



## Efecto neuroprotector del trasplante de células mononucleares de médula ósea en un modelo experimental en rata para la enfermedad de Huntington

**ENTIDAD EJECUTORA PRINCIPAL:** Centro Internacional de Restauración Neurológica (CIREN). La Habana, Cuba

**AUTORES:** Teresa Serrano Sánchez, Esteban Alberti Amador, Lisette Blanco Lezcano, María Elena González Fraguera, Nancy Pavón Fuentes, Lourdes Lorigados Pedre, María de los Ángeles Robinson, Jorge Alberto Rosado

**Filiación de los autores:** Centro Internacional de Restauración Neurológica (CIREN). La Habana, Cuba

### RESUMEN

La presente propuesta aborda por primera vez en Cuba el estudio del trasplante de células mononucleares de médula ósea (CMMO) en un modelo experimental de la enfermedad de Huntington (EH) en ratas, con el objetivo de evaluar el posible efecto protector de las CMMO trasplantadas sobre la función cognitiva y la conducta motora, así como, los cambios morfológicos y moleculares que aparecen en el modelo. Se emplearon técnicas de cirugía estereotáctica, histoquímicas e inmunohistoquímicas, ensayo inmunoenzimático, cromatografía líquida de alta resolución, técnicas de biología molecular y estudios conductuales. La EH es un trastorno de origen hereditario con cambios en la esfera conductual, cognoscitiva y psiquiátrica. La inyección de ácido quinolínico (AQ) en el estriado ha sido utilizada como modelo experimental de la EH. El tratamiento farmacológico en estos pacientes, constituye un proceder paliativo, por lo que en la actualidad no existe una terapia efectiva que permita curar la enfermedad. Todo lo anterior justifica la necesidad de desarrollar nuevas alternativas terapéuticas que mejoren, sustituyan o refuercen la pérdida neuronal que se produce en el cerebro de estos enfermos. El Centro Internacional de Restauración Neurológica (CIREN) tiene experiencia de más de dos décadas en la reproducción del modelo experimental de EH lo cual constituye una fortaleza para evaluar desde el punto de vista preclínico una alternativa terapéutica para estos pacientes. A nivel mundial se trabaja con modelos que abordan diferentes aspectos que van desde los mecanismos productores de la enfermedad hasta la evaluación de estrategias de intervención tal como el trasplante de células madre. En nuestro estudio demostramos que la inyección de AQ en el estriado induce una pérdida neuronal que se traduce en trastornos cognitivos y motores y que las CMMO trasplantadas son capaces de sobrevivir, desarrollarse y tener un efecto positivo sobre la recuperación del tejido lesionado con AQ demostrado histológicamente así como conductual y cognitivamente. Esto se

### Palabras clave

*trasplante; células mononucleares; médula ósea; enfermedad de Huntington*

encuentra posiblemente relacionado con la capacidad del trasplante de restablecer la actividad neuroquímica y modificar la expresión génica y las concentraciones de BDNF. Por otra parte, se demostró en las células trasplantadas, la expresión de NeuN, así como de GAD, lo que sugiere la diferenciación de ellas a un fenotipo neuronal gabaérgico que sustentaría la utilidad del trasplante de CMMO como alternativa de tratamiento para los pacientes con EH.

La enfermedad de Huntington (EH) se reafirma como un problema de salud a nivel mundial. En Cuba se desconoce cuál es la frecuencia de aparición, sin embargo se sabe que en la región oriental del país hay una frecuencia notable de la EH lo que sugiere un efecto fundador que merece especial atención (1). El tratamiento de la EH se ha enfocado en varias direcciones (2), incluyendo el tratamiento etiológico, sintomático, sustitutivo, preventivo-protectores y neurorestauradores. Sin embargo, en la actualidad no existen terapias que detengan o retarden su progresión, por lo que desde hace más de dos décadas se desarrollan alternativas terapéuticas basadas en la utilización de células madre, las que se sustentan de forma importante en la disponibilidad de modelos experimentales que permitan el estudio de la factibilidad de estas células con fines terapéuticos.

Existen reportes en la literatura que demuestran la utilidad de las células madre de médula ósea (CMMO) con estos fines (3). Debido a su potencialidad para producir factores tróficos y originar diferentes tipos celulares (3, 4), estas células, podrían ser una fuente ideal para la neuroprotección y restauración celular en la EH, lo cual constituye una estrategia novedosa y aún no explorada. Por ello, el objetivo de este trabajo estuvo dirigido a evaluar tanto mecanismos al nivel molecular, como aspectos relacionados con la conducta motora y cognoscitiva de los sujetos experimentales sometidos al trasplante de CMMO.

