

*DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR I ANATOMIA PATOLÒGICA
FACULTAT DE MEDICINA
UNIVERSITAT DE BARCELONA*

*Caracterización de efectores de
diferenciación GABAérgica en células
madre como herramienta terapéutica de
enfermedades neurodegenerativas*

*Tesis presentada por Raquel Martín Ibáñez
para optar al título de doctora por la Universidad de Barcelona*

IV. Resultados

RESULTADOS

1. El tratamiento con LIF durante la formación de cuerpos embrioides bloquea la diferenciación neural

Para evaluar el efecto de LIF en la diferenciación de ESC de ratón, se induce la formación de cuerpos embrioides en presencia y ausencia de LIF durante los dos primeros días de formación. Los cuerpos embrioides se dejan crecer durante 2, 4 y 6 días y pasado este tiempo se procede a analizar por PCR cuantitativa la expresión de diferentes genes (figura 15). Inicialmente determinamos los niveles de expresión de Oct3/4, que es un marcador de células madre indiferenciadas, los cuales disminuyen significativamente a lo largo del tiempo en cultivo cuando los cuerpos embrioides son formados en ausencia de LIF (figura 15A). Sin embargo, cuando los cuerpos embrioides son tratados con LIF, los niveles de expresión de Oct3/4 únicamente disminuyen a los 6 días *in vitro* (DIV) (figura 15A), lo cual indica que las ESC presentan un mayor nivel de diferenciación cuando los cuerpos embrioides son formados en ausencia de LIF.

Con el fin de determinar si las ESC se están diferenciando hacia un fenotipo neural, examinamos los niveles de expresión de dos marcadores neurales, Sox-1 y Nestina (figura 15B y 15C, respectivamente). Nuestros resultados muestran un gran incremento en la expresión del marcador de neuroectodermo temprano Sox-1 a los 6 DIV de formación de cuerpos embrioides en ambas condiciones, con y sin LIF. Sin embargo, los niveles de expresión de la proteína de filamento intermedio Nestina, sólo incrementan en los cuerpos embrioides formados en ausencia de LIF durante 4 ó 6 DIV, mientras que no se observan cambios en los cultivos tratados con LIF (figura 15C). De manera similar, la expresión del marcador neuronal β -III-tubulina únicamente incrementa, y lo hace de forma tiempo dependiente, en ausencia de LIF (figura 15D). En ninguna de las condiciones estudiadas se observan cambios en los niveles de expresión de GFAP (figura 15E). Además y consistente con trabajos previos (Okabe y col., 1996), se detectan niveles de expresión muy bajos

del marcador de oligodendrocitos Olig-1 y no incrementa la expresión en ninguna de las condiciones de cultivo (figura 15F).

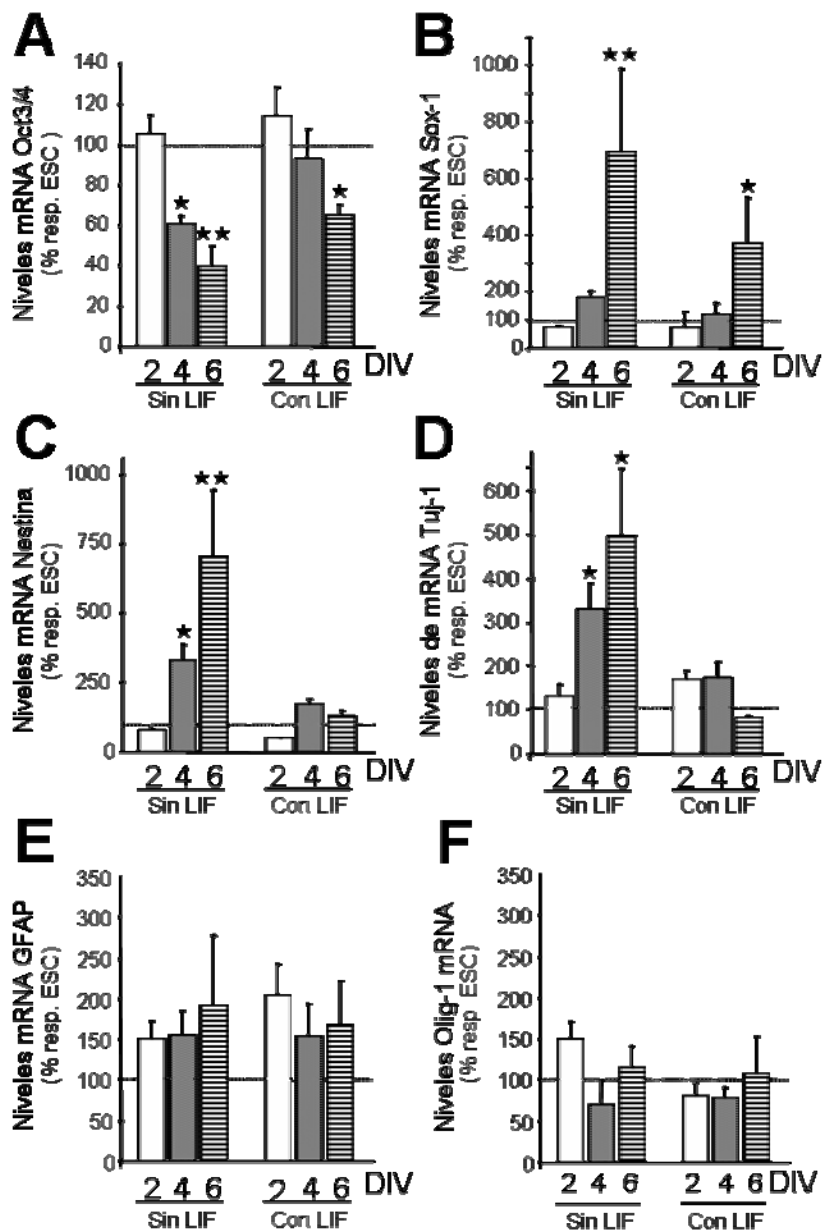


Figura 15. La ausencia de LIF durante la formación de cuerpos embrioides induce la expresión de marcadores neurales. Análisis de cuerpos embrioides formados durante 2, 4 ó 6 DIV en ausencia (sin) o presencia (con) de LIF, por PCR cuantitativa de los niveles de expresión del marcador de ESC indiferenciadas Oct3/4 (A), el marcador de neuroectodermo temprano Sox-1 (B), el marcador de precursores neurales Nestina (C), el marcador neuronal β -III-tubulina (Tuj-1; D), el marcador astrogial GFAP (E) y el marcador de oligodendrocitos Olig1 (F). Los resultados se expresan como la media de como mínimo tres experimentos independientes. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM, del inglés *standard error of the mean*). El análisis estadístico se ha realizado mediante ANOVA seguida del test *post-hoc* de *Bonferroni*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ relativo a las ESC no diferenciadas consideradas el 100%.

