al scrapie clásico. El uso de MSCs procedentes de individuos con distintos genotipos producirá una respuesta distinta a la infección por priones que imitará la respuesta del individuo. Dentro de los genotipos analizados, el más susceptible será VRQ/VRQ, seguido por el heterocigoto ARQ/VRQ y finalmente el homocigoto ARQ/ARQ. La susceptibilidad al prion puede venir reflejada por una mayor multiplicación del prion o por una mayor mortalidad celular tras la infección. Además, la similitud entre el genotipo del hospedador (MSCs) y del inóculo cerebral con scrapie, podría facilitar la infección celular. Además del genotipo, la diferenciación de MSCs hacia NSCs variará la susceptibilidad a ser infectadas por priones.

3. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es evaluar el potencial de MSCs ovinas portadoras de distintos genotipos para el gen *PRNP* como modelo de enfermedad priónica. De esta manera, se podrían estudiar en un futuro los mecanismos genéticos subyacentes a la multiplicación y toxicidad de los priones y la interacción genotipo del hospedador-genotipo de scrapie en la respuesta a la infección. Para ello nos proponemos alcanzar los siguientes objetivos parciales:

1. Caracterizar tres cultivos de MSCs ovinas portadoras de tres genotipos diferentes para el gen *PRNP* (ARQ/ARQ, ARQ/VRQ y VR/VRQ) estudiando la expresión de los marcadores de superficie específicos CD44, CD90, CD105, CD140 y CD166, y la capacidad de diferenciación hacia los linajes mesodérmicos.
2. Evaluar la plasticidad de las MSCs cuándo son expuestas a diferentes condiciones de diferenciación neural para la obtención de NSCs.
3. Analizar la capacidad de replicación del prion por parte de los distintos cultivos de MSCs, tanto en condiciones de crecimiento estándar como de diferenciación neurogénica, tras la infección con inóculos de scrapie procedentes de individuos con distintos genotipos para el gen *PRNP*.
4. Valorar el efecto de la infección con scrapie sobre la proliferación celular de las MSCs y NSCs en cultivo, y las posibles diferencias debidas al genotipo del hospedador o del inóculo.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Cultivos celulares

Las MSCs utilizadas habían sido aisladas previamente, por investigadores del grupo LAGENBIO, de la médula ósea de ovinos del rebaño experimental del CIEETE (Centro de Investigación en Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes). Los ovinos de los que se extrajeron las muestras, eran tres ovejas adultas sanas de Raza Aragonesa con distintos genotipos para el gen *PRNP*; Oveja 771: BM-oMSCs con genotipo homocigoto ARQ/ARQ. Oveja 857: BM-oMSCs con genotipo heterocigoto ARQ/VRQ. Oveja 807: BM-oMSCs con genotipo homocigoto altamente susceptible al Scrapie VRQ/VRQ.

Las células fueron criopreservadas en nitrógeno líquido en Pase 2 en el banco de células de LAGENBIO, en una solución con un 90% de suero fetal bovino (FBS) y un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) y, a una concentración de 1,5 millones de células/mL.

Al inicio de cada experimento, se descongelaron las células y se expandieron en frascos T175 (Frasco de cultivo celular con superficie de 175 cm²) con medio de crecimiento basal DMEM (Doulbeco's modified Eagle's medium) bajo en glucosa (Sigma-Aldrich) suplementado con 10 % FBS, 1% L-glutamina (Sigma-Aldrich) y 1% de antibióticos Streptomycin/Penicilina (Sigma-Aldrich). Las células se expandieron hasta alcanzar el 80 % de confluencia en un incubador en condiciones de humedad, 37 °C y 5% CO₂. El medio de crecimiento fue renovado cada 2-3 días. Cuando las células alcanzaron la confluencia adecuada, fueron tripsinizadas y se realizó un conteo celular de cada uno de los tres cultivos con la Cámara de Neubauer. Las células, resuspendidas en 4mL de medio basal DMEM, fueron sembradas a las densidades adecuadas para cada experimento.

Todo el trabajo realizado con las células se llevó a cabo en condiciones de esterilidad en cabina de seguridad biológica y laboratorio de bioseguridad P3.

4.2. Caracterización de células mesenquimales ovinas

4.2.1. Determinación de marcadores de superficie mediante citometría de flujo

El perfil inmunofenotípico de las células se determinó mediante citometría de flujo. Esta técnica nos permite caracterizar las células analizando la expresión de marcadores específicos, que se evalúa midiendo el porcentaje de células vivas que expresan el marcador en su superficie. La citometría de flujo se llevó a cabo en el

Servicio de Separación Celular y Citometría del Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA) del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud y para ello fue necesario el marcaje de las muestras con anticuerpos conjugados con fluorocromos.

Los anticuerpos probados para la caracterización de MSCs(10) fueron PE Mouse Anti-Human CD44 (BD Pharmingen™ Biosciences), PE Mouse Anti-Human CD166 , BB515 Mouse Anti-Human CD140a (BD Horizon™ Biosciences), PE Mouse Anti-Human CD90 (BD Pharmingen™ Biosciences) y ADC Mouse Anti-Human CD105 (ThermoFisher).

Para analizar los marcadores de superficie de las MSCs, las células fueron sembradas a 8.000 MSC/cm² en frascos T75 (Frasco de cultivo celular con superficie de 75 cm²). Las células permanecieron en expansión durante 7 días y fueron disociadas utilizando Acutasa comercial de Gibco (*StemPro Accutase Cell Dissociation Reagent*) para conservar mejor los marcadores de superficie celular. Las muestras de cada cultivo fueron resuspendidas en PBS a una concentración de 10⁶ células/mL e incubadas a temperatura ambiente durante 15 minutos con los anticuerpos específicos para el marcaje. Una vez marcadas las muestras de cada cultivo fueron analizadas en el citómetro. La reactividad de los anticuerpos fue probada para dos volúmenes de anticuerpo en cada caso. Sin bien, en los resultados, solo se muestra el análisis del volumen que dio reactividad positiva.

4.2.2. Capacidad de diferenciación hacia los linajes mesodérmicos

4.2.2.1. Diferenciación adipogénica

Para conseguir una correcta diferenciación adipogénica fue necesario probar 5 medios de diferenciación distintos. Uno de ellos comercial *StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit* (Gibco, Life Technologies), y los otros cuatro basados en medio de crecimiento basal DMEM suplementado con diferentes inductores adipogénicos: **Medio 1**, DMEM suplementado con 1 μM de dexametasona, 500 μM de IBMX, 200 μM de indometacina y 15% de suero de conejo(4); **Medio 2**, DMEM suplementado con 1 μM de dexametasona, 500 μM de IBMX, 200 μM de indometacina y 15% de suero de conejo y 10 μg/mL de insulina; **Medio 3**, DMEM suplementado con 1 μM/L dexasametasona, 0,5 mM de IBMX, 200 μM/L de indometacina y 10 mg/L de insulina(11); **Medio 4**, DMEM suplementado con 0,5 mM de IBMX, 50 μM de Indometacina y 0,5 μM de dexametasona(12).

Para los medios de diferenciación 1, 2, 3 y 4 las células fueron sembradas a 5.000 MSC/cm² en placas de 24 pocillos En el caso del medio comercial, las células fueron sembradas, tal y como indica el protocolo del fabricante, a una densidad de 10.000

células/cm² en una placa de 12 pocillos. En todos los casos, se sembraron dos pocillos de cada cultivo para la adipogénesis y un tercero como control con DMEM.

Todos los medios fueron renovados cada 3-4 días y la diferenciación se verificó mediante la tinción con Oil-Red O al 3% tras haber fijado previamente las células con formaldehído al 4%.

4.2.2.2. Diferenciación condrogénica

De cada cultivo celular se sembraron 3 pocillos en una placa de 12 pocillos. Esta diferenciación consistió en la creación de micromasas sembrando las MSC en una gota en el centro de cada pocillo siguiendo el protocolo del fabricante. El medio de diferenciación utilizado fue el medio comercial *StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit* (Gibco, Life Technologies) y la densidad de siembra fue de 80.000 células por gota. Los pocillos control fueron sembrados a las mismas condiciones con la variación de añadir medio de crecimiento basal en lugar de medio de diferenciación condrogénica.

Los medios fueron renovados cada 3-4 días y la diferenciación se verificó al cabo de 15 días mediante la tinción con Alcian Blue al 1% tras haber fijado las células previamente con formaldehído al 4%.

4.2.2.2. Diferenciación osteogénica

Las células de cada cultivo fueron sembradas a una densidad de 5.000 MSC/cm² en placas de 12 pocillos siguiendo el protocolo del fabricante. Se utilizó el medio de diferenciación comercial *StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit* (Gibco, Life Technologies). Para cada cultivo se sembró un pocillo control con medio de crecimiento basal siguiendo las mismas condiciones de siembra que para la diferenciación.

Los medios fueron renovados cada 3-4 días y la diferenciación se verificó al cabo de 17 y 21 días mediante la tinción con Alizarin Red S al 2%, habiendo fijado previamente las células con formaldehído al 4%.

4.3. Capacidad de diferenciación neurogénica

4.3.1. Condiciones de cultivo

Las células fueron sometidas a diferentes condiciones de diferenciación neurogénica. Por un lado, fueron expuestas a un medio de diferenciación de células pluripotentes hacia células madre neurales con crecimiento en monocapa y, por otro lado, fueron expuestas a un medio de diferenciación específico para obtener células progenitoras neurales en forma de neuroesferas.

Para la diferenciación hacia células madre neurales en monocapa, que denominaremos durante el trabajo como NSCs, las células fueron sembradas a 5.000 MSC/cm² con medio basal DMEM. Tras 48h de aclimatación en las que las células se habían adherido a la placa, se cambió el medio de cultivo basal por el medio de diferenciación comercial *PSC neural induction médium* (Gibco, Thermo Fisher). Los medios fueron renovados cada 2-3 días y las células fueron observadas con un microscopio invertido durante el periodo de diferenciación. Tras 9 días se tomaron fotografías de los cultivos.

Para la formación de neuroesferas, que denominaremos como MSC-NP, las células fueron sembradas a 5.000 MSC/cm² y expuestas al medio de diferenciación comercial *Neural progenitor maintenance medium* (Lonza). Este medio contiene factores de crecimiento epidérmico y fibroblastoide para la formación de progenitores neurales (MSC-NP). Los medios fueron renovados cada 3-4 días y las células fueron observadas con un microscopio invertido durante un periodo de 20 días. Finalizada la diferenciación, se tomaron fotografías donde se apreciaba el cambio en la morfología celular. A su vez, la diferenciación se estudió a tres tiempos mediante el análisis por RT-qPCR (Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real) de la expresión de genes específicos de pluripotencia y de linaje neural. Para cada cultivo, se sembraron 4 pocillos de una P6 (Placa de cultivo con 6 pocillos) por tiempo; dos control y dos con medio de diferenciación.

En ambos casos, las fotografías fueron tomadas con la cámara *Jenoptik (Optical Systems GmbH)* y visualizadas y ajustadas con el programa *ProgRes CapturePro v2.8.8*.

4.3.2. Análisis de expresión génica

4.3.2.1. Extracción de RNA total

La extracción de RNA total de los cultivos celulares se llevó a cabo utilizando el kit *Direct-zol™ RNA* (Zymo Research) y siguiendo las indicaciones del fabricante. La cantidad total de RNA extraído, así como la calidad del mismo, se analizó midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro *Nanodrop™ ND-1000* (Thermo Scientific).

4.3.2.2. RT-qPCR

El análisis de expresión génica mediante la reacción de qPCR se realizó a nivel de cDNA, por lo que fue necesario retrotranscribir las muestras de RNA obtenido. La retrotranscripción se llevó a cabo siguiendo el protocolo del kit comercial *qScript™ cDNA Supermix* (Quanta Biosciences™). Se retrotranscribieron 200 ng de RNA total

en cada muestra y el cDNA obtenido fue diluido antes de la reacción (1:5 en H₂O milliQ).

La qPCR nos permite cuantificar relativamente la expresión de los genes diana gracias al uso de genes normalizadores *housekeeping*. En este caso, se utilizaron como referencia los genes *GAPDH* y *G6PD*, cuya expresión es constitutiva.