Los datos obtenidos en este estudio aportaron desde el punto de vista teórico conocimientos sobre estos aspectos demostrando que las CMMO trasplantadas son capaces de sobrevivir, desarrollarse y tener un efecto positivo sobre la recuperación cognitiva y motora posiblemente relacionado con su capacidad de modificar la actividad neuroquímica y la expresión génica y las concentraciones de BDNF (5-7), lo que forma parte del sustrato fisiológico que subyace al efecto neuroprotector que se atribuye a estas células.

## Implementación del modelo de enfermedad de Huntington

### Modelo de lesión

Se obtuvo el modelo de enfermedad de Huntington por inyección de ácido quinolínico en el estriado, en las coordena-

das (mm) correspondientes según el Atlas de Paxinos y Watson (8), donde demostramos la pérdida parcial de neuronas en esta estructura, acompañada de una dilatación del ventrículo lateral. La coloración de cresil violeta mostró la pérdida de la imagen en parches, característica del estriado, y la detección inmunohistoquímica de la GFAP demostró abundante gliosis astrocítica cuando se comparó con el estriado sano. En este biomodelo, se realizó la evaluación del trasplante de CMMO donde el resultado satisfactorio constituyó una prueba de concepto necesaria para sustentar su posterior uso en la clínica (9).

### Células mononucleares de médula ósea de rata para el trasplante en el modelo de lesión por ácido quinolínico

Se caracterizaron inmunofenotípicamente las células mononucleares de la médula ósea (CMMO). Se mostró que las células fueron inmunopositivas para los clúster de diferenciación CD34; CD38; CD45 y CD90, y se pudo determinar el porcentaje para cada marcador de superficie celular: CD34 = 19,33 %, CD38 = 20,80 %, CD45 = 17,27 %, y CD90 = 23,52 %. Además, se estableció la concentración óptima de CMMO para el trasplante y se demostró que la concentración de 100 000 células totales fue la más adecuada para esta intervención (10).

### Establecimiento de la concentración de células mononucleares de médula ósea para el trasplante

Se evaluaron tres concentraciones, distribuidas en tres grupos (grupo I: 100 000 células totales, grupo II: 200 000 células totales, grupo III: 300 000 células totales) y se demostró que la menor concentración utilizada, era óptima para los trasplantes en el modelo de ácido quinolínico ya que se pudo apreciar una elevada supervivencia celular. Esta concentración favorece la integración y migración de las células, lo que propicia, que ellas puedan actuar de manera beneficiosa en el lugar donde fueron implantadas.

En relación con la respuesta inflamatoria que se observó en cada uno de los grupos experimentales, la menos relevante fue encontrada en el grupo I. Este resultado es congruente con la máxima migración y supervivencia celular observada en el grupo de menor concentración celular.

## Estudio de supervivencia de las células mononucleares de médula ósea

El estudio de supervivencia de las células mostró la presencia de las células trasplantadas en los diferentes tiempos analizados hasta el año posterior al trasplante. Este fue el primer reporte de supervivencia más prolongada de estas células que se ha descrito en la literatura mundial (5, 6).

## Pruebas conductuales

La conducta de giro con D-anfetamina (11) mostró en el estudio pretrasplante un incremento significativo ( $H_{(3,40)} = 24,071$ ;  $p < 0,05$ ) en el grupo de ratas de lesión con ácido quinolínico, en comparación con el grupo control sano. El estudio posterior al trasplante reveló diferencias entre los grupos experimentales ( $H_{(3,40)} = 29,011$ ;  $p < 0,05$ ). Estas diferencias respondieron a una disminución significativa en el comportamiento de esta variable en el grupo de lesión con ácido quinolínico y trasplantado con CMMO (TpCMMO) con respecto a los grupos de lesión con ácido quinolínico (LAQ) y de lesión con ácido quinolínico y trasplante con vehículo DMEM (TpD-MEM). El grupo TpCMMO mostró valores de actividad rotatoria estadísticamente similares al grupo control sano. Por otra parte, la comparación de esta variable dentro del grupo de lesión con ácido quinolínico y trasplantado con CMMO, antes y después del trasplante, reveló una disminución estadísticamente significativa en su comportamiento ( $Z_{(1,20)} = 2,803$ ;  $p < 0,05$ ) después del trasplante (5, 6).