2. **El ácido retinoico induce la diferenciación neuronal en ausencia de LIF durante la formación de cuerpos embrioides.**

Para estudiar la relación entre LIF y ácido retinoico en la diferenciación neuronal de ESC de ratón, se induce la formación de cuerpos embrioides en presencia y ausencia de LIF durante los dos primeros días de formación y a continuación se cambia el medio por uno libre de LIF que contiene diferentes concentraciones de ácido retinoico (10^{-9} M, 10^{-8} M y 10^{-6} M). En la condición control, los cuerpos embrioides se forman sin añadir ácido retinoico al medio de cultivo. Dos o cuatro días después de la administración de ácido retinoico (a los cuales nos referimos como 4 y 6 DIV, respectivamente), los cuerpos embrioides son procesados para analizar la expresión de diferentes marcadores por PCR cuantitativa (figura 16). Los resultados muestran que el tratamiento con ácido retinoico induce una mayor diferenciación en las ESC que la que observamos en la condición control, ya que los niveles de Oct3/4 están fuertemente disminuidos tanto en presencia como en ausencia de LIF y además, la disminución es dosis dependiente (figura 16 A, B). A los 4 DIV de formación de los cuerpos embrioides, a pesar de que la concentración más pequeña de ácido retinoico ensayada (10^{-9} M) no muestra ningún efecto, las dos dosis mayores (10^{-8} M y 10^{-6} M) producen una reducción dosis dependiente significativa de los niveles de Oct3/4 bajo ambas condiciones (figura 16B). Sin embargo a los 6 DIV de formación de los cuerpos embrioides, la concentración más pequeña de ácido retinoico también induce una reducción de los niveles de expresión de Oct3/4 (figura 16B). Para determinar si el efecto producido por el ácido retinoico sobre los niveles de expresión de Oct3/4 ocurre no sólo a nivel del mRNA sino también a nivel de la proteína, se analizan los niveles proteicos de este factor de transcripción a los 6 DIV de formación de los cuerpos embrioides por la técnica de western blot (figura 17 A, B). Se observa el mismo efecto dosis-dependiente del ácido retinoico en la reducción de los niveles proteicos de Oct3/4.

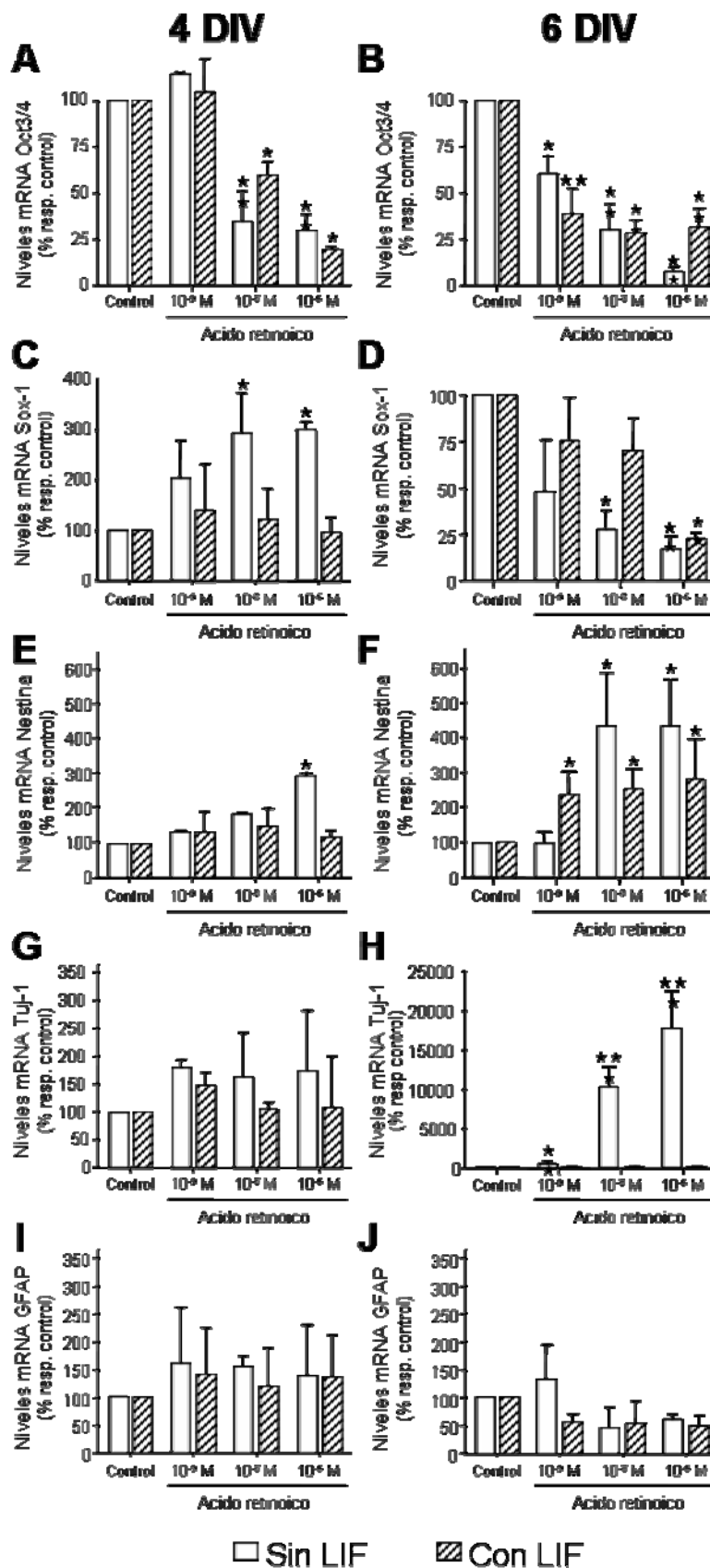


Figura 16. La diferenciación neuronal inducida por ácido retinoico es bloqueada en presencia de LIF. Cuerpos embrioides formados en ausencia o presencia de LIF (sin o con LIF, respectivamente) durante los dos primeros días, y secuencialmente tratados con varias concentraciones de ácido retinoico (0, 10⁻⁹, 10⁻⁸ y 10⁻⁶ M) se dejan crecer durante 4 (A, C, E, G, I) ó 6 DIV (B, D, F, H, J) y se analizan por PCR cuantitativa los niveles de expresión del marcador de ESC indiferenciadas Oct3/4 (A, B), el marcador de neuroectodermo temprano Sox-1 (C, D), el marcador de precursores neurales Nestina (E, F), el marcador neuronal β -III-Tubulina (Tuj-1; G, H) y el marcador astrogial GFAP (I, J). Los resultados se expresan como la media de cómo mínimo 3 experimentos independientes. Las barras de error = SEM. *p<0.05, **p<0.005 y ***p<0.001 relativo a la condición control no tratada con ácido retinoico considerada el 100%.

Teniendo en cuenta que el ácido retinoico es un potente factor neurogénico, a continuación se analizan los niveles de expresión de dos marcadores neurales: Sox-1 y Nestina (figura 16 C-F). A los 4 DIV de formación de los cuerpos embrioides, los niveles de expresión de Sox-1 incrementan cuando éstos han sido tratados con 10^{-8} M y 10^{-6} M de ácido retinoico en ausencia de LIF y este efecto se bloquea por completo cuando los cuerpos embrioides se han formado en presencia de LIF (figura 16C). Por el contrario, el tratamiento extendido con ácido retinoico (6 DIV de formación de cuerpos embrioides) induce una reducción dosis dependiente de los niveles de expresión de Sox-1 (figura 16D), sugiriendo una mayor diferenciación neural tras el tratamiento prolongado con ácido retinoico (6 DIV de formación de cuerpos embrioides). De acuerdo con esta hipótesis, los niveles de expresión de Nestina, que aparecen más tarde que Sox-1 durante el desarrollo, incrementan significativamente en las muestras de 4 DIV (figura 16E) tratadas con la concentración más alta de ácido retinoico (10^{-6} M) y en los cuerpos embrioides formados durante 6 DIV para las concentraciones 10^{-6} y 10^{-8} M en ausencia de LIF (figura 16F). Además, los niveles de mRNA de Nestina son superiores a los 6 DIV de formación de cuerpos embrioides que a los 4 DIV. En presencia de LIF no se observan cambios en los niveles de expresión de Nestina a los 4 DIV (figura 16E), mientras que un pequeño incremento se produce a los 6 DIV de formación de cuerpos embrioides (figura 16F).