La diferenciación de las MSC hacia MSC-NP se evaluó cuantificando la fluorescencia emitida en la reacción de qPCR gracias al uso del fluorocromo SYBGreen y de cebadores específicos para los genes diana, que habían sido diseñados previamente en el laboratorio utilizando el programa Primer3 Input (versión 0.4.0) y cuyas secuencias se muestran en el *anexo 1*

Para confirmar la diferenciación neurogénica se analizaron genes cuya expresión se ha descrito que aumenta en MSC-NP respecto a MSC, además de genes específicos del linaje mesodermal, cuya expresión disminuía en MSC-NP(13).

Genes de linaje neural: *TLR2* (toll like receptor 2), *LIF* (leukemia inhibitory factor) y *NES* (Nestin).

Genes específicos de linaje mesodermal: *ACTA2* (alpha 2 actin) y *CD90* (THY1).

La cuantificación relativa de los niveles de expresión de cada marcador se analizó en función de los valores de Ct (ciclo umbral o número de ciclos necesario para alcanzar un cierto nivel de fluorescencia en una reacción) utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (14).

4.3.3. Citometría de flujo: determinación de la Nestina

La diferenciación de MSCs hacia NSCs también se evaluó determinando la expresión del marcador neurogénico Nestina con el anticuerpo ALEXA *Nestin (Rat-401)* (Santa Cruz Biotechnology) en MSCs y NSCs y comprobando si había diferencia de expresión. El análisis se llevó a cabo en el Servicio de Separación Celular y Citometría del Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA) del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud.

Las células fueron sembradas a 4.000 MSC/cm² en T25 (Frasco de cultivo celular con superficie de 25cm²). Tras 24h, las células de uno de los T25 de cada cultivo fueron expuestas a las condiciones de diferenciación hacia NSC descritas en apartado 4.3.1. Tras 6 días de diferenciación se tripsinizaron tanto las NSCs como las MSCs y el pellet fue resuspendido en PBS a concentración de 10⁶ células/mL. Antes de realizar el marcaje con el anticuerpo, fue necesario permeabilizar ambos tipos celulares ya que la *Nestina* se trata de una proteína intracelular. La permeabilización se llevó a cabo

utilizando el kit comercial *Intracell* (Inmunostep S.L) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras el marcaje, las muestras fueron analizadas en el citómetro.

4.4. Infección con scrapie

4.4.1. Inóculos de extracto cerebral

Los cultivos celulares se infectaron con distintos inóculos de extracto cerebral proporcionados por el CIEETE. Cada inóculo consistía en un homogenizado con un 10% de tejido procedente del Sistema nervioso central de ovejas con Scrapie, disuelto en solución salina, filtrado y criopreservado a -70 °C. Al inóculo se le añadió un 0,05 % de antibiótico Espes (principios activos bactericidas: bencilpenicilina procaína y dihidroestreptomicina). Los inóculos utilizados fueron: ***Inóculo A/A***, procedente de dos ovejas de 4 y 8 años de edad con genotipo homocigoto ARQ/ARQ; ***Inóculo A/V***, procedente de dos ovejas de 3 y 7 años de edad con genotipo heterocigoto ARQ/VRQ; ***Inóculo V/V***, procedente de dos ovejas de 2.5 y 7 años de edad con genotipo homocigoto VRQ/VRQ

Para infectar las células, los inóculos al 10 % fueron diluidos en el medio de crecimiento o diferenciación correspondiente (DMEM o NSC) hasta conseguir una concentración del 1 %.

4.4.2. Tratamiento de las células

Cada cultivo celular fue resembrado a densidad de 5.000 MSC/cm² en placas P6, para la determinación de PrP^{Sc} mediante ELISA, y en placas P96, para los ensayos de viabilidad con el test MTT. Todos los experimentos se realizaron a tres tiempos:

- Tiempo 1 (T1): 48h tras la inoculación (segundo día)
- Tiempo 2 (T2): 120h tras la inoculación (quinto día)
- Tiempo 3 (T3): 192h tras la inoculación (octavo día)

Las células fueron sembradas con medio basal DMEM y una vez adheridas, tras un periodo de aclimatación de 24 h a 37 °C y 5% CO₂, el medio de crecimiento fue sustituido por el medio correspondiente para cada caso con inóculo al 1%. Pasadas 48h en las que las células habían estado en contacto con el inóculo, éste fue retirado realizando un lavado con PBS para eliminar cualquier resto de inóculo, y se cambió por el medio de cultivo correspondiente. Los medios fueron renovados cada 2-3 días hasta la finalización de los experimentos.

4.5. Ensayo de viabilidad celular: MTT

Se evaluó la toxicidad de los inóculos tras la infección mediante el estudio de la proliferación celular con un ensayo colorimétrico de MTT. Este ensayo evalúa la actividad metabólica celular de manera que nos permite comparar de forma relativa las células que han sobrevivido a la infección con Scrapie en los distintos cultivos y con los distintos inóculos.

Se utilizaron un total de 3 placas P96 (Placas de 96 pocillos) por cultivo, una placa por tiempo de estudio. En cada placa se sembraron células control con DMEM, y células control con el medio de diferenciación hacia NSCs que no fueron inoculadas, además de una columna solo con DMEM que se utilizó como blanco para la lectura de los resultados. Tras 24 h a 37 °C y 5 % de CO₂, las células fueron infectadas, cada columna con un inóculo diferente: A/A, V/V, A/V. La lectura de placas se realizó en el tiempo correspondiente indicado anteriormente (*apartado 4.4.2.*). Finalmente se midió la absorbancia a 570 nm en el lector de placas *Infinite F200* (Tecan Ibérica Instrumentación).

La normalidad de los datos se comprobó con el test de Shapiro-Wilk en una aplicación web(15). Se estimaron los porcentajes de viabilidad determinando la diferencia de proliferación entre las distintas condiciones de cultivo y las diferencias significativas entre las distintas condiciones se analizaron mediante el test estadístico t de Student con el programa Excel (Microsoft). Las gráficas se realizaron con el programa GraphPad Prisma.

4.6. Determinación de PrP^{Sc} mediante inmunoensayo ELISA

Se evaluó la capacidad de multiplicación del prion en las células de los diferentes cultivos mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas, ELISA. Esta técnica de diagnóstico está basada en el reconocimiento específico antígeno-anticuerpo, siendo en nuestro caso la PrP^{Sc} el antígeno que será reconocido por anticuerpos específicos del kit comercial *HerdChek* Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE)-Scrapie Antigen Test Kit (IDEXX)*.

Las células se sembraron en un total de 9 placas P6 por cultivo, a 3 placas por tiempo. En cada placa había tres pocillos en los que las células fueron expuestas al medio de crecimiento basal DMEM y tres pocillos en los que las células fueron sometidas a las condiciones de crecimiento diferencial NSC. Tras 24 h a 37 °C y 5 % CO₂ con medio DMEM, éste fue sustituido por el inóculo diluido al 1% en su medio correspondiente (DMEM/NSC). De las 3 placas por cultivo, cada una fue infectada con un inóculo

diferente; A/A, V/V, A/V. El inmunoensayo ELISA se realizó para cada inóculo a los 2, 5 y 8 días (T1, T2 y T3 respectivamente) tras la inoculación. Al finalizar cada tiempo, las células eran tripsinizadas y centrifugadas para obtener el pellet celular y conservarlo a -80°C.

Los niveles relativos de PrP^{Sc} bajo las diferentes condiciones de cultivo se compararon analizando los niveles de absorbancia en cada grupo. La normalidad de los resultados de la absorbancia se comprobó mediante el test de normalidad de Shapiro-Wilk en una aplicación web(15) y posteriormente fueron analizados con la versión 5.00 del programa GraphPad Prism para Windows. Para ello, se valoró la diferencia de absorbancia entre tiempos mediante el test no paramétrico 'One-Way ANOVA' y la comparación posterior entre condiciones con el test de Kruskal-Wallis.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Caracterización de las células mesenquimales ovinas

El Comité de células madre mesenquimales de la Sociedad Internacional de Terapia Celular define como MSCs aquellas células que cumplan con unos criterios mínimos: crecer adheridas al plástico en condiciones estándar de cultivo; expresar los marcadores de superficie CD105, CD73 y CD90 y no expresar los marcadores moleculares hematopoyéticos CD45, CD34, CD14, CD19 y HLA-DR; y ser capaces de diferenciarse *in vitro* en osteoblastos, adipocitos y condrocitos(16). Si bien, en los últimos años las investigaciones en este tema muestran que no todas las especies tienen que expresar los mismos marcadores de superficie. Por lo que, en función de la bibliografía consultada para la especie ovina(5,10), en este trabajo las células provenientes de médula ósea ovina, descritas en el *apartado 4.1*, han sido analizadas para determinar la expresión de los marcadores celulares de superficie CD44, CD90, CD105, CD140 y CD166 y su capacidad para diferenciarse en los linajes mesodérmicos.

5.1.1. Expresión de marcadores celulares de superficie mesenquimales

Los cultivos de BM-MSc ovinas fueron analizados mediante citometría de flujo para determinar la expresión de los marcadores celulares de superficie CD44, CD90, CD105, CD140 y CD166 utilizando anticuerpos que reconocen epítomos de marcadores de MSCs humanas y murinas debido a la inexistencia de anticuerpos específicos para ovino. Como podemos observar en la *tabla 3*, el CD105 es el marcador que mayor porcentaje de reactividad presenta en todos los cultivos,

superando el 59 % de células marcadas en el cultivo con genotipo VRQ/VRQ. En el caso del CD166, la reactividad supera el 68 % de células en el cultivo VRQ/VRQ siendo el doble de células marcadas positivas respecto a los otros dos cultivos. El marcador específico de células madre, CD90, no muestra tanta reactividad como cabría esperar, pues solo supera el 25% en las células VRQ/VRQ, sin llegar al 20% en los otros dos cultivos.

Tabla 3: Análisis de marcadores de superficie celular. Se muestran los porcentajes de células positivas para los diferentes marcadores analizados en los tres cultivos.

	ARQ/ARQ	VRQ/VRQ	ARQ/VRQ
CD44	6,68 %	8,35 %	12,61 %
CD90	15,72 %	26,96 %	19,38 %
CD105	42,98 %	59,99 %	46,10 %
CD140	22,78 %	16,54 %	9,52 %
CD166	37,62 %	68,89 %	37,87 %

A pesar de que se ha estudiado el perfil inmunofenotípico de las oMSCs bajo criterios de selección negativos utilizando CD44 como marcador positivo, aunque éste no sea un marcador específico de MSCs(12), bajo nuestras condiciones de estudio observamos una falta de inmunoreactividad para dicho marcador. Estos resultados también difieren de resultados obtenidos por otros autores en los que los marcadores CD44 y CD90 se expresan en oBM-MSCs superando el 90% de reactividad(10). CD105 es un marcador positivo para oBM-MSCs(17), tal y como podemos corroborar en nuestros resultados (tabla 3). A su vez, los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con los porcentajes variables para CD90 y CD105 obtenidos en otros estudios de caracterización de oBM-MSCs(5).

La falta de anticuerpos comerciales específicos de ovino y el limitado número de publicaciones dedicadas a la caracterización de MSCs de especie ovina(5,10,12,17), dificulta la contextualización de este trabajo. Nuestros resultados contribuyen a la creación de una batería de anticuerpos útiles para caracterizar las células en ovino. Si bien, las condiciones utilizadas por el servicio de citometría para el estudio de estos marcadores son las mismas que para la especie humana donde la reactividad puede ser mucho mejor. Con el fin de confirmar o descartar la idoneidad de estos anticuerpos para identificar estos marcadores de superficie en la especie ovina sería necesario modificar los tiempos de incubación y el número de réplicas por cultivo para intentar obtener resultados más robustos.