En la prueba de las habilidades motoras de las extremidades anteriores (12) en el estudio pretrasplante se evidenció que el grupo de lesión con ácido quinolínico dejó un número significativamente mayor de alimentos residuales con respecto al grupo control sano para ambas extremidades anteriores [extremidad anterior derecha: ( $H_{(3,40)} = 24,301$ ;  $p < 0,05$ ); extremidad anterior izquierda: ( $H_{(3,40)} = 21,442$ ;  $p < 0,05$ )]. En el estudio posterior al trasplante, se mostraron diferencias significativas entre los grupos experimentales para ambas extremidades [extremidad anterior derecha: ( $H_{(3,40)} = 26,719$ ;  $p < 0,05$ ); extremidad anterior izquierda: ( $H_{(3,40)} = 26,827$ ;  $p < 0,05$ )].

Estas diferencias obedecieron a que el grupo con trasplante de CMMO dejó un número significativamente menor de alimentos residuales en la escalerilla de la caja experimental con respecto a los grupos de lesión con ácido quinolínico y trasplante con vehículo DMEM. No se apreciaron diferencias significativas entre el número de alimentos residuales dejados por el grupo de trasplante de CMMO y el grupo control sano. Por su parte, la comparación sólo dentro del grupo de ratas con lesión de ácido quinolínico y trasplante de CMMO antes y después del trasplante reveló una disminución significativa del número de alimentos residuales dejados por la

ratas después del trasplante de CMMO en ambas extremidades anteriores [Wilcoxon, extremidad anterior derecha: ( $Z_{(1,20)} = 2,665$ ;  $p < 0,05$ ); extremidad anterior izquierda: ( $Z_{(1,20)} = 2,803$ ;  $p < 0,05$ )] (5, 6).

En la prueba de la barra transversal (13) la comparación entre grupos reveló una disminución significativa de la distancia recorrida por las ratas a medida que se incrementa la dificultad de la tarea motora ( $F_{(3,167)} = 8,52$ ,  $p < 0,05$ ). El grupo de ratas sanas mostró las mayores distancias recorridas y los grupos de lesión con ácido quinolínico y trasplante con vehículo DMEM mostraron las menores distancias. El grupo de trasplante de CMMO presentó un comportamiento intermedio, sin diferir estadísticamente ni del grupo de lesión con ácido quinolínico ni del grupo sano. Por su parte la comparación entre BARRAS reveló diferencias significativas con menores distancias recorridas por las ratas en las barras con forma circular ( $F_{(3,167)} = 6,16$ ,  $p < 0,001$ ). La interacción entre ambos factores (GRUPOxBARRA), reveló diferencias significativas ( $F_{(9,167)} = 5,58$ ,  $p < 0,001$ ) entre el grupo control y los grupos lesionados en todas las condiciones excepto en la barra cuadrada grande (5, 6).

En la prueba de reconocimiento de objetos (14) el primer día se pudo apreciar una tendencia a que las ratas lesionadas emplearan menos tiempo en explorar los objetos en comparación con los controles. En el segundo día de la prueba se apreció una disminución significativa del tiempo de exploración en el grupo de lesión con ácido quinolínico ( $F_{(3,172)} = 9,9042$ ,  $p < 0,05$ ) con respecto al grupo control sano y trasplantado con CMMO. Los animales tratados con vehículo (DMEM) mostraron cierto grado de recuperación en el reconocimiento del nuevo objeto (5, 6).

En el laberinto acuático de Morris (15) durante la prueba de retención la latencia de escape mostró una disminución estadísticamente significativa ( $F_{(3,42)} = 9,1577$ ,  $p < 0,001$ ) entre el grupo lesionado con ácido quinolínico y el trasplantado con vehículo (DMEM), cuando fueron comparados con el grupo control y trasplantado con CMMO (5, 6).

## Estudios moleculares

El estudio de la expresión génica de BDNF por RT-PCR (16) demostró que en la corteza cerebral el porcentaje de expresión de *bdnf* tuvo un aumento significativo en el grupo de trasplante de CMMO con respecto a los restantes grupos ( $p \leq 0,05$ ). Por su parte en el estriado el grupo trasplantado con CMMO mostró diferencias significativas con respecto a los grupos lesionados ( $p \leq 0,05$ ), manteniendo un comportamiento estadísticamente similar al grupo control.