Con el fin de determinar si la elevada expresión del marcador de precursores neurales Nestina va acompañada de una diferenciación neuronal, se analizan también los niveles de expresión del marcador neuronal β -III-tubulina (figura 16G, H). A pesar de que no se observa ningún efecto a los 4 DIV de formación de los cuerpos embrioides en ninguna de las condiciones estudiadas (figura 16G), en aquellos formados durante 6 DIV se produce un incremento significativo en los niveles de expresión de β -III-tubulina tras el tratamiento con las dos concentraciones mayores de ácido retinoico (10^{-6} y 10^{-8} M) en ausencia de LIF. La concentración menor (10^{-9} M) de ácido retinoico produce un incremento menor, pero significativo en los niveles de expresión de

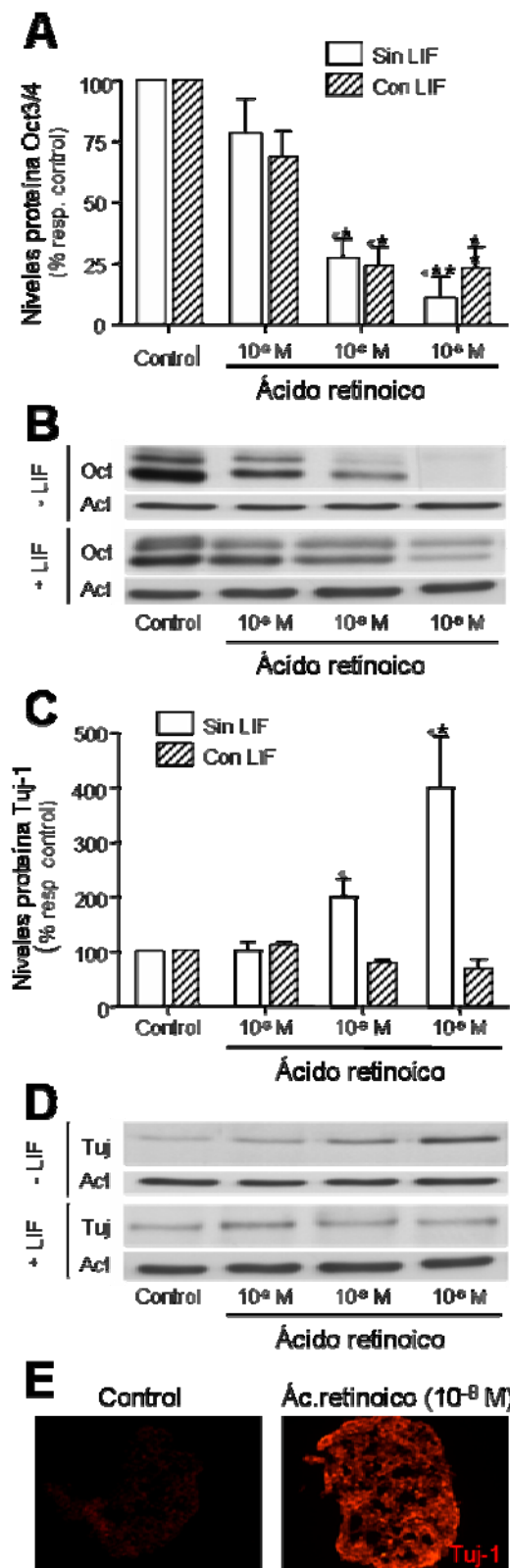


Figura 17. El tratamiento de cuerpos embrioides con ácido retinoico incrementa los niveles proteicos del marcador neuronal β -III-tubulina en ausencia de LIF. Cuerpos embrioides formados en presencia (con LIF; +LIF) o en ausencia (sin LIF; - LIF) durante los dos primeros días y a continuación tratados con varias concentraciones de ácido retinoico (0, 10⁻⁹, 10⁻⁸ y 10⁻⁶ M) durante cuatro días más (6 DIV) son analizados por western blot con anticuerpos contra Oct3/4 (Oct; A, B) y β -III-tubulina (Tuj-1; C, D). A, C: Las barras de los gráficos representan la media de los niveles proteicos de Oct3/4 y β -III-tubulina respecto al control de carga (actina; Act). B, D: Western blots representativos de cada experimento. Los resultados son expresados como el porcentaje medio de tres experimentos independientes respecto al control no tratado con ácido retinoico considerado el 100%. Barras de error = SEM. El análisis estadístico se ha realizado mediante la ANOVA de una vía seguida del test *post-hoc* de Bonferroni. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ y *** $p < 0.001$ relativo a la condición control no tratada con ácido retinoico considerada el 100%. E: El incremento en los niveles de β -III-tubulina puede ser detectado también por inmunocitoquímica. Las fotos muestran fotomicrografías representativas de cuerpos embrioides formados durante 6 DIV en ausencia de LIF y tratados o no (control) con 10⁻⁸ M de ácido retinoico.

este marcador neuronal ($467,8 \pm 36,3\%$ relativo al control no tratado con ácido retinoico). El tratamiento con LIF bloquea por completo la diferenciación neuronal inducida por ácido retinoico ya que no se observan diferencias entre

los cuerpos embrioides tratados y no tratados con ácido retinoico en presencia de LIF. Estos resultados se confirman también a nivel de proteína donde observamos por western blot un incremento significativo de los niveles proteicos de β -III-tubulina para las concentraciones altas de ácido retinoico en ausencia de LIF (figura 17 C, D). Y por último, la inducción neuronal producida por el tratamiento con ácido retinoico también se observa por inmunocitoquímica realizada en cuerpos embrioides formados durante 6 DIV en ausencia de LIF y tratados con 10^{-8} M de ácido retinoico (figura 17E).