5.1.2. Capacidad de diferenciación hacia linajes mesodérmicos

La capacidad de diferenciación adipogénica de las MSCs de médula ósea ovina fue probada con los 5 medios de diferenciación descritos en el apartado 4.2.2.1. En los tres cultivos celulares (ARQ/ARQ, ARQ/VRQ y VRQ/VRQ) se analizó la diferenciación a adipocitos mediante la tinción de las gotas lipídicas con *Oil Red O* (figura 3). Las células sometidas a las condiciones de diferenciación con el medio comercial *StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit* (Gibco, Life Technologies) no mostraron cambios en su morfología (ver anexo 5), este medio, aunque utilizado para la diferenciación de MSCs humanas, no parece ser eficaz para las ovinas. Únicamente se observaron las células diferenciadas en los medios que habían sido elaborados en el laboratorio suplementando DMEM con diferentes inductores de crecimiento adipogénico (apartado 4.2.2.1) **Medio 1:** A día 9 se empezó a observar la formación de vacuolas en algunos de los pocillos y a día 21 cuando se realizó la tinción pudimos apreciar las gotas lipídicas características de la diferenciación adipogénica (figura 3.A-C). Este medio de diferenciación contiene factores de inducción adipogénica y en estudios anteriores había sido efectivo para la caracterización de MSCs obtenidas de ovejas con Scrapie, observando la formación de adipocitos a día 14 y 21 de la diferenciación(5), por lo que se corrobora la efectividad de dicho medio para ovino. **Medio 2:** Se trata del medio 1 suplementado con insulina. Como podemos observar en la figura 3.D-F, es el medio de diferenciación más efectivo para los tres cultivos. A día 3, se empezaron a visualizar las vacuolas de grasa de tamaño variable en los cultivos ARQ/VRQ y VRQ/VRQ. En el cultivo ARQ/ARQ la diferenciación no fue tan evidente. Tras una semana de diferenciación, las células comenzaron a entrar en apoptosis y se realizó la tinción para validar la formación de gotas lipídicas. Todos cultivos se habían diferenciado correctamente (figura 3.D-F), por lo que se evidenció la importancia de la insulina para la adipogénesis. La insulina es una hormona anabólica que favorece la acumulación de lípidos mediante la estimulación de captación de glucosa y a su vez actúa como factor de crecimiento. Esta hormona se ha utilizado en numerosas líneas celulares como modulador positivo de la adipogénesis(18,19). **Medio 3:** Al sexto día de diferenciación, parecían formarse vacuolas pero no se percibió diferencia respecto a los controles. Se realizó la tinción antes de lo previsto a causa de la apoptosis que comenzaron a sufrir las células de los cultivos ARQ/ARQ y ARQ/VRQ. En este caso, las vacuolas que se observaron al microscopio no llegaron a teñirse, pues éstas no mostraban contenido lipídico. Aunque la efectividad de ese medio de diferenciación adipogénica se había demostrado en MSC murinas procedentes de médula ósea al cabo de 12 a 20 días(20), la composición del mismo parece ser tóxica para las células de origen ovino. **Medio 4:** Las células de los cultivos ARQ/ARQ y ARQ/VRQ

empezaron a formar vacuolas tras 9 días de diferenciación. La formación de gotas lipídicas se verificó a día 21 y pudimos observar la diferenciación adipogénica en los cultivos ARQ/ARQ y ARQ/VRQ (figura 3.G-H). El cultivo VRQ/VRQ fue más resistente a la diferenciación y aunque se observaron vacuolas en los pocillos, éstas no presentaron contenido lipídico, por lo que las células no se habían diferenciado con éxito.

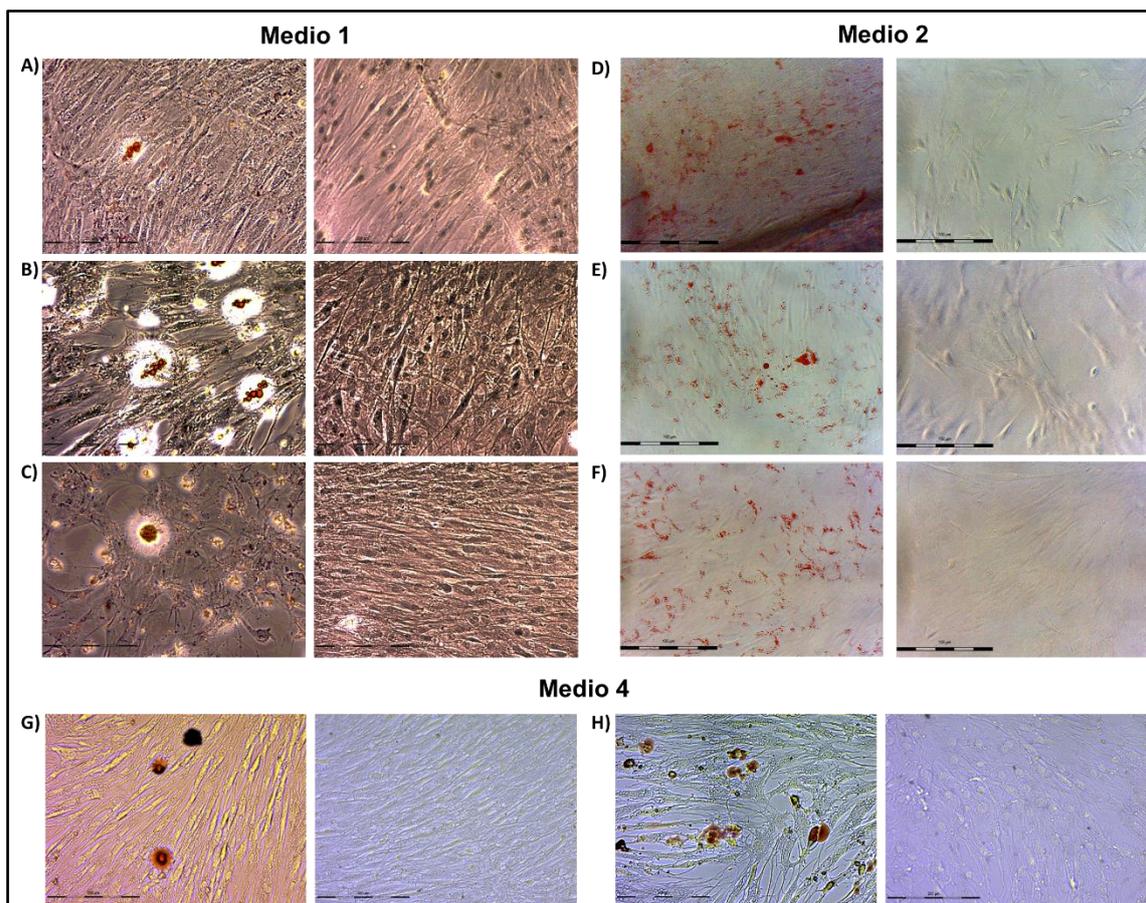


Figura 3. Adipogénesis. Diferenciación adipogénica de BM-MSC determinada mediante la tinción con Oil Red O de las gotas lipídicas. A, D y G: Diferenciación del cultivo ARQ/ARQ, a la izquierda MSCs diferenciadas y a la derecha MSCs control. B, E y H: Diferenciación del cultivo ARQ/VRQ, a la izquierda MSCs diferenciadas y a la derecha MSCs control. C y F: Diferenciación del cultivo VRQ/VRQ, a la izquierda MSCs diferenciadas y a la derecha MSCs control.

La capacidad de diferenciación condrogénica de las MSC ovinas se analizó utilizando el medio comercial *StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit* (Gibco, Life Technologies) y se evaluó mediante la tinción con Alcian Blue (figura 4). Este colorante tiñe los proteoglicanos que se forman durante la condrogénesis. Los tres cultivos fueron sembrados formando micromasas. Con el paso del tiempo, en los pocillos control las células se iban extendiendo y crecían adheridas al plástico de la capa a diferencia de los pocillos con medio de diferenciación condrogénica que se agrupaban formando grumos correspondientes a las micromasas. Tras 11 días de diferenciación

se observaron las micromasas sólidas y el proceso de diferenciación se detuvo a día 15. Estas micromasas sólidas observadas al microscopio se tiñeron de azul, lo que indica un correcto proceso de diferenciación.

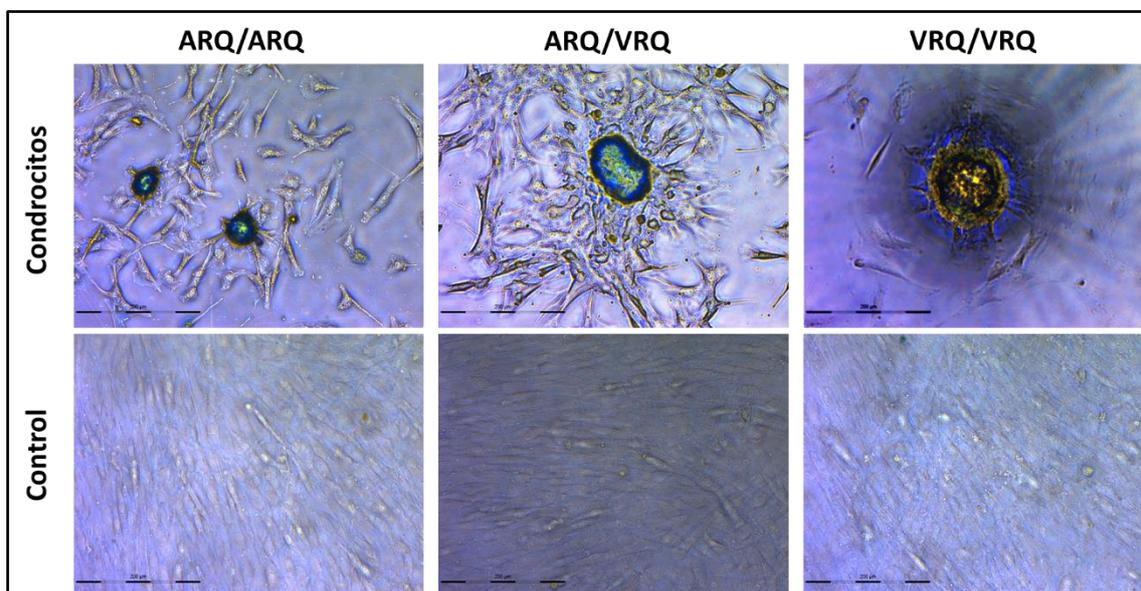


Figura 4. Condrogénesis. Diferenciación de BM-MSC en condrocitos comprobada mediante la tinción con Alcian Blue de los proteoglicanos a día 15. A: Diferenciación del cultivo ARQ/ARQ, B: Diferenciación del cultivo ARQ/VRQ y C: Diferenciación del cultivo VRQ/VRQ.

La capacidad de diferenciación osteogénica fue probada utilizando el medio comercial *StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit* (Gibco, Life Technologies) y evaluada mediante la tinción con Alizarin Red en dos experimentos. En el primero, a día 9 en las células sometidas a condiciones de diferenciación se empezaban a observar cambios en la morfología. A día 17 se decidió detener el proceso de diferenciación debido a que la elevada densidad celular en los pocillos estaba conduciendo a una apoptosis celular por falta de espacio y agotamiento de nutrientes. Las células no llegaron a teñirse. En el segundo experimento, las células fueron sembradas a menor densidad para evitar la falta de espacio y poder finalizar el proceso de diferenciación a los 21 días cómo indicaba el protocolo (*apartado 4.2.2.3*). En este caso, los primeros días de diferenciación las células se agrupaban formando unos grumos similares a los observados en la diferenciación condrogénica, y a medida que aumentaba la densidad celular de placa, las células se extendieron formando redes. A día 21 se detuvo el proceso y se verificó la diferenciación en los tres cultivos celulares mediante la tinción de los depósitos de calcio acumulados en las membranas de las células diferenciadas (figura 5).

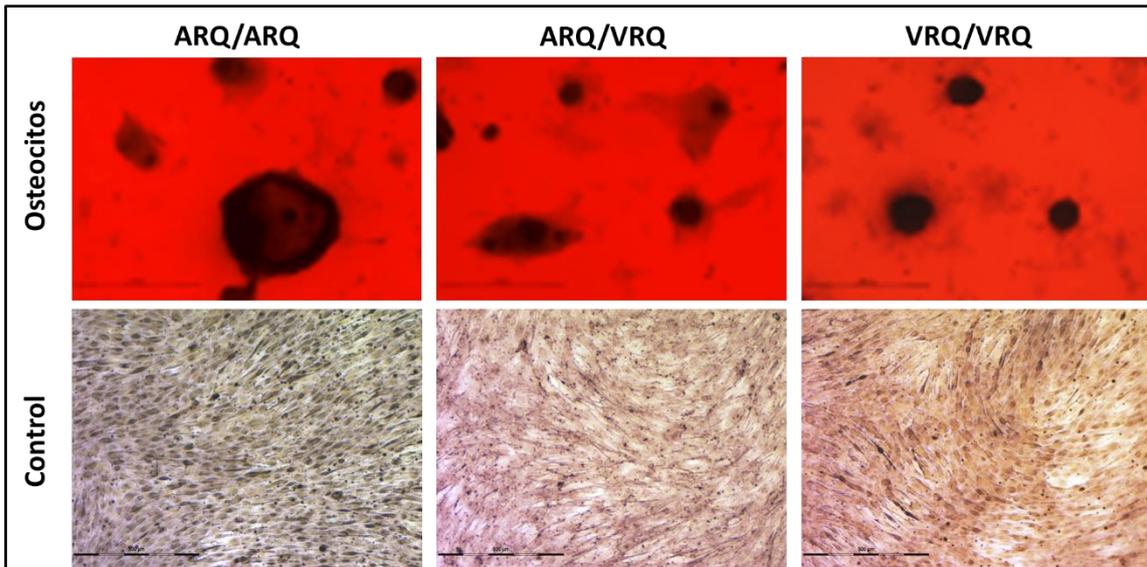


Figura 5. Osteogénesis. Diferenciación de BM-MSC en osteocitos verificada mediante la tinción con Alizarin Red de los depósitos de calcio.