El estudio de las concentraciones de BDNF en la corteza cerebral y el estriado por ensayo inmunoenzimático demostró

que la lesión con ácido quinolínico, redujo significativamente las concentraciones de BDNF en ambas estructuras de interés. La inyección del vehículo DMEM no modificó de forma significativa estos valores, sin embargo, el trasplante de CMMO indujo una recuperación de los niveles de BDNF hasta ser similares al control sano y estadísticamente diferente de los grupos con lesión sin trasplante de CMMO.

Este comportamiento se apreció tanto en corteza como en estriado (6,7). Por otro lado el estudio de la actividad neuroquímica en el cerebro de los sujetos experimentales estudiados también reveló cambios, evidenciados por diferencias significativas entre los grupos en el contenido de glutamato tanto en el estriado ( $H_{(3,20)} = 16,28$   $p < 0,001$ ) como en la corteza ( $H_{(3,19)} = 15,53$   $p < 0,001$ ) y en el contenido de GABA tanto en el estriado ( $H_{(3,18)} = 12,55$ ,  $p \leq 0,005$ ) como en la corteza ( $H_{(3,15)} = 12,72$ ,  $p \leq 0,005$ ). Donde el contenido de glutamato y GABA fue más alto en el grupo de trasplante con CMMO cuando fue comparado con el grupo control en ambas estructuras (17).

## Estudios morfológicos

El estudio del marcador glial mostró una intensa reactividad para la GFAP determinado por un aumento de la gliosis astrocítica en el estriado de los grupos lesionados con ácido quinolínico y trasplantados con vehículo (DMEM) (5, 6). Es notable que estos grupos mostraran ser positivos para el fluorojade C, que marca de forma selectiva neuronas en degeneración. Las ratas lesionadas con ácido quinolínico y las trasplantadas con el vehículo DMEM mostraron evidencia de una intensa degeneración, que no fue corroborada en los sujetos sanos ni en los trasplantados con CMMO.

Por otra parte se pudo demostrar un aumento estadísticamente significativo ( $F_{(3,96)} = 49,468$ ,  $p \leq 0,05$ ); de la densidad de astrocitos en los grupos lesionados con ácido quinolínico y trasplantados con vehículo (DMEM) cuando se comparan con el grupo control sano y el grupo trasplantado con CMMO. El estudio del marcador del marcador neuronal NeuN, mostró reactividad positiva en los grupos sano y de trasplante con CMMO. En contraste, estos grupos se mostraron negativos para la coloración con Fluorojade C. Además, se evidenció un aumento estadísticamente significativo ( $F_{(3,95)} = 313,05$ ,  $p \leq 0,05$ ); de la densidad neuronal en el grupo trasplantado con CMMO cuando se compara con los grupos lesionados con ácido quinolínico y trasplantado con vehículo DMEM, manteniendo un comportamiento estadísticamente similar al grupo control sano (5, 6).

Finalmente, otro estudio reveló que el marcador de neuronas gabaérgicas (GAD), muestra reactividad positiva en el grupo control sano y el grupo de trasplante con CMMO (6). Los grupos de lesión con ácido quinolínico y el grupo tras-

plantado con vehículo DMEM no mostraron reactividad para el marcador GAD (6).

## Consideraciones finales

En esta investigación se describieron los principales resultados dirigidos a la búsqueda de una alternativa terapéutica para la EH, mediante estrategias novedosas y no empleadas hasta el momento en el modelo experimental de EH. La novedad científica del presente trabajo radica en que en este biomodelo, el resultado satisfactorio de la evaluación del trasplante de CMMO constituyó una prueba de concepto necesaria para sustentar su posterior uso en la clínica. Además el trasplante de CMMO en el estriado lesionado tuvo un efecto terapéutico beneficioso ya que se pudo comprobar una recuperación cognitiva y motora demostrada conductual e histológicamente, lo que convierte a estas células en un posible candidato terapéutico para estos enfermos.

Los resultados se incluyen en 6 publicaciones científicas (5, 6, 7, 9, 10 y 17). Han sido presentados en eventos científico-técnicos de carácter nacional e internacional, y han sido merecedores de dos premios nacionales en el Premio Anual de Salud (2014, 2017). Esta investigación ha formado parte de los resultados científico-técnico del CIREN (2016 y 2017) y ha dado lugar a certificaciones de aporte e introducción del resultado científico. Además, constituye la base de una tesis de doctorado en ciencias particulares.