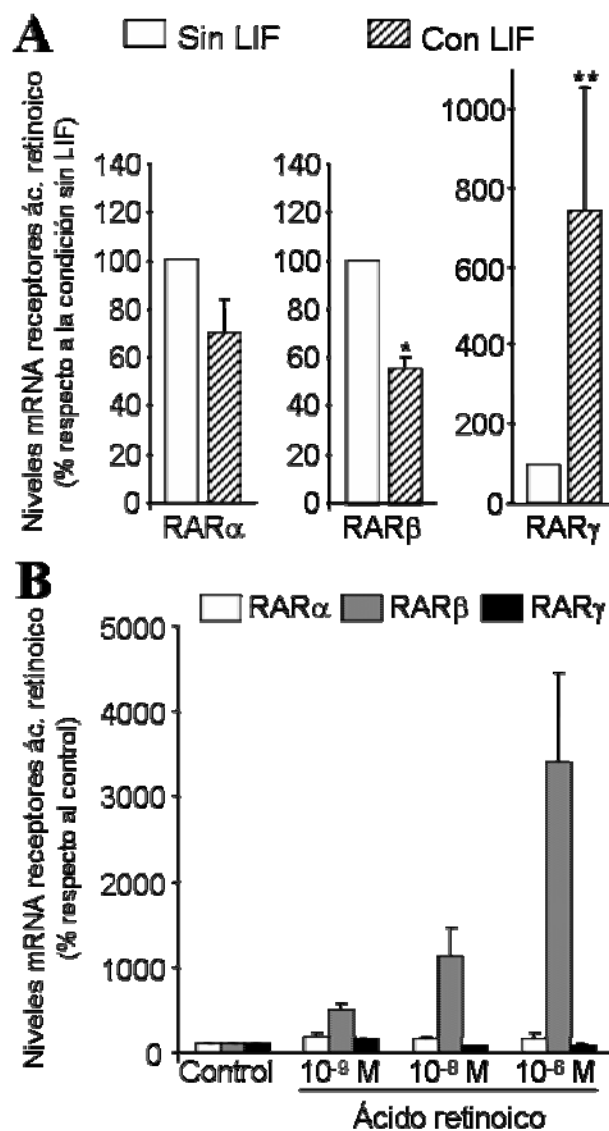


Figura 18. LIF y ácido retinoico modulan los niveles de expresión de los receptores de ácido retinoico (RARs) durante la formación de cuerpos embrioides. **A:** Cuerpos embrioides formados durante 2 DIV en presencia o ausencia de LIF son analizados por PCR cuantitativa para determinar los niveles de expresión de RAR α , RAR β y RAR γ . Los gráficos representan el porcentaje de expresión de los tres receptores en la condición con LIF respecto a la condición sin LIF considerada el 100%. **B:** Dos días después de la administración de diferentes concentraciones de ácido retinoico en ausencia de LIF, se analiza la expresión de los RARs por PCR cuantitativa. Los gráficos representan los porcentajes de expresión de RAR α , RAR β y RAR γ respecto a la condición control no tratada con ácido retinoico considerada 100%. Los resultados son expresados como la media de cómo mínimo tres experimentos independientes. Barras de error = SEM. El análisis estadístico se realiza utilizando el test *t* de Student. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ y *** $p < 0.001$.

Niveles de expresión elevados de Nestina sugieren un incremento en el número de precursores neurales que pueden diferenciarse tanto hacia un fenotipo neuronal como hacia un fenotipo glial. Así pues, a continuación se

examinan los niveles de expresión del marcador astrogial GFAP y del marcador oligodendroglial Olig-1. No se observa ningún efecto en la expresión de GFAP (figura 16I, J) ni en la de Olig-1 (datos no mostrados) en las condiciones de diferenciación estudiadas. Es decir, que el tratamiento de los cuerpos embrioides con ácido retinoico induce la diferenciación neuronal de las ESC de ratón cuando los cuerpos embrioides no han sido formados en presencia de LIF, ya que éste último bloquea el efecto del ácido retinoico.

Puesto que LIF está bloqueando el efecto neurogénico del ácido retinoico a continuación se examina si la presencia de LIF durante la formación de cuerpos embrioides modula los niveles de expresión de los receptores de ácido retinoico RAR α , RAR β y RAR γ . Para ello, se analizan los niveles de expresión de estos tres receptores de ácido retinoico a los 2 DIV de formación de cuerpos embrioides justo después del tratamiento con LIF, por PCR cuantitativa (figura 18A). Se observa que a pesar de que el tratamiento con LIF no induce cambios significativos en los niveles de expresión de RAR α ($69 \pm 11,3\%$ relativo a los cuerpos embrioides no tratados con LIF), al analizar los niveles de expresión de los otros dos receptores se observa una reducción significativa de RAR β ($51,6 \pm 0,6\%$ relativo a los cuerpos embrioides no tratados con LIF) y un incremento significativo de RAR γ ($673,8 \pm 355,4\%$ relativo a los cuerpos embrioides no tratados con LIF). Además, también se analizan los niveles de los receptores en cuerpos embrioides formados durante 4 DIV en ausencia de LIF y tratados con las tres concentraciones de ácido retinoico observando un incremento en los niveles de expresión de RAR β sin modificar los niveles de mRNA de RAR α y RAR γ (figura 18B), lo que podría sugerir que el efecto neurogénico del ácido retinoico se produce a través de este receptor que coincidentemente es el que se encuentra reducido tras el tratamiento con LIF que bloquea dicho efecto.

3. El tratamiento de cuerpos embrioides con ácido retinoico produce la diferenciación de ESC hacia neuronas post-mitóticas, afectando la viabilidad a largo plazo.

Con el fin de evaluar los efectos del ácido retinoico sobre la diferenciación de las ESC de ratón a largo plazo se procede a continuar el

protocolo de diferenciación del siguiente modo (figura 19A, B): los cuerpos embrioides se forman en presencia o ausencia de LIF durante los dos primeros días, seguido del tratamiento con diferentes dosis de ácido retinoico durante 2 ó 4 días más (4 DIV y 6 DIV de formación de cuerpos embrioides respectivamente) y a continuación se siembran sobre placas de cultivo de 24 pocillos previamente tratadas con gelatina. Después de 6 días adicionales de diferenciación en medio de selección, los cultivos son fijados y se procede al análisis de éstos por diferentes métodos (nos referiremos a las dos condiciones como 4 + 6 DIV y 6 + 6 DIV, respectivamente).

En primer lugar se cuenta el número total de cuerpos embrioides adheridos por pocillo (figura 19C, D) lo cual indica la viabilidad de éstos después de su formación bajo las diferentes condiciones de cultivo. En los cultivos no tratados con ácido retinoico (control) correspondientes a la condición 4 + 6 DIV, el número de cuerpos embrioides es menor en ausencia de LIF que cuando éstos son tratados con este factor trófico (figura 19C), mientras que en el caso de la condición 6 + 6 DIV a pesar de que el número de cuerpos embrioides en las condiciones control es similar tanto en presencia como en ausencia de LIF (figura 19 D), cuando no se añade ácido retinoico el tamaño de los cuerpos embrioides es menor (datos no mostrados). Estos resultados indican que la presencia de LIF favorece la formación de cuerpos embrioides en condiciones control. Asimismo, la viabilidad de los cuerpos embrioides no se ve afectada después de 2 ó 4 días de tratamiento con ácido retinoico siempre y cuando estos hayan sido previamente tratados con LIF (4 + 6 DIV ó 6 + 6 DIV, respectivamente; figura 19C, D). Los recuentos del número de cuerpos embrioides formados en ausencia de LIF y tratados con ácido retinoico, muestran una correlación inversa entre la concentración aplicada de este factor neurogénico y el número de cuerpos embrioides viables, tanto a 4 + 6 DIV como a 6 + 6 DIV (figura 19C, D, respectivamente). Con el fin de determinar si este fuerte descenso en la viabilidad de los cuerpos embrioides es debido a una reducción en el número de células en proliferación, procedemos a analizar el ciclo celular de las células presentes en los cuerpos embrioides formados