5.2. Capacidad de diferenciación neurogénica

Las NSCs murinas *in vivo*(21) y cultivadas tanto en monocapa como en forma de neuroesferas son capaces de multiplicar el prion(22,23). Por este motivo, en este trabajo se ha valorado la capacidad de las MSCs ovinas para diferenciarse en células madre neurales utilizando dos protocolos distintos. El primero contempla la diferenciación de MSCs en células madre neurales con crecimiento en monocapa (NSCs) y el segundo se basa en la formación de neuroesferas (MSC-NP).

5.2.1. Análisis morfológico

Las MSCs sometidas a las diferentes condiciones de diferenciación neurogénica, fueron observadas en cultivo con el microscopio óptico. Para las NSCs, al tercer día de diferenciación se empezaron a observar ligeros cambios en la morfología celular adquiriendo una forma más alargada y ovalada respecto a las MSCs (figura 6.a). Por otra parte, las células sometidas a condiciones de diferenciación de MSC-NP empezaron a mostrar cambios en su morfología a día 14, las células se agrupaban formando grumos correspondientes a las neuroesferas. A día 21 se detuvo la diferenciación y observamos que las células presentaban una morfología diferente respecto a las MSCs, tal y como se aprecia en la *figura 6.c*.

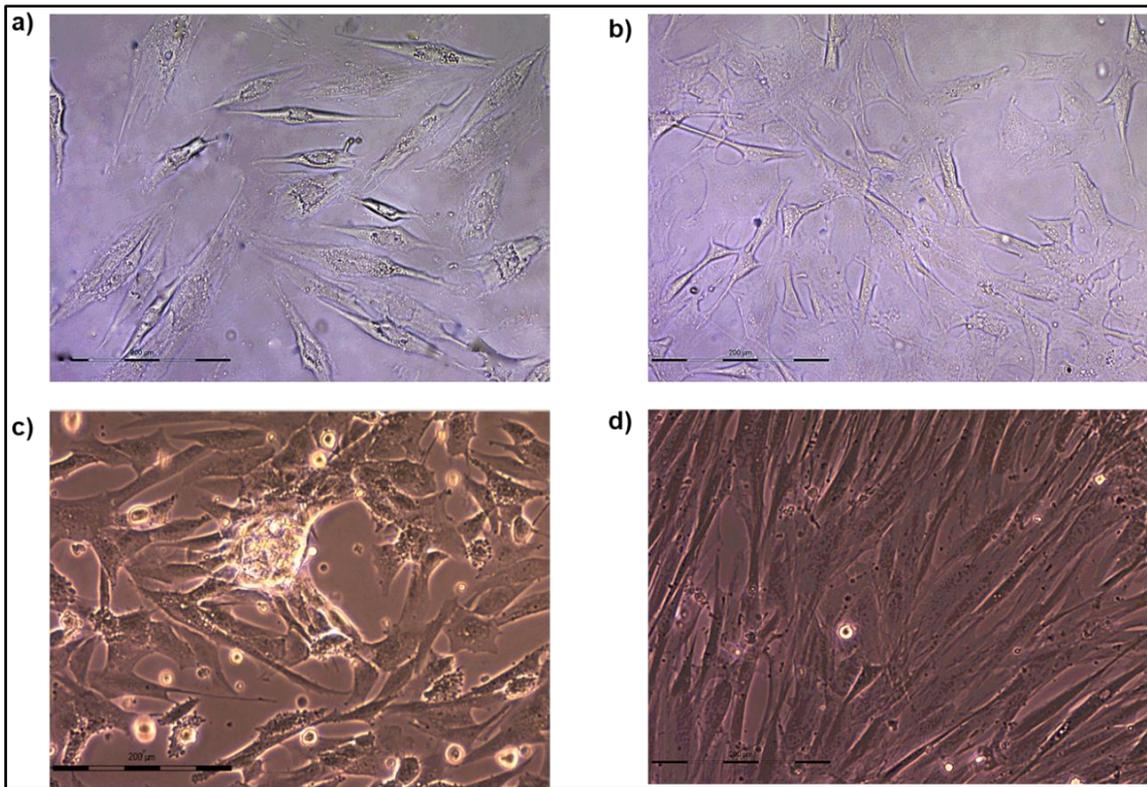


Figura 6. Diferenciación neurogénica de MSCs. a: Crecimiento en monocapa de MSCs diferenciadas a NSCs a d9, b: MSCs control d9, c: Formación de neuroesferas de MSCs diferenciadas en MSC-NP a d21, d: MSCs control d21.

5.2.2. Análisis de expresión génica

En un estudio previo y sin publicar del equipo de investigación en el que he realizado este trabajo, se había analizado la expresión génica de marcadores de pluripotencia como *OCT4* y de genes que codifican proteínas que se expresan en NSCs (*VIM*, *PAX6*, *NES* y *NGFR*)(24). En las células sometidas a diferenciación se determinó una disminución de *OCT4* y un ligero aumento de *NGFR*, la expresión del resto de marcadores no mostró cambios concluyentes sobre el grado de diferenciación celular, incluyendo la regulación negativa de *NES*.

La diferenciación de las MSC-NP se validó mediante el análisis de expresión génica por RT-qPCR de una nueva batería de marcadores. *LIF*, *NES*, y *TLR2* como marcadores de diferenciación neurogénica y *ACTA2* y *THY1* (CD90) como marcadores de linaje mesodermal(13). Por limitaciones en el tiempo, en el presente trabajo hemos evaluado únicamente esta batería en el nuevo método de diferenciación llevado a cabo por primera vez en este estudio, la diferenciación de MSCs hacia neuroesferas. Como se puede observar en la *figura 7*, la expresión de los genes específicos de linaje mesodermal (*ACTA2* y *THY1*) se vio disminuida significativamente en las neuroesferas respecto a las MSCs en todos los cultivos, esta disminución demostraría que las MSCs

sometidas a diferenciación están perdiendo las características propias de su origen mesodérmico. Para los genes específicos de linaje neural, los resultados fueron más variables. La expresión del *TLR2* aumentó de forma significativa en las células diferenciadas (MSC-NP en los tres cultivos) tal y como cabía esperar puesto que, se trata de un gen específico de linaje neural. En el caso del gen *LIF*, para el cultivo ARQ/VRQ, a diferencia de los otros dos cultivos donde se ve que la expresión de *LIF* disminuye en las MSC-NP, no se observaron cambios en la expresión del dicho gen. *LIF* es un factor de crecimiento que se utiliza como inductor de diferenciación neural(25), se ha demostrado que tiene una función similar a la de factor neurotrófico en la diferenciación neural de células murinas pudiendo favorecer la formación de neuronas y manteniendo sus características morfológicas(26). Aunque *LIF* se ha propuesto como un marcador de MSC-NP humanas, esta proteína se ha implicado en el mantenimiento del estado de pluripotencia de diversos tipos de células madre, incluidas las MSCs(27). Lo mismo ocurre con el marcador *NES*, la nestina está calificada como una proteína específica de linaje neural debido a los elevados niveles de expresión mostrados en MSC-NP(28), por lo que cabría esperar que su expresión se viera incrementada en las neuroesferas. Sin embargo, en nuestros resultados vemos que se expresa en todos los cultivos, predominando en las células control que no habían sido expuestas a condiciones de diferenciación neural. Otros estudios han demostrado la expresión del gen de la nestina en MSCs humanas no diferenciadas(24). Por tanto, estos marcadores podrían no ser muy fiables para validar la diferenciación neurogénica en MSC ovinas. Además en MSCs ovinas ya se ha observado una gran variabilidad en los niveles de expresión de marcadores neurogénicos(5). Otra posible causa de estas discrepancias podría ser el momento en el que se analiza la expresión de estos genes. Aunque en nuestro estudio las MSC-NP comenzaban a formar neuroesferas, podrían requerir más tiempo que las humanas para diferenciarse y ver la diferencia en la expresión de marcadores. Futuros estudios analizando la cinética de la expresión de éstos marcadores y prolongando el proceso de diferenciación podrían clarificar estos resultados. A pesar de estas disconformidades, el proceso de diferenciación sin duda disminuye la expresión de marcadores mesenquimales y aumenta alguno de los propuestos como neurogénicos, por lo que podríamos concluir que las células se encuentran en proceso de diferenciación.

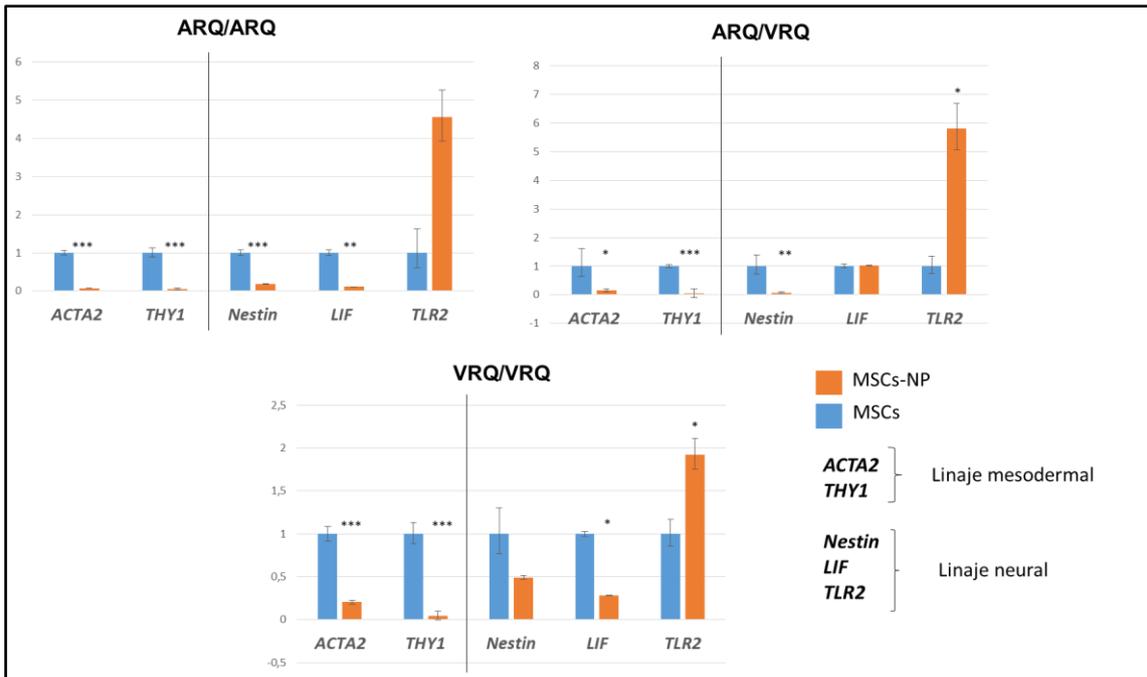


Figura 7. Expresión de genes de diferenciación neurogénica en tres cultivos celulares con distinto genotipo. Las barras naranjas muestran la cantidad relativa de cada gen, calculada por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ a partir de los datos obtenidos de la RT-qPCR, en muestras de cultivo de MSCs expuestas a condiciones de diferenciación neurogénica (MSCs-NP), respecto a la cantidad detectada en muestras de cultivo de MSCs control (MSCs, azul). La significancia estadística de los cambios observados para cada gen fue valorada respecto al control, mediante el test estadístico t de Student. * $P < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

5.2.2. Análisis del marcador intracelular Nestina

Con el fin de analizar los niveles de Nestina expresada a nivel de proteína por las células, se comparó la expresión de la misma en MSCs y NSCs mediante citometría de flujo. Los resultados mostraron un elevado porcentaje de células marcadas que expresaban la proteína de interés en las muestras de MSCs (tabla 4), lo que confirmaría la regulación negativa observada a nivel de transcritos en las MSC-NP y en el anterior estudio en NSCs llevado a cabo por el grupo(25).