## Referencias bibliográficas

1. Vázquez-Mojena Y, Laguna-Salvia L, Laffita-Mesa JM, González-Zaldivar Y, Almaguer-Mederos LE, Rodríguez-Labrada R, et al. Genetic features of Huntington disease in Cuban population: implications for phenotype, epidemiology and predictive testing. *J Neurol Sci* 2013;335(1-2):101-4.
2. Dayalu P, Albin RL. Huntington disease: pathogenesis and treatment. *Neurol Clin* 2015;33(1):101-14.
3. Han S, Wang B, Li X, Xiao Z, Han J, Zhao Y, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in three-dimensional culture promote neuronal regeneration by neurotrophic protection and immunomodulation. *J Biomed Mater Res A* 2016;104(7):1759-69.
4. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000;61(4):364-70.
5. Teresa Serrano, Paula Pierozan, Esteban Alberti, Lisette Blanco, Karelys de la Cuetara, Maria Elena Gonzalez, et al. Transplantation of mononuclear cells from bone marrow in a rat model of Huntington's disease. *Neurorestoratology* 2016;4:95-105.
6. Teresa Serrano. Tesis de Doctora en Ciencias Médicas. La Habana: Centro Internacional de Restauración Neurológica (CIREN); 2017. 136 p. Repositorio de Tesis Doctorales de Infomed. Disponible en: <http://tesis.sld.cu/index.php?P=FullRecord&ID=586>.

7. Teresa Serrano, Esteban Alberti, Lourdes Lorigados, Lisette Blanco, Ivan Diaz, Jorge Bergado. BDNF in quinolinic acid lesioned rats after bone marrow cells transplant. *Neurosci Lett* 2014 Jan 24;559:147-51. doi: 10.1016/j.neulet.2013.11.060. Epub@2013 Dec 7.:147-51.
8. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition. Access Online via Elsevier; 2006.
9. Teresa Serrano, Lisette Blanco, Esteban Alberti, Iván Díaz, Nancy Pavón, Lourdes Lorigados, María Elena González, Jorge Felipe Montero, Liliana Francis, Ivette Fernández. Establecimiento de las condiciones para el trasplante de células de médula ósea en un modelo de enfermedad de Huntington y su efecto funcional a través de la conducta motora. *Rev. Colomb. Biotecnol.* Vol. XIII (2): 107-126, 2011
10. Teresa Serrano, Esteban Alberti, Lourdes Lorigados, Ivan Diaz, Lisette Blanco, Aracelys Vallejo. Caracterización inmunofenotípica de las células de la médula ósea de ratas. *Rev Biotecnología Aplicada.* 22 (3): 234-236, 2005.
11. Ungerstedt U, Arbuthnott GW. Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res* 1970;24(3):485-93.
12. Montoya CP, Campbell-Hope LJ, Pemberton KD, Dunnett SB. The "staircase test": a measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats. *J Neurosci Methods* 1991;36(2-3):219-28.
13. Blanco Lezcano L, Lorigados Pedre L, Ferandez Verdecia CI, Serrano Sánchez T, Pavón Fuentes N, Francis Turner L. Modify Beam Transversal Test to Evaluate Hemiparkinsonian Rats. *Acta Biológica Colombiana* 2010;15(2):189-202.
14. Ennaceur A. One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. *Behav Brain Res* 2010;215(2):244-54.
15. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* 1984;11(1):47-60.
16. Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 1993;15(3):532-7.
17. Teresa Serrano Sánchez, Maria Elena Gonzalez Fragueta, Lisette Blanco Lezcano, Esteban Alberti Amador, Beatriz Caballero Fernandez, María de los Angeles Robinson Agramonte, Lourdes Lorigados Pedre, Jorge A Bergado Rosado. Rotating and Neurochemical Activity of Rats Lesioned with Quinolinic Acid and Transplanted with Bone Marrow Mononuclear Cells. *Behav. Sci.* 2018, 8, 87; doi:10.3390/bs8100087.

#### AUTOR PARA LA CORRESPONDENCIA

**Dr. C. Teresa Serrano Sánchez.** *Calle No. 1711 Bajos E/ Avenida 17 y Avenida 19. Reparto Ampliación de Almendares. CP: 11300. Correo electrónico: teresa@neuro.ciren.cu*