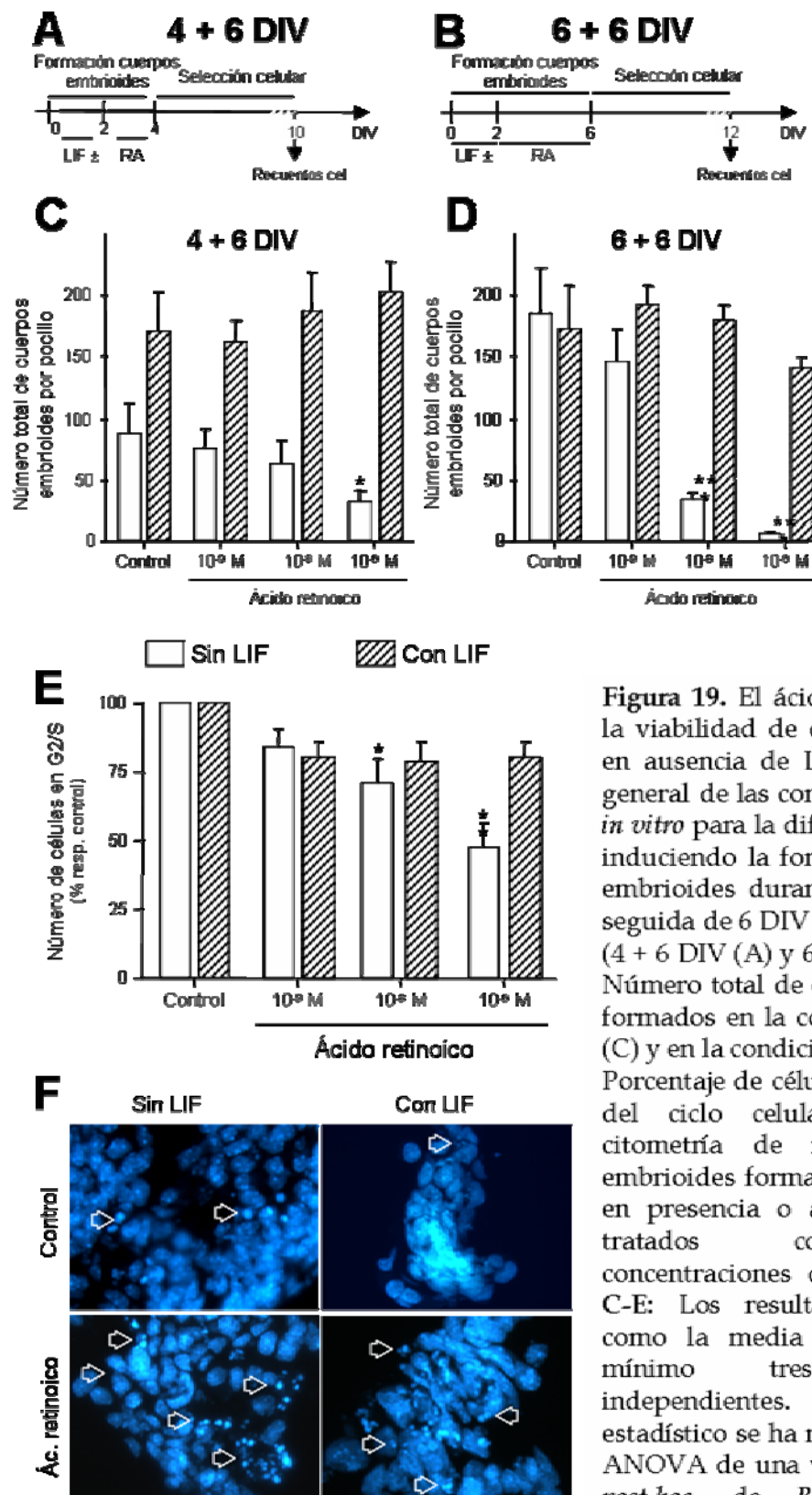


Figura 19. El ácido retinoico reduce la viabilidad de cuerpos embrioides en ausencia de LIF. **A, B:** esquema general de las condiciones de cultivo *in vitro* para la diferenciación de ESC induciendo la formación de cuerpos embrioides durante 4 DIV ó 6 DIV seguida de 6 DIV de selección celular (4 + 6 DIV (**A**) y 6 + 6 DIV (**B**)). **C, D:** Número total de cuerpos embrioides formados en la condición 4 + 6 DIV (**C**) y en la condición 6 + 6 DIV (**D**). **E:** Porcentaje de células en la fase G2/S del ciclo celular analizado por citometría de flujo en cuerpos embrioides formados durante 6 DIV en presencia o ausencia de LIF y tratados con diferentes concentraciones de ácido retinoico. **C-E:** Los resultados se expresan como la media \pm SEM de cómo mínimo tres experimentos independientes. El análisis estadístico se ha realizado utilizando ANOVA de una vía seguida del test *post-hoc* de *Bonferroni*. * $p < 0.05$,

** $p < 0.005$ y *** $p < 0.001$ relativo a la condición control no tratada con ácido retinoico considerada el 100% (**E**) o respecto a los valores absolutos del control (**C, D**). **F:** Fotomicrografías fluorescentes representativas que muestran tinción nuclear de DAPI de cuerpos embrioides formados en presencia o ausencia de LIF y tratados o no (control) con 10⁻⁸ M de ácido retinoico. Las flechas abiertas muestran núcleos fragmentados de células muertas.

durante 6 DIV (que es donde se observa el efecto más fuerte) mediante citometría de flujo (figura 19E). Los resultados muestran una reducción en el porcentaje de células en proliferación (células en fase G2/S) en ausencia de LIF que está relacionada directamente con la concentración de ácido retinoico aplicada. En cambio, en los cuerpos embrioides formados en presencia de LIF el porcentaje de células en fase G2/S está ligeramente reducido presentando un efecto similar para todas las concentraciones de ácido retinoico (figura 19E). Así pues, el tratamiento con ácido retinoico de cuerpos embrioides formados en ausencia de LIF durante 6 DIV reduce el número de células en proliferación. Sin embargo, esta reducción no es suficiente para justificar el gran descenso que se observa en el número de cuerpos embrioides viables en estas condiciones de diferenciación. Otra posible causa podría ser que el tratamiento con ácido retinoico esté generando células post-mitóticas que mueran en este estadio de formación de cuerpos embrioides. Apoyando esta hipótesis se observa un incremento en el número de células muertas en los cuerpos embrioides tratados con ácido retinoico, tal y como indica la presencia de núcleos fragmentados en cuerpos embrioides formados durante 6 DIV. Además, este aumento es mayor en ausencia de LIF y tras el tratamiento con ácido retinoico (figura 19F).

La adhesión de cuerpos embrioides sobre placas de cultivo hace que las células diferenciadas crezcan y salgan de estos agregados dispersándose hacia fuera. Así que a continuación se estudia si el tratamiento con ácido retinoico afecta al número de células diferenciadas que salen fuera de los cuerpos embrioides. Para ello se cuenta el número total de células así como el número de células en proliferación a los 6 días de la fase de selección celular del protocolo de diferenciación (ver esquema en figuras 19A, B). En la condición de diferenciación correspondiente a 4 + 6 DIV, el tratamiento con ácido retinoico reduce el número total de células y esta reducción es significativa para las dos concentraciones mayores de ácido retinoico (10^{-8} y 10^{-6} M) cuando los cuerpos embrioides no han sido previamente tratados con LIF. En el caso de los cuerpos embrioides formados en presencia de LIF, no se observan diferencias en el número total de células entre el control y las condiciones tratadas con ácido