Tabla 4: Análisis citometría de flujo II. La tabla muestra los porcentajes de células positivas para el marcador intracelular Nestina estudiado en MSCs diferenciadas hacia NSCs y sin diferenciar.

	ARQ/ARQ	VRQ/VRQ	ARQ/VRQ
MSCs	71,87 %	29,14 %	68,00 %
NSCs	29,33 %	8,54 %	19,05 %

La Nestina está considerada como marcador de linaje neurogénico, ya que se trata de una proteína que constituye el citoesqueleto de las células madre neurales. Sin embargo, estudios recientes han evidenciado la presencia de ésta proteína en otros tejidos, resaltando las células provenientes de médula ósea(29). La Nestina se trata de un filamento intermedio del citoesqueleto que, a diferencia de los demás componentes

del citoesqueleto, se expresan de forma específica para cada tipo celular. Este filamento intermedio, está involucrado en la capacidad de autorrenovación que poseen las células madre de los linajes neural y mesenquimatoso(29), por lo que no podemos definir que ésta proteína sea un marcador específico que confirme la diferenciación neural. Tal y como se ha comentado en el apartado anterior, futuros estudios analizando la cinética de expresión de esta proteína en MSCs en diferenciación podría clarificar estos resultados, aparentemente contradictorios con la bibliografía.

5.3. Infección con Scrapie

Investigaciones previas han descrito la capacidad de las NSCs aisladas de SNC de fetos y animales adultos para multiplicar el prion(22,23). Sin embargo, no hay referencias bibliográficas que hayan analizado esta propiedad en NSCs obtenidas *in vitro* a partir de MSCs. Un estudio previo del grupo de investigación en el que se ha realizado este trabajo había demostrado la capacidad de las MSCs diferenciadas a NSCs de multiplicar el prion cuando se infectaron con una mezcla de extractos de cerebro de ovino con scrapie obtenido de animales portadores de distintos genotipos para el gen *PRNP*. Esta multiplicación parecía depender del genotipo del cultivo(8). En el presente trabajo hemos querido continuar la evaluación del efecto genotipo tanto del inóculo como de las células infectadas. Para ello hemos analizado cualquier muestra de toxicidad que pudiera afectar a la viabilidad celular y la capacidad de las MSCs y NSCs de multiplicar el prion. El estudio se ha realizado en NSCs para comparar los resultados con las investigaciones anteriores.

Cultivo ARQ/ARQ

Una vez infectado el cultivo ARQ/ARQ de MSCs en condiciones de crecimiento con los inóculos de distintos genotipos, la mayor señal de PrP^{Sc} fue detectada en el momento de la retirada del inóculo (T1) en las células inoculadas con el extracto A/A (figura 8.a). La coincidencia entre genotipos puede suponer una mayor capacidad de adhesión. Sin embargo, esta señal disminuye progresivamente en T2 y T3, lo que es indicativo de que las células no multiplican el prion y finalmente éste quedará eliminado. La pérdida de inmunoreactividad no parece deberse tanto a la posible toxicidad del prion sino a un lavado del mismo, ya que las células inoculadas con este genotipo son las que muestran una mayor proliferación (figura 9.a). Esta alta tasa de proliferación también podría estar impidiendo la replicación del prion ya que se ha descrito que las células en división disminuyen la capacidad de multiplicación priónica(5).

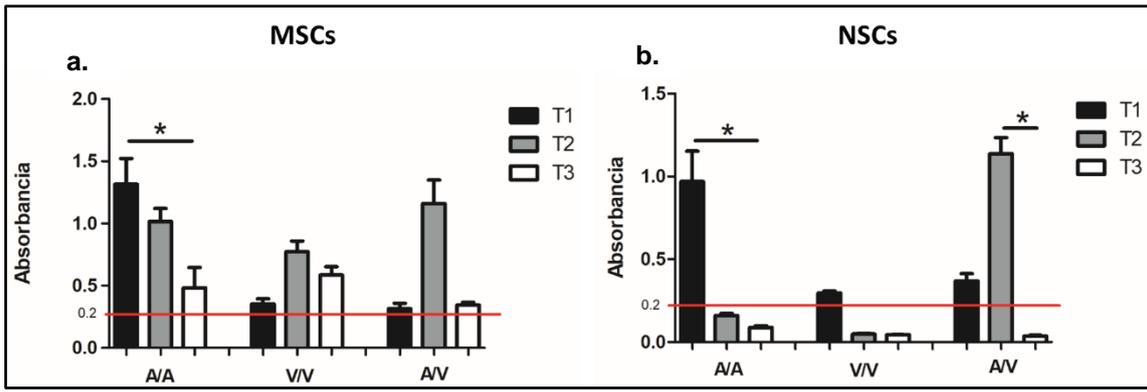


Figura 8. Análisis de detección de PrP^{Sc} mediante Inmunoensayo ELISA en el cultivo ARQ/ARQ inoculado con Scrapie. La línea roja en 0,2 representa el umbral mínimo de detección. Las barras de error representan el error estándar (n = 3). Los asteriscos muestran el nivel de significancia calculado con ANOVA mediante el test no paramétrico Kruskal-Wallis. * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001.

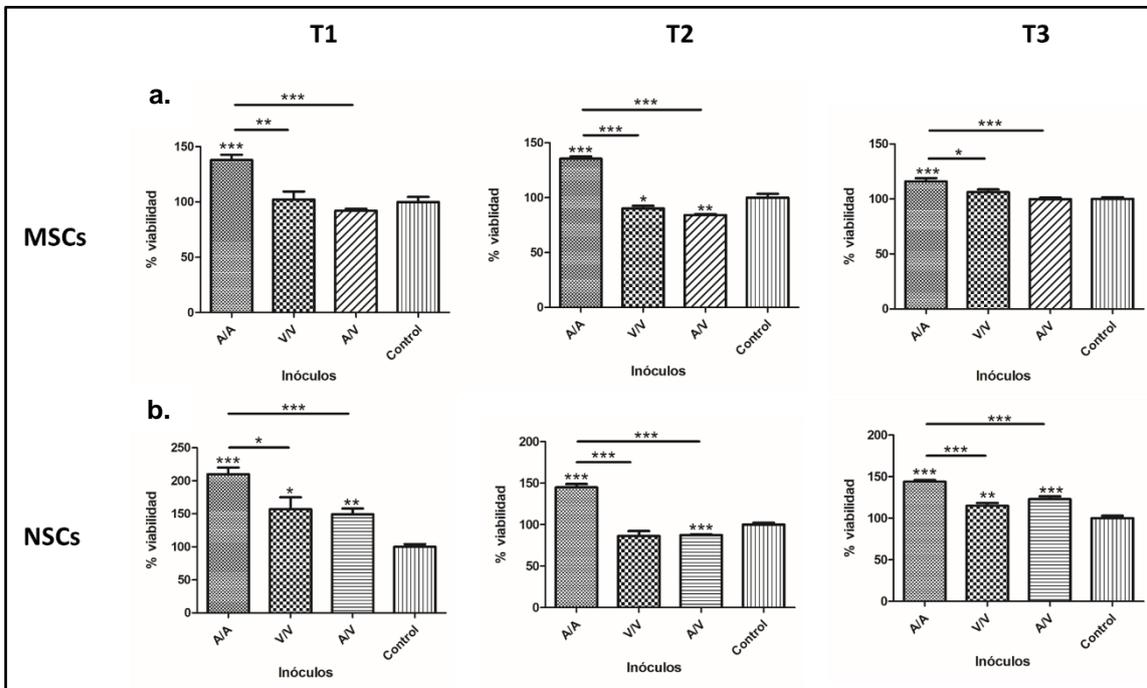


Figura 9. Proliferación celular del cultivo ARQ/ARQ tras la inoculación con Scrapie. En cada gráfica se muestra el porcentaje de viabilidad celular en las condiciones de cultivo determinadas (MSCs y NSCs) en respuesta a la infección con respecto a las muestras control no inoculadas. Las barras de error representan el error estándar (n = 8). Los asteriscos representan el grado de significancia, calculado con el test de t de Student, de cada uno respecto al control y entre ellos (sobre barra horizontal). * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001.

Por el contrario, las MSCs ARQ/ARQ parecen replicar la PrP^{Sc} de los inóculos con genotipos V/V y A/V puesto que se observa un incremento de señal de PrP^{Sc} entre T1 y T2, disminuyendo posteriormente en T3 (figura 8.a), si bien estos cambios no llegan a ser estadísticamente significativos. Este pico de presencia de proteína prion coincide con una disminución de la proliferación con respecto al control, pudiendo ser éste un signo de toxicidad (figura 9.a) o una regulación negativa del crecimiento debido a la

transformación de PrP^C en PrP^{Sc} ya que se ha descrito que la proteína prion celular tiene un papel en la regulación de la proliferación y capacidad de autorenovación de éste tipo de células(3).

En el caso de las NSCs los resultados fueron similares (figura 8.b y figura 9.b), las células infectadas con el inóculo A/A son las que presentan una mayor señal de PrP^{Sc} a T1, disminuyendo progresivamente en T2 y T3 (figura 8.b). Estos resultados reafirman la capacidad de adhesión del inóculo A/A por el cultivo con su mismo genotipo y la pérdida del mismo a lo largo del tiempo ligada a una gran tasa de proliferación (figura 9.b). Por su parte, las NSCs de este genotipo únicamente parecen multiplicar la proteína prion del inóculo A/V. Esto podría deberse a una mayor toxicidad del inóculo V/V, si bien no se refleja en una menor proliferación del cultivo.

Cultivo ARQ/VRQ

Las MSCs con genotipo ARQ/VRQ mostraron una tendencia a incrementar la señal de PrP^{Sc} en todos los cultivos infectados con scrapie a lo largo del tiempo, aunque solo se observaron cambios significativos en las células inoculadas con V/V y A/V (figura 10.a). El inóculo que presentaba una mayor señal de PrP^{Sc} en T1 seguía siendo el A/A por lo que la capacidad de captación por parte de la célula de estos priones podría deberse a otros factores distintos a la concordancia entre genotipos. Con el fin de intentar explicar este hecho, analizamos la carga priónica de cada inóculo mediante ELISA (anexo 2). Con este análisis detectamos que el inóculo AA era el que mayor inmunoreactividad mostraba para PrP^{Sc}, seguido de VV y AV, por lo que la carga priónica de los inóculos podría influir en la captación inicial por parte de las células. En este cultivo también se confirma el inóculo A/A como aquel que induce una mayor tasa de proliferación celular, lo que dificultaría la replicación del prion por parte de las células.

Las NSCs con genotipo ARQ/VRQ también revelaron resultados similares a las células sin diferenciar mostrando una tendencia a incrementar la proteína prion aquellas células inoculadas con V/V (P = 0.0940) y con A/V (P=0.0509). Las células infectadas con V/V son las que más parecen multiplicar el prion, manifestando el mayor valor de PrP^{Sc} a T3 (figura 10.b), coincidiendo una vez más con la menor tasa de proliferación (figura 11.b). Al igual que en el cultivo anterior, las células inoculadas con A/A presentaban su mayor señal de PrP^{Sc} a T1, disminuyendo progresivamente hasta T3. Este inóculo también fue el que indujo en mayor medida la proliferación celular.