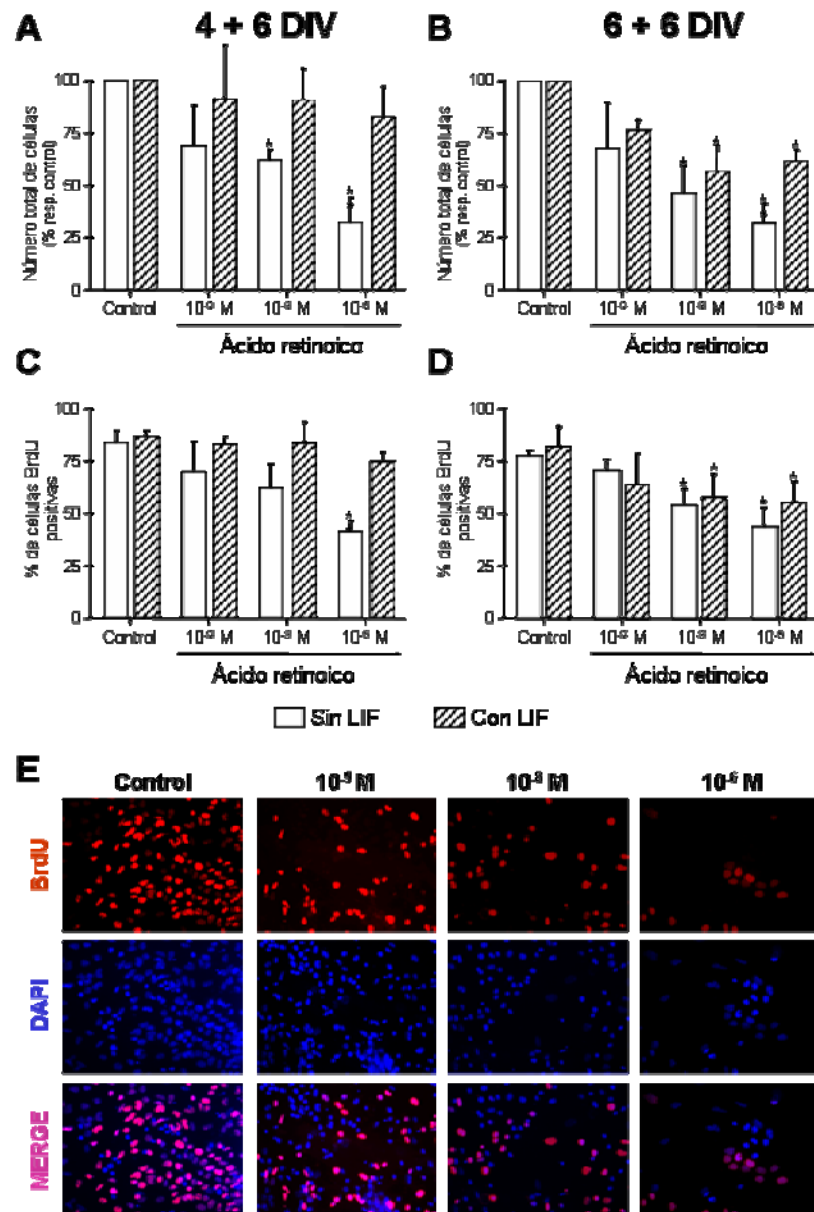


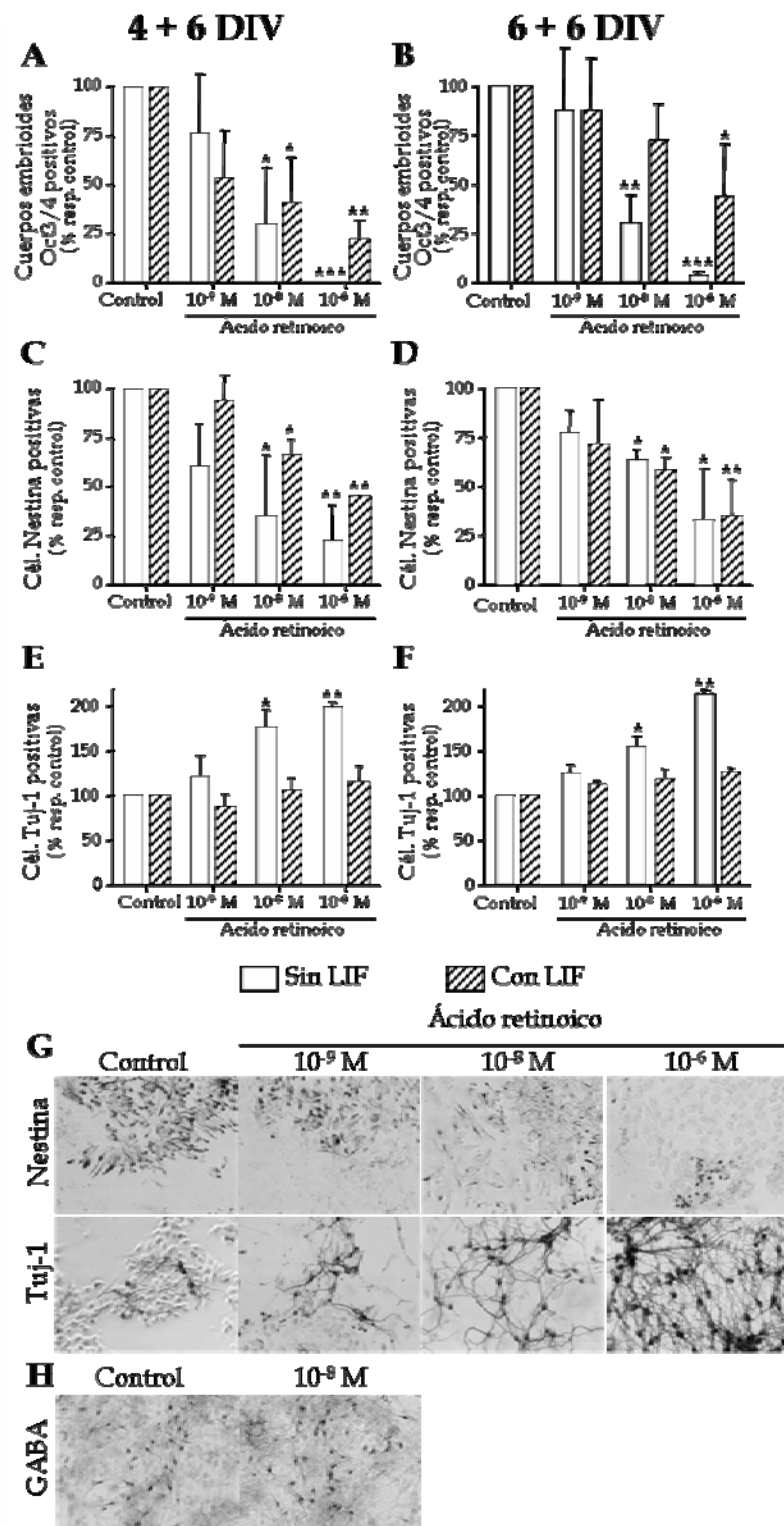
Figura 20. El tratamiento de cuerpos embrioides con ácido retinoico incrementa el número de células post-mitóticas. **A, B:** Número total de células que salen y se dispersan fuera de los cuerpos embrioides a los 6 días de la fase de selección celular en la condición 4 + 6 DIV (**A**) y 6 + 6 DIV (**B**). **C, D:** La reducción en el número total de células correlaciona con una reducción en el número de células en proliferación (BrdU positivas). **A-D:** Los resultados se expresan como la media de tres experimentos independientes. Barras de error = SEM. El análisis estadístico se ha realizado utilizando ANOVA de una vía seguida del test *post-hoc* de *Bonferroni*. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.005$ relativo a la condición control no tratada con ácido retinoico considerada 100% (**A, B**) y respecto a los valores absolutos del control (**C, D**). **E:** Fotomicrografías fluorescentes representativas de núcleos positivos para BrdU marcados doblemente con DAPI de un cultivo a los 6 días de la fase de selección celular obtenido a partir de cuerpos embrioides formados durante 6 DIV en ausencia de LIF y tratados con diferentes concentraciones de ácido retinoico.

retinoico (figura 20A). La reducción en el número de células observada en la condición sin LIF puede ser debida a una reducción en el número de células en proliferación, ya que se observa una reducción en el número de células que

incorporan BrdU (figura 20C). En la condición de diferenciación correspondiente a 6 + 6 DIV, la administración de ácido retinoico a cuerpos embrioides formados tanto en presencia como en ausencia de LIF produce una reducción en el número total de células, a pesar de que el efecto es más pronunciado en ausencia de LIF (figura 20B). En ambas condiciones, el descenso en el número total de células está correlacionado con una reducción en el número de células en proliferación (figura 20D).

También se estudia el efecto del ácido retinoico en la diferenciación de ESC de ratón a los 6 días de la fase de selección celular del protocolo de diferenciación. Este potente factor neurogénico induce una mayor diferenciación de las ESC que en la condición control ya que se observa una reducción en el número de cuerpos embrioides positivos para el marcador de células madre indiferenciadas Oct3/4 a los 10 y 12 días del protocolo de diferenciación (4 + 6 DIV y 6 + 6 DIV, respectivamente; figura 21A, B) para las condiciones tratadas con ácido retinoico respecto al control. Además, la diferenciación es en todos los casos mayor en aquellos cuerpos embrioides formados en ausencia de LIF (figura 21A, B). Con el fin de estudiar si la diferenciación neural inducida por el ácido retinoico al final de la formación de cuerpos embrioides se mantiene 6 días después de la fase de selección celular se procede a contar el número de células positivas para Nestina, β -III-tubulina y GFAP (figura 21C-F). Los resultados muestran que el tratamiento con ácido retinoico produce una reducción dosis dependiente en el número de células Nestina positivas 6 días después de la fase de selección celular tanto en la condición 4 + 6 DIV como en la condición 6 + 6 DIV (figura 21C, D, G). Este efecto no solo se observa en ausencia de LIF sino también en presencia de este factor. A continuación se estudia el número de células β -III-tubulina (figura 21E-G) y GFAP positivas (datos no mostrados). Se observa una diferenciación neuronal dosis dependiente inducida por el tratamiento de ácido retinoico en ausencia de LIF en las dos condiciones estudiadas (4 + 6 y 6 + 6 DIV; figura 21E, F, respectivamente). A pesar de que la presencia de LIF no bloquea la reducción en el número de células Nestina positivas, este factor trófico bloquea

Figura 21. Inducción de fenotipos neuronales maduros en ESC tratadas con ácido retinoico. Cuerpos embrioides formados durante 4 ó 6 días en presencia o ausencia de LIF y tratados con diferentes concentraciones de ácido retinoico son adheridos a placas de cultivo y diferenciados durante 6 días adicionales (4 + 6 DIV y 6 + 6 DIV, respectivamente). Los cultivos se fijan y se realiza inmunocitoquímica contra diversos marcadores. A, B: Porcentaje de cuerpos embrioides positivos para Oct3/4 en la condición 4 + 6 DIV (A) y 6 + 6 DIV (B). C, D: Porcentaje de células Nestina positivas en la condición 4 + 6 DIV (C) y 6 + 6 DIV (D). E, F: Porcentaje de células β -III-tubulina positivas en la condición 4 + 6 DIV (E) y 6 + 6 DIV (F). Los resultados se expresan como la media \pm SEM de cómo mínimo tres experimentos independientes. El análisis estadístico se ha realizado utilizando ANOVA de una vía seguida del test *post-hoc* de *Bonferroni*. * $p < 0.05$ ** $p < 0.005$ y *** $p < 0.001$



relativo a la condición control no tratada con ácido retinoico considerada 100%. G: Fotomicrografías representativas de células positivas para Nestina y β -III-tubulina (Tuj-1) en la condición 4 + 6 DIV sin LIF y tratadas con diferentes concentraciones de ácido retinoico. H: Inmunocitoquímica contra GABA de cultivos no tratados con LIF y tratados o no (control) con ácido retinoico 10^{-9} M en la condición 4 + 6 DIV.

por completo la diferenciación neuronal, es decir, el incremento en el número de células β -III-tubulina positivas. El análisis de los datos muestra que el incremento en el número de células positivas para β -III-tubulina producido tras el tratamiento con ácido retinoico es igual para los cuerpos embrioides formados durante 4 ó 6 días, sugiriendo que un tratamiento corto con este factor neurogénico es suficiente para inducir la determinación de las ESC hacia un fenotipo neuronal. Es más, la diferenciación hacia un fenotipo neuronal inducida por ácido retinoico es específica ya que el número de células diferenciadas hacia un fenotipo glial, es decir, positivas para GFAP, es muy bajo en todas las condiciones estudiadas (datos no mostrados). La mayoría de las neuronas resultantes de la diferenciación de ESC muestran un fenotipo GABAérgico (figura 21H).

4. La diferenciación *in vitro* de ESC de ratón previene la formación de teratocarcinomas tras el trasplante cerebral.

Puesto que la evaluación a largo plazo de la diferenciación de ESC de ratón sugiere que el ácido retinoico incrementa la determinación neuronal en ausencia de LIF, se evalúa la integración de estas células pre-diferenciadas tras ser transplantadas en el cerebro de un ratón adulto. Para ello y con el fin de poder detectar las ESC tras el trasplante, se procede a la transducción de éstas con un constructo retroviral para la expresión de la proteína fluorescente verde EGFP. Inicialmente se comprueba con éxito que las ESC expresan EGFP tanto durante la formación de cuerpos embrioides como después de ser sometidas al protocolo de diferenciación *in vitro*, a pesar de que cuando éstas están totalmente diferenciadas los niveles de expresión de EGFP se reducen parcialmente (figura 22A). Una vez realizada dicha comprobación las ESC de ratón se diferencian formando cuerpos embrioides durante 4 DIV en presencia y ausencia de LIF y se tratan con ácido retinoico 10^{-8} M (excepto en la situación control). Se escoge la condición de diferenciación en la que los cuerpos embrioides se forman durante 4 DIV y no durante 6 DIV debido a que el número de neuronas que se obtiene en ambos casos es similar (figura 21E, F)