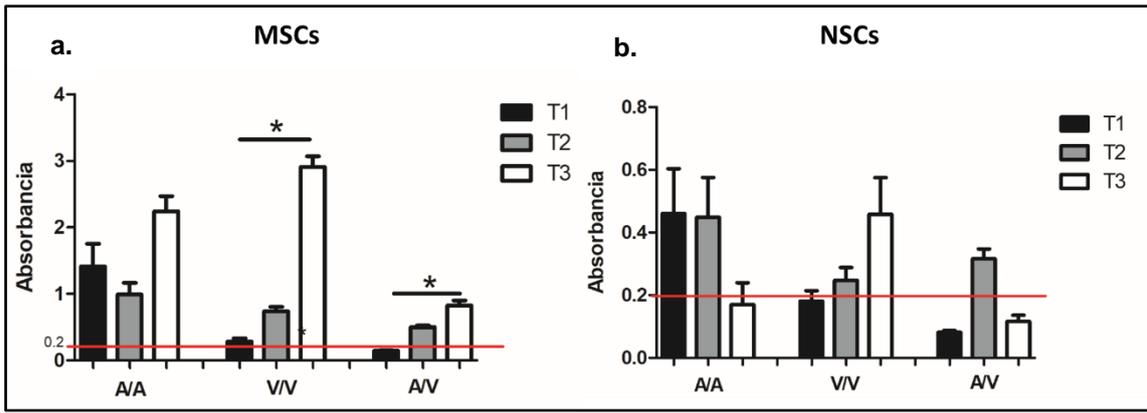


Figura 10. Análisis de detección de PrP^{Sc} mediante Inmunoensayo ELISA en el cultivo ARQ/VRQ inoculado con Scrapie. La línea roja en 0,2 representa el umbral mínimo de detección. Las barras de error representan el error estándar (n = 3). Los asteriscos muestran el nivel de significancia calculado con ANOVA mediante el test no paramétrico Kruskal-Wallis. * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001.

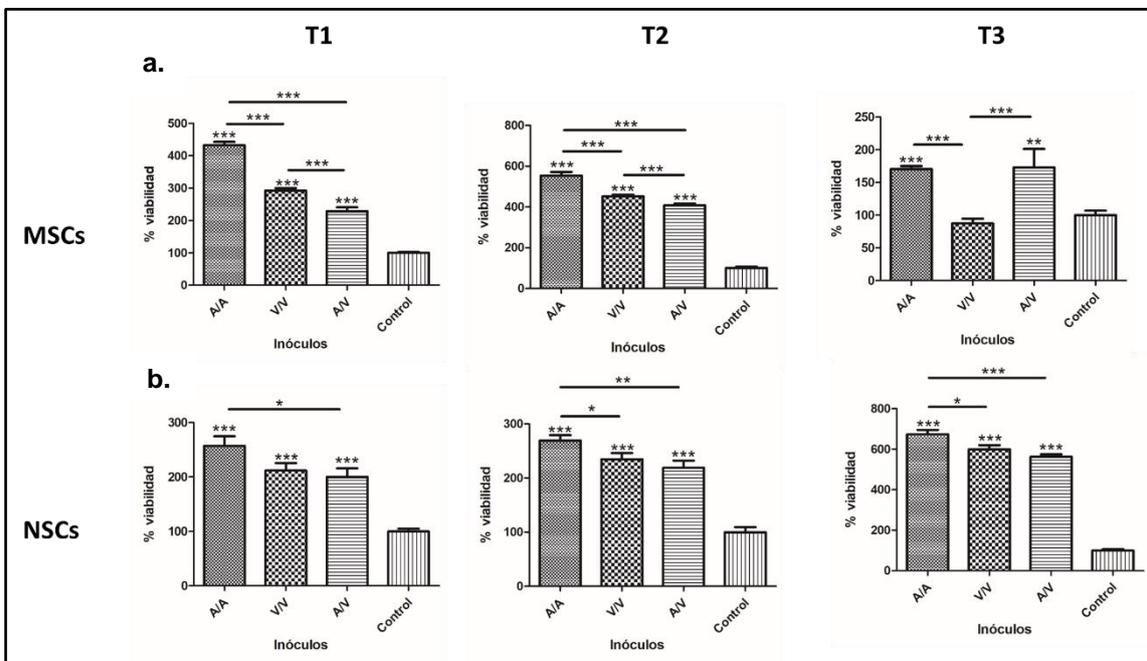


Figura 11. Proliferación celular del cultivo ARQ/VRQ tras la inoculación con Scrapie. En cada gráfica se muestra el porcentaje de viabilidad celular en las condiciones de cultivo determinadas (MSCs y NSCs) en respuesta a la infección. Las barras de error representan el error estándar (n = 8). Los asteriscos representan el grado de significancia, calculado con el test de t de Student, de cada uno respecto al control y entre ellos (sobre barras horizontales). * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001.

Cultivo VRQ/VRQ

Para el cultivo VRQ/VRQ observamos en los tres genotipos de inóculos que la señal detectada de proteína prion disminuye con el tiempo, tanto en condiciones de proliferación estándar (MSCs), como de diferenciación (NSCs) (figura 12). Este genotipo, como se ha descrito anteriormente, es el más susceptible a padecer la infección con Scrapie. La pérdida de la capacidad de multiplicación priónica podría

deberse a la toxicidad del mismo que conduce a las células a una progresiva muerte celular, especialmente en MSCs, donde se observa una disminución de la proliferación en T3 (figura 13.a). A su vez, la falta de replicación del prion podría ser consecuencia de la inducción de la proliferación ejercida por el inóculo A/A en MSCs y por el conjunto total de inóculos en NSCs.

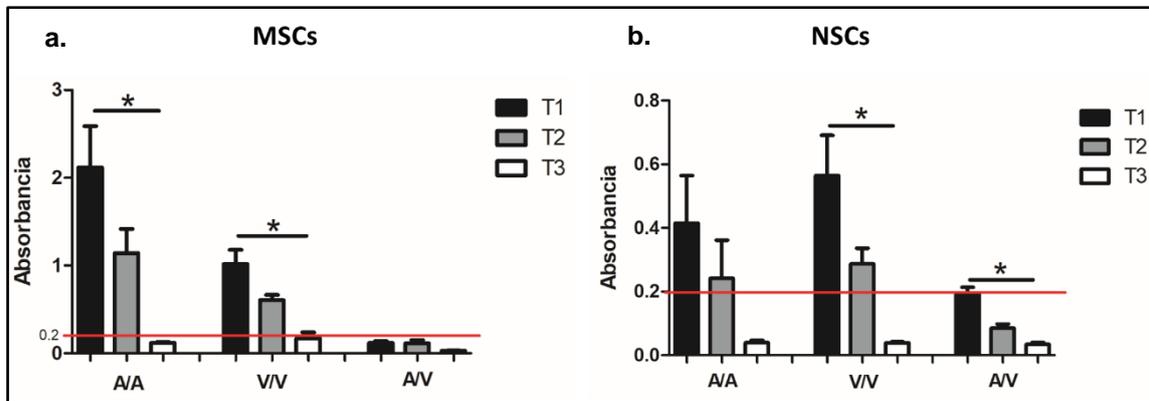


Figura 12. Análisis de detección de PrP^{Sc} mediante Inmunoensayo ELISA en el cultivo VRQ/VRQ inoculado con Scrapie. La línea roja en 0,2 representa el umbral mínimo de detección. Las barras de error representan el error estándar (n = 3). Los asteriscos muestran el nivel de significancia calculado con ANOVA mediante el test no paramétrico Kruskal-Wallis. * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001.

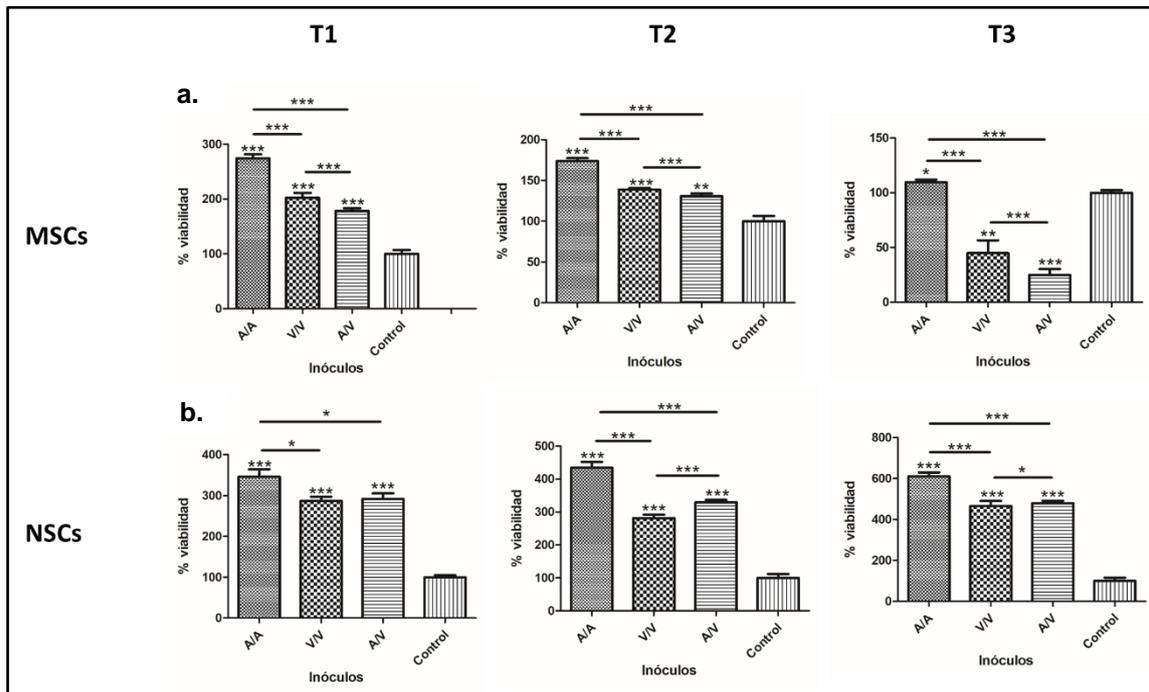


Figura 13. Proliferación celular del cultivo VRQ/VRQ tras la inoculación con Scrapie. En cada gráfica se muestra el porcentaje de viabilidad celular en las condiciones de cultivo determinadas (MSCs y NSCs) en respuesta a la infección. Las barras de error representan el error estándar (n = 8). Los asteriscos representan el grado de significancia, calculado con el test de t de Student, de cada uno respecto al control y entre ellos (sobre barras horizontales). * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001.

Por tanto, se ha visto que las MSCs con genotipo ARQ/ARQ son capaces de multiplicar la proteína prion procedente de extractos que presentan la variable más sensible al scrapie (VRQ) tanto en homocigosis como en heterocigosis (figura 8.a) Tras la multiplicación, se observa un descenso en la proliferación (figura 9.a), posiblemente relacionado con la toxicidad del prion.

El cultivo ARQ/VRQ multiplica únicamente aquellos inóculos con la variable VRQ, tanto en homocigosis como en heterocigosis aunque la multiplicación es más evidente en condiciones de crecimiento estándar (figura 10). En estos cultivos se observa además la toxicidad inducida por esta acumulación de priones.

En el caso del cultivo VRQ/VRQ, ni las MSCs ni las NSCs multiplica ninguna de las variables priónicas ya que pierden la señal progresivamente a lo largo del tiempo del cultivo (figura 12). Estas células portan el genotipo más sensible por lo que el efecto tóxico del prion sobre ellas sería mayor, especialmente sobre las MSCs donde se traduce en una pérdida de viabilidad celular (figura 13).

Tanto las MSCs como las NSCs inoculadas con A/A mostraron una proliferación superior a las células infectadas con otros genotipos. El incremento de la proliferación celular en los cultivos inoculados puede estar inducido por la exposición de las células al extracto de cerebro ovino infectado con scrapie, ya que estos homogenizados no fueron purificados y por tanto pueden contener factores tróficos. Los homogeneizados con otros genotipos podrían también contener estos factores tróficos, pero en estos casos la toxicidad del prion podría estar disminuyendo la proliferación.

Cómo ocurre en la especie murina(3), las MSCs ovinas derivadas de médula ósea son capaces de multiplicar la proteína prion en condiciones de crecimiento, si bien el prion se pierde a lo largo del tiempo, probablemente debido a la toxicidad ejercida por el mismo pues estamos trabajando con una especie naturalmente susceptible a la enfermedad. Nuestros resultados muestran diferencias debidas al genotipo por lo que este modelo celular podría ser útil para estudiar las bases moleculares de la susceptibilidad genética a padecer la enfermedad del Scrapie y de la respuesta a la toxicidad del prion.

Finalmente, con respecto a la susceptibilidad de las MSCs en condiciones de diferenciación neurogénica (NSCs), nuestros resultados no corroboran la hipótesis inicial sobre la toxicidad de la PrP^{Sc} en la que esperábamos que las NSCs, al ser células diana para la proteína prion, fueran más susceptibles a la infección que las MSCs. En cuanto a la diferenciación neurogénica, tal y como se ha discutido, aunque las células pierden características mesenquimales(8), el análisis de marcadores de

NSCs como la Nestina no ha sido concluyente. Esta falta de diferencia de respuesta podría deberse a que la diferenciación no es total aunque, hay que tener en cuenta que estamos diferenciado hacia NSCs no hacia neuronas diferenciadas y las NSCs murinas pueden multiplicar el prion durante pases sin mostrar toxicidad(21) al igual que las MSCs del mismo origen.

6. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten obtener las siguientes conclusiones:

- 1.** Las células con genotipos ARQ/ARQ, VRQ/VRQ y ARQ/VRQ utilizadas en este estudio cumplían con los requisitos mínimos para considerarse MSCs ya que fueron capaces de diferenciarse en los tres linajes mesodérmicos y expresaron algunos de los marcadores de superficie propuestos para este tipo celular.
- 2.** Las MSCs ovinas mostraron plasticidad al ser diferenciadas en células madre neurales (NSC y MSC-NP). Sin embargo, pesar de los cambios morfológicos y la disminución de marcadores mesenquimatosos, el análisis de los marcadores propuestos para la identificación de NSCs no es concluyente. Esta diferenciación requiere de más estudios en los que se sugiere, en función de los resultados obtenidos en el presente trabajo, la eliminación de la Nestina como marcador de NSCs cuándo se compara con MSCs. .
- 3.** Los cultivos se comportaron de forma diferente en cuanto a multiplicación de PrP^{Sc} y proliferación según su genotipo y el genotipo del inóculo. Se propone este modelo para futuros estudios de las bases moleculares de la susceptibilidad a scrapie y la toxicidad del prion.
- 4.** En las condiciones de nuestro estudio, la diferenciación en NSCs en monocapa no aporta beneficios para estudiar la multiplicación de proteína prion con respecto a las MSCs o bien, esta diferenciación es tan sutil que no se apreciaron diferencias. La correcta formación de neuroesferas hace que se propongan las MSCs-NP para futuros estudios de infección.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Acín Tresaco C, Badiola Díez J.J, Bolea Bailo R, Fernández de Luco D, Filali H, Garza García M.C, Luján Lerma L, Márquez Martínez M, Martín Burriel I, Monleón Moscardo E, Monzón Garcés M, Pérez Martos A, Pumarola i Batlle M RP. Encefalopatías espongiformes transmisibles. Ediciones. J.J. Badiola Díez MP i B, editor. Barcelona, Madrid: 2010; 2010. 146 p.
2. Acín Tresaco C, Martín Burriel I ZFP. Resistencia genética a las encefalopatías espongiformes transmisibles. In: J.J. Badiola Díez MP i B, editor. Encefalopatías espongiformes transmisibles. Mayo, S.A. 2010; 2010. p. 21–32.
3. Mediano DR, Ranera B, Bolea R, Martín-Burriel I. The Potential of Mesenchymal Stem Cell in Prion Research. *Zoonoses Public Heal.* 2015 May;62(3):165–78.
4. Mediano DR. Caracterización de células mesenquimales de ovino infectadas con Scrapie (Tesis doctoral). Universidad de Zaragoza; 2016.
5. Mediano DR, Sanz-rubio D, Bolea R, Marín B, Vázquez FJ, Femanha AR, López-Pérez O, Fernández-Borges N, Castilla J, Zaragoza P, Badiola J, Rodellar C M-BI. Characterization of mesenchymal stem cells in sheep naturally infected with scrapie. *Gen Virol.* 2015 Dec;96(12):3715–26.
6. Naji A, Eitoku M, Favier B, Deschaseaux F, Rouas-Freiss N, Suganuma N. Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2019.
7. Chen X, Wang S, Cao W. Mesenchymal stem cell-mediated immunomodulation in cell therapy of neurodegenerative diseases. *Cell Immunol* [Internet]. 2018;326(February 2017):8–14.
8. Hernaiz A D-EL, Gómez-Redrado S, López-Pérez O, García M, Garza M.C V, F, Zaragoza P, Badiola J.J, Bolea R, Filali H M-BI. Evaluación de células madre mesenquimales ovinas como modelos celulares in vitro de Scrapie. In AIDA Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario XVIII; 2019. p. pp 701-703.
9. Marbiah MM, Harvey A, West BT, Louzolo A, Banerjee P, Alden J, et al. Identification of a gene regulatory network associated with prion replication. *EMBO J* [Internet]. 2014 Jul 17 [cited 2019 Aug 28];33(14):1527–47.
10. Vivas D, Caminal M, Oliver-Vila I, Vives J. Derivation of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells from Ovine Bone Marrow. *Curr Protoc Stem Cell*

- Biol. 2018;44(February):2B.9.1-2B.9.22.
11. He W, Chen L, Huang Y, Xu Z, Xu W, Ding N, et al. Synergistic effects of recombinant Lentiviral-mediated BMP2 and TGF-beta3 on the osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. *Cytokine*. 2019;120:1–8.
 12. Khan MR, Chandrashekrana A, Smith R KW, Dudhia J. Immunophenotypic characterization of ovine mesenchymal stem cells. *Cytom Part A*. 2016;89(5):443–50.
 13. Harris VK, Stark J, Vyshkina T, Blackshear L, Joo G, Stefanova V, et al. Phase I Trial of Intrathecal Mesenchymal Stem Cell-derived Neural Progenitors in Progressive Multiple Sclerosis. *EBioMedicine* [Internet]. 2018;29:23–30.
 14. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* [Internet]. 2001 Dec 1;25(4):402–8.
 15. Shapiro SS, Wilk ; M B. An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples) [Internet]. Vol. 52, *Biometrika*. 1965 [cited 2019 Jul 30].
 16. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* [Internet]. 2006 Jan 1 [cited 2019 Jul 31];8(4):315–7.
 17. Lyahyai J, Mediano DR, Ranera B, Sanz A, Remacha AR, Bolea R, Zaragoza P RC, I. M. Isolation and characterization of ovine mesenchymal stem cells derived from peripheral blood. *BMC Vet Res*. 2012 Sep 22;8:169 doi: 10.1186/1746-6148-8-169.
 18. Hauner H, Entenmann G, Wabitsch M, Gaillard D, Ailhaud G NRPE. Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest*. 1989;84(5):1663–70.
 19. Villarroya Gombau Dra Marta Giralt Oms F. Diferenciación adipocitaria y factores reguladores de la biogénesis mitocondrial [Internet]. 2000.
 20. Congtao Yu, Lifen Dai, Zhaoxia Ma, Hongbin Zhao, Yong Yuan, Yunfeng Zhang, Pengfei Bao, Tanfang Su, Daiping Ma, Chang Liu, Xingfei Wu, Jinxue Liu, Yanjiao Li, Bing Wang, Min Hu. Effect of Osteoking on the osteogenic and adipogenic differentiation potential of rat bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. *BMC Complement Altern Med*. 2019 Dec 31 [cited 2019 Aug 1];19(1):36.

21. Relaño-Ginès A, Gabelle A, Hamela C, Belondrade M, Casanova D, Mourton-Gilles C, et al. Prion Replication Occurs in Endogenous Adult Neural Stem Cells and Alters Their Neuronal Fate: Involvement of Endogenous Neural Stem Cells in Prion Diseases. Mabbott NA, editor. PLoS Pathog [Internet]. 2013 Aug 1 [cited 2019 Aug 24];9(8):e1003485.
22. Milhavet O, Casanova D, Chevallier N, McKay RDG, Lehmann S. Neural Stem Cell Model for Prion Propagation. Stem Cells [Internet]. 2006 Oct 1 [cited 2019 Aug 24];24(10):2284–91.
23. Giri RK, Young R, Pitstick R, DeArmond SJ, Prusiner SB, Carlson GA. Prion infection of mouse neurospheres [Internet]. 2005 [cited 2019 Aug 24].
24. Montzka K, Lassonczyk N, Tschöke B, Neuss S, Führmann T, Franzen R, et al. Neural differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: misleading marker gene expression. BMC Neurosci [Internet]. 2009 Mar 3 [cited 2019 Aug 27];10(1):16.
25. Huat TJ, Khan AA, Pati S, Mustafa Z, Abdullah JM, Jaafar H. IGF-1 enhances cell proliferation and survival during early differentiation of mesenchymal stem cells to neural progenitor-like cells. BMC Neurosci [Internet]. 2014 Dec 22 [cited 2019 Aug 2];15(1):91.
26. Liping Xu, Jingyi Long, Chun Shi, Nianping Zhang, Ying Lv, Junda Feng, Aiguo Xuan, Xiaosong He, Qingqing Li, Yinshan Bai, Shanshan Liu, Dahong Long. Effect of leukocyte inhibitory factor on neuron differentiation from human induced pluripotent stem cell-derived neural precursor cells. Int J Mol Med [Internet]. 2018 Jan 23 [cited 2019 Aug 2];41(4):2037–49.
27. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells: Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. Arthritis Res Ther [Internet]. 2007 Feb 19 [cited 2019 Aug 30];9(1):204.
28. Harris VK, Faroqui R, Vyshkina T, Sadiq SA. Characterization of Autologous Mesenchymal Stem Cell-Derived Neural Progenitors as a Feasible Source of Stem Cells for Central Nervous System Applications in Multiple Sclerosis. Stem Cells Transl Med. 2012;1(7):536–47.
29. Bernal A, Arranz L. Nestin-expressing progenitor cells: function, identity and therapeutic implications. Cell Mol Life Sci [Internet]. 2018;75(12):2177–95.

8. AUTOEVALUACIÓN

La realización de éste trabajo en un grupo de investigación me ha permitido desarrollar en profundidad muchos de los conocimientos adquiridos durante la carrera así como técnicas las cuales había estudiado pero no había tenido la posibilidad de llevarlas a cabo.

Trabajar con cultivos celulares me ha hecho ser más paciente. Las células, en este caso ovinas, no siempre se comportan de la manera que cabe esperar y, aunque es importante tener una planificación, hay que saber tomar decisiones inmediatas y tener la capacidad de modificar la planificación inicial en función del comportamiento de las células. Las células madre son células muy sensibles y su manipulación requiere de las máximas condiciones de esterilidad, pues los medios pueden contaminarse con cualquier mínimo despiste y eso afectaría a todo el cultivo alterando los experimentos.

Por otro lado, me he enriquecido de conocimientos sobre enfermedades priónicas que desconocía. Trabajar con priones me ha permitido descubrir el mundo de las encefalopatías, especialmente ovinas.

Durante mi estancia en este grupo de investigación he aprendido la importancia de planificación cuándo se lleva a cabo un proyecto como el presentado en este trabajo, pues era necesario cumplir con los tiempos de infección de la misma manera para los tres cultivos. Para ello, antes de comenzar cada experimento era indispensable elaborar una programación y cuadrar bien los tiempos. He conocido el significado de la investigación tanto en éxito como en fracaso. Pues no siempre las cosas salen como a uno le gustaría y no por eso hay que tirar la toalla. Ha habido momentos duros, de desesperación, cuándo repites experimentos y los resultados difieren, cuándo creías que tenías una teoría sobre el comportamiento celular a la infección priónica y al corroborarla, los mismos tipos celulares se comportaban de forma distinta.

Me gustaría agradecer principalmente a Inma Martín Burriel y Adelaida Hernaiz Cortés la oportunidad de participar en uno de sus proyectos y la paciencia y dedicación por enseñarme tanto. Gracias a ellas me he iniciado en el mundo de la investigación y su confianza en mí me ha aportado seguridad en mí misma para el desarrollo de experimentos con autonomía.

En definitiva, me llevo una experiencia muy positiva y gratificante de la investigación y el grupo LAGENBIO tanto en lo profesional como en lo personal.

ANEXOS

ANEXO 1. Análisis de expresión mediante RT-qPCR

Tabla 2. Cebadores diseñados para la amplificación de los genes de interés.