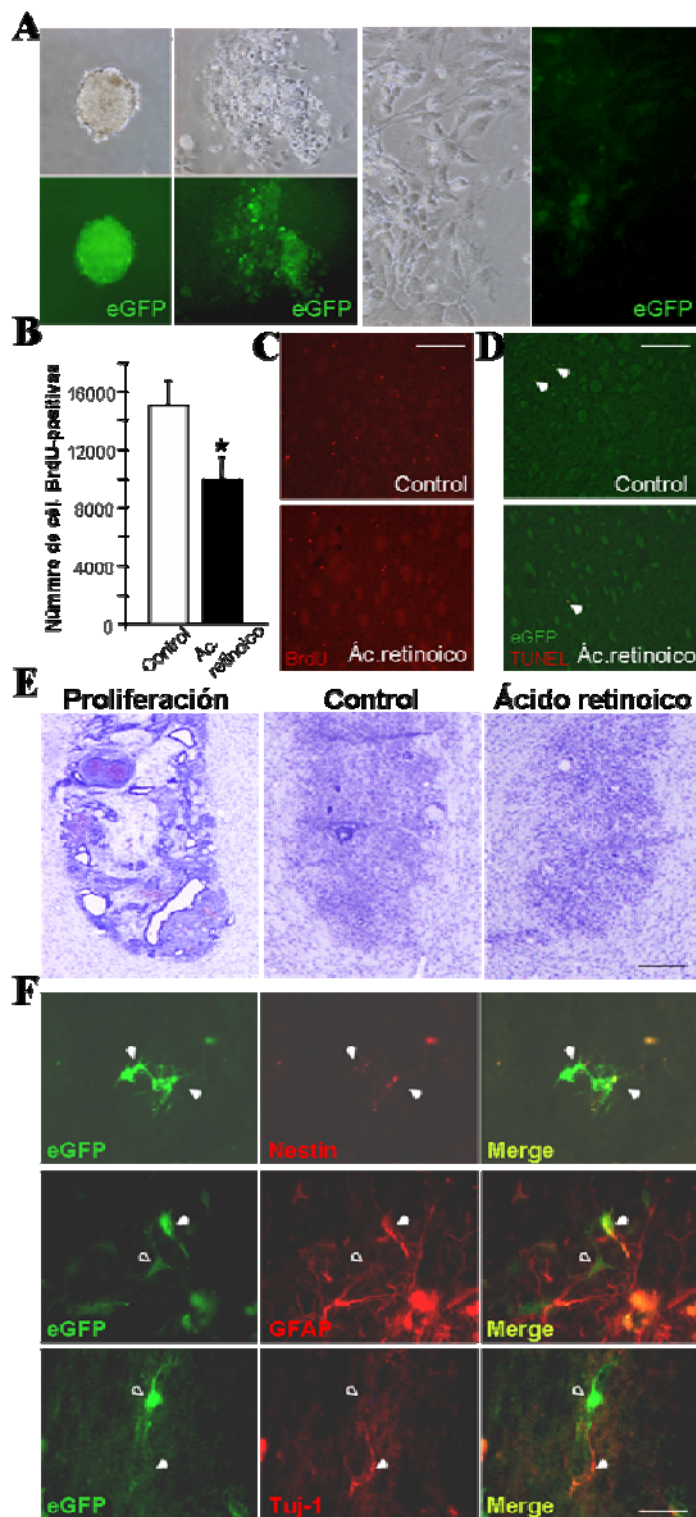


Figura 22. La diferenciación de ESC previa al trasplante previene la formación de teratocarcinomas. **A:** Las ESC utilizadas para realizar trasplantes expresan EGFP durante la formación de cuerpos embrioides así como a los 6 días de la fase de selección celular. **B, C:** Número de células BrdU positivas tres días después del trasplante de células ESC pre-diferenciadas en condiciones control o tratadas con ácido retinoico. Los resultados representan la media \pm SEM. El análisis estadístico se ha realizado utilizando el test *t* de Student. * $p < 0.05$. **C:** Fotonicrografías representativas de la inmunohistoquímica contra BrdU de trasplantes de ESC pre-diferenciadas en condiciones control o tratadas con ácido retinoico. **D:** Tres días después del trasplante muy pocas ESC EGFP positivas lo son también para el ensayo de TUNEL (flechas) en animales trasplantados con células pre-diferenciadas control o ácido retinoico. **E:** La tinción de Nissl muestra teratocarcinomas producidos por el trasplante de ESC no diferenciadas (proliferación) los cuales son reducidos en los animales trasplantados con células pre-diferenciadas en condiciones control (control), y eliminados por completo en los animales trasplantados con células pre-diferenciadas tratadas con ácido retinoico. **F:** El análisis del fenotipo adquirido 17 días después del trasplante por ESC pre-diferenciadas tratadas con ácido retinoico muestra que algunas células EGFP positivas son inmunoreactivas para nestina, GFAP o β -III-tubulina (Tuj-1). Flechas cerradas marcan células doble positivas; flechas abiertas marcan células únicamente positivas para eGFP. Barra de escala = 500 μ m (C-E); 30 μ m (F).

mientras que la viabilidad celular es mejor cuando los cuerpos embrioides se forman durante 4 DIV (figura 20A, B). Una vez formados los cuerpos embrioides son adheridos a placas de cultivo y se diferencian durante 6 días adicionales en medio de selección; entonces se disgregan y se trasplantan en el núcleo estriado de ratones adultos. Con el fin de comparar el comportamiento

de las células pre-diferenciadas con ESC proliferantes, estas últimas también se transplantan. Se analiza la capacidad de proliferación de las células pre-diferenciadas y transplantadas en la condición control y en la condición tratada con ácido retinoico mediante la realización de inmunohistoquímica contra BrdU en cortes coronales de cerebros de animales transplantados, a los cuales se les ha inyectado BrdU 24 horas antes de su sacrificio. El recuento de células BrdU positivas muestra que el número de células proliferantes está reducido en las células transplantadas que se han pre-diferenciado con ácido retinoico respecto a las células control no tratadas con este factor neurogénico (figura 22B, C). Para descartar la posibilidad de que el menor número de células en proliferación sea debido a un incremento en la muerte celular en el cultivo tratado con ácido retinoico se examina el número de células muertas por el ensayo de TUNEL. Se observa un número muy bajo de células apoptóticas (<0,1%) y no parecen haber diferencias entre las células diferenciadas en la condición control y las células diferenciadas tratadas con ácido retinoico (figura 22D). Así pues, los resultados correlacionan con la hipótesis de que una reducción en el número de células en proliferación refleja una mayor diferenciación de las ESC inducida por el tratamiento con ácido retinoico *in vitro*.

La caracterización del trasplante se prosigue realizando una tinción de *Nissl* para detectar la formación de teratocarcinomas (figura 22E). De acuerdo con trabajos previos, el trasplante de ESC proliferantes produce grandes teratocarcinomas en todos los cerebros analizados. La aparición de este tipo de tejidos ectópicos se reduce significativamente en los trasplantes de ESC de ratón pre-diferenciadas y particularmente, éstos desaparecen por completo en las células tratadas con ácido retinoico durante la diferenciación (figura 22E). Finalmente, se analiza el fenotipo adquirido 14 días después del trasplante por las células pre-diferenciadas en la condición tratada con ácido retinoico (figura 22F). A pesar de que la reducción en la expresión de EGFP observada en ESC totalmente diferenciadas dificulta su seguimiento tras el trasplante, se han encontrado algunas células EGFP positivas que colocalizan con el marcador

neural nestina, el marcador astroglial GFAP y el marcador neuronal β -III-tubulina (figura 22F).

Hemos observado que el tratamiento con ácido retinoico de ESC nos está induciendo un fenotipo neuronal maduro que afecta a la viabilidad del cultivo a largo plazo, dificultando así su manipulación para la utilización en terapia sustitutiva. Así pues, nos planteamos continuar con el estudio de factores que intervienen en la diferenciación de células madre hacia un fenotipo de neurona GABAérgica de proyección estriatal con el fin de optimizar el protocolo de diferenciación de ESC. En concreto estudiamos el papel del factor de transcripción de Ikaros y los resultados obtenidos se detallan a continuación.

5. Ikaros-1 se expresa selectivamente en neuronas post-mitóticas durante el desarrollo del núcleo estriado

Con objeto de estudiar el patrón de expresión de Ikaros durante el desarrollo del sistema nervioso central se realiza un ensayo de hibridación *in situ* a diferentes estadios embrionarios y postnatales con una sonda que reconoce todas las isoformas de Ikaros. Se observa que Ikaros se expresa exclusivamente en el núcleo estriado entre E14,5 y P3 presentando un pico de expresión a E18,5 (figura 23). El mRNA de Ikaros se encuentra siempre localizado en la zona del manto del núcleo estriado y muestra un gradiente de expresión dorsomedial a ventrolateral, de manera que la mayoría de las células que expresan Ikaros se encuentran a nivel de la transición entre la zona subventricular y la zona del manto (figura 23A). También existe un gradiente caudal a rostral en la expresión de Ikaros en el núcleo estriado que sólo se observa durante estadios embrionarios (figura 23C), pero no en estadios postnatales (figura 23D) donde el gradiente desaparece e Ikaros se expresa homogéneamente a lo largo del eje antero-posterior. A continuación se estudian los niveles de proteína por inmunohistoquímica (figura 23B) con el fin de analizar si existe algún tipo de regulación post-transcripcional de Ikaros. Sin embargo, no se encuentran diferencias entre el análisis por hibridación *in situ* y