Gen	Secuencia cebadores	Longitud cebador (pb)	T _m (°C)	Longitud producto (pb)
ACTA2	Fw: 5' AGGGATTCTCACGCTGAAGT3'	20	58,73	175
	Rv: 5'GGTCATTTTCTCCCGGTTGG3'	20	58,83	
LIF	Fw: 5'CTTCCCATCACCCCAGTCAA3'	20	59,30	174
	Rv: 5'GCACAGCTTGCCAGGTTG3'	19	59,34	
NESTIN	Fw: 5'CAAATCGCCCAGGTCCTG3'	18	59,9	95
	Rv: 5'GCCTCTAGGAGGGTCCTGTATGT3	23	63,5	
THY1	Fw: 5'AAGAAGTGGGTGCTCTCTGG3'	20	59,31	220
	Rv: 5'CCCCACACCTGACCAGTTTA3'	20	59,23	

ANEXO 2. Análisis mediante Inmunoensayo ELISA de la carga priónica de los inóculos utilizados para el estudio de infección con Scrapie

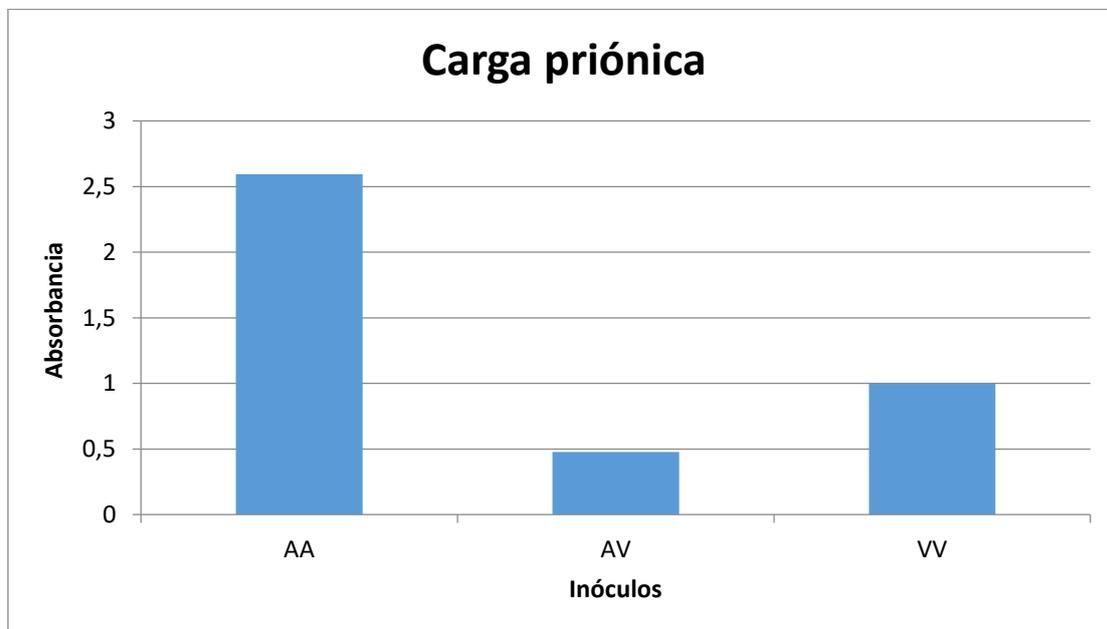


Figura 1. En la grafica se muestra la carga priónica de los inóculos en función de los valores de absorbancia hallados en el ELISA. El inóculo A/A es el que presenta más PrP^{Sc} seguido del inóculo V/V siendo el inóculo A/V el que menor carga priónica presenta.

ANEXO 3. Citometría de flujo I

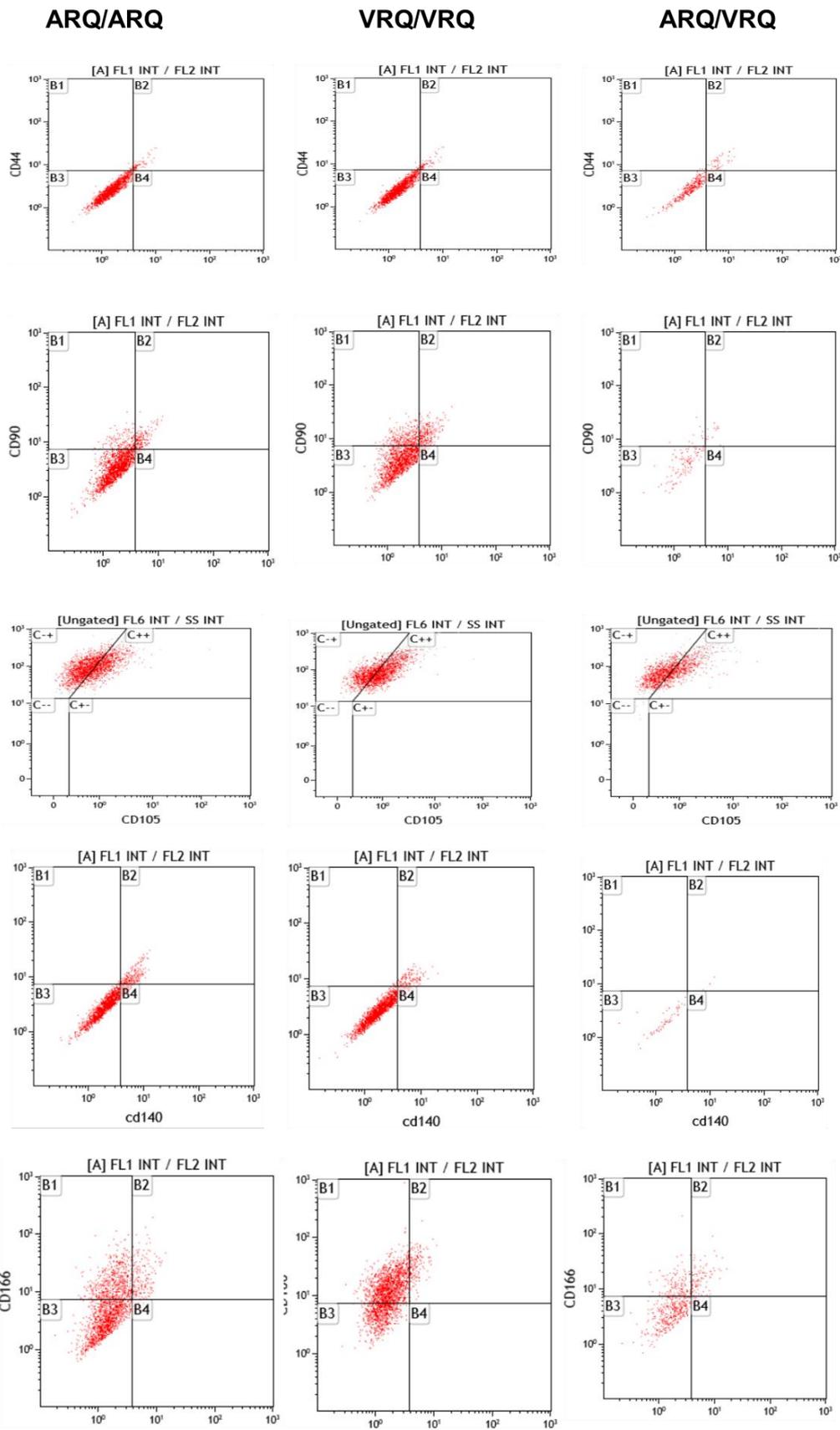


Figura 2. Representación de plots de citometría de flujo para los marcadores de superficie descritos en el Apartado 4.2.1 del presente trabajo.

ANEXO 4. Citometría de flujo II

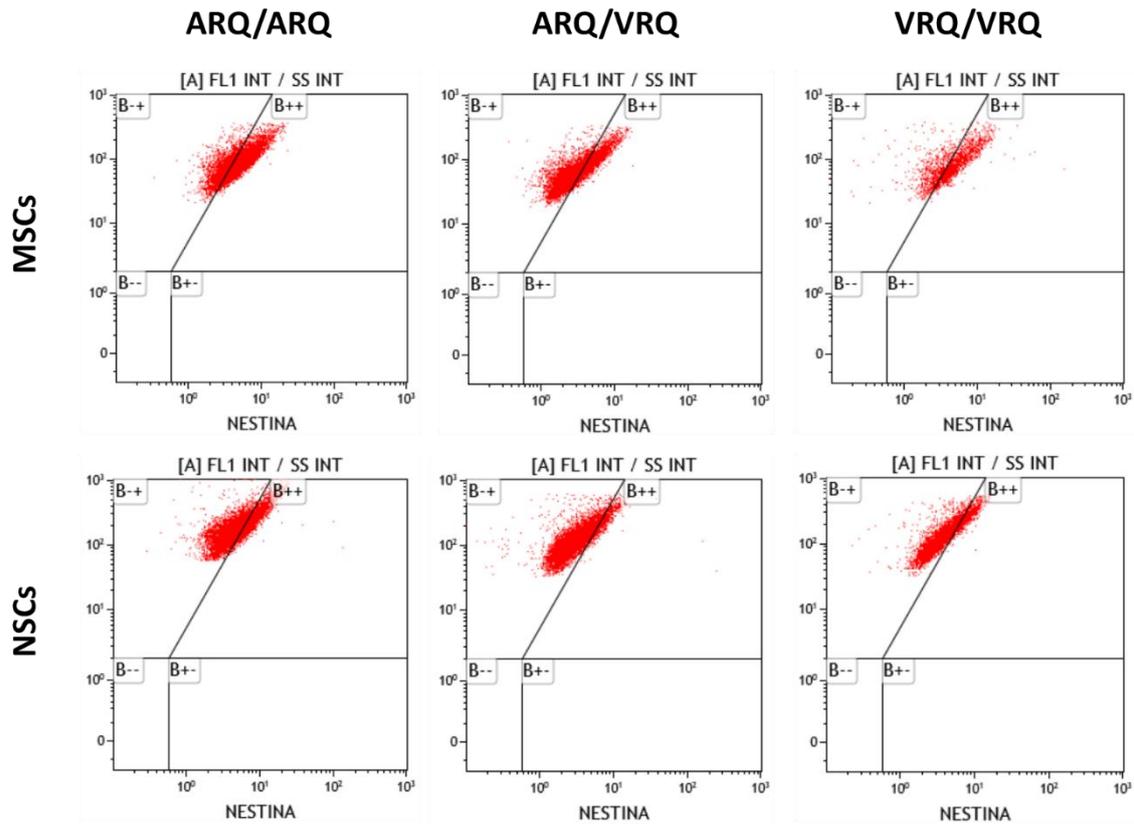


Figura 3. Representación de plots de citometría para el marcador intracelular Nestina. Arriba MSCs sin diferenciar y abajo MSCs diferenciadas.

ANEXO 5. Diferenciación adipogénica con medio comercial

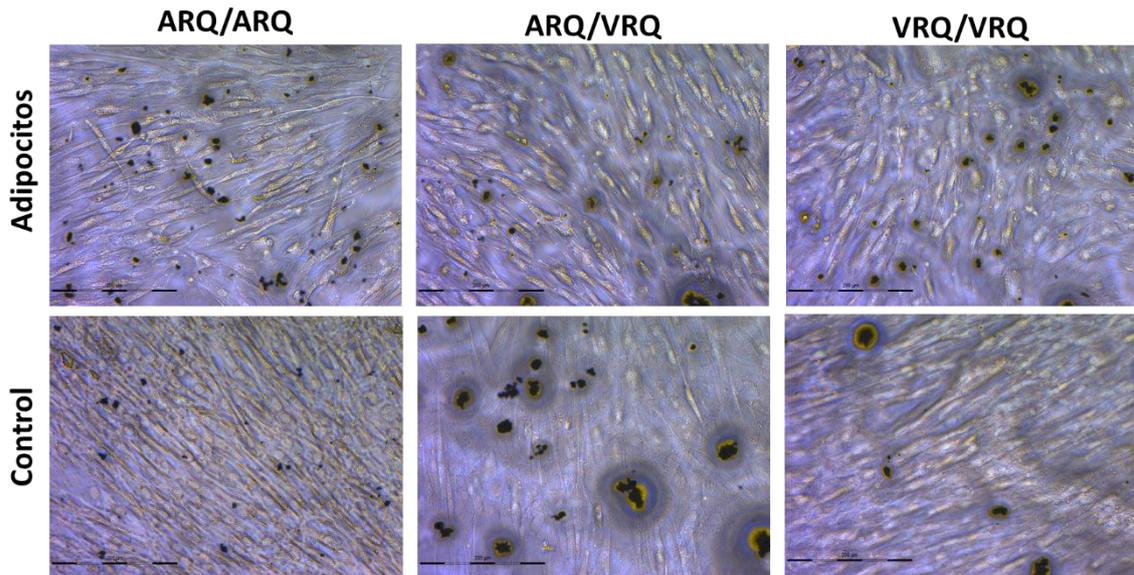


Figura 4. Adipogénesis. Diferenciación adipogénica con medio de diferenciación comercial. No se ven signos de diferenciación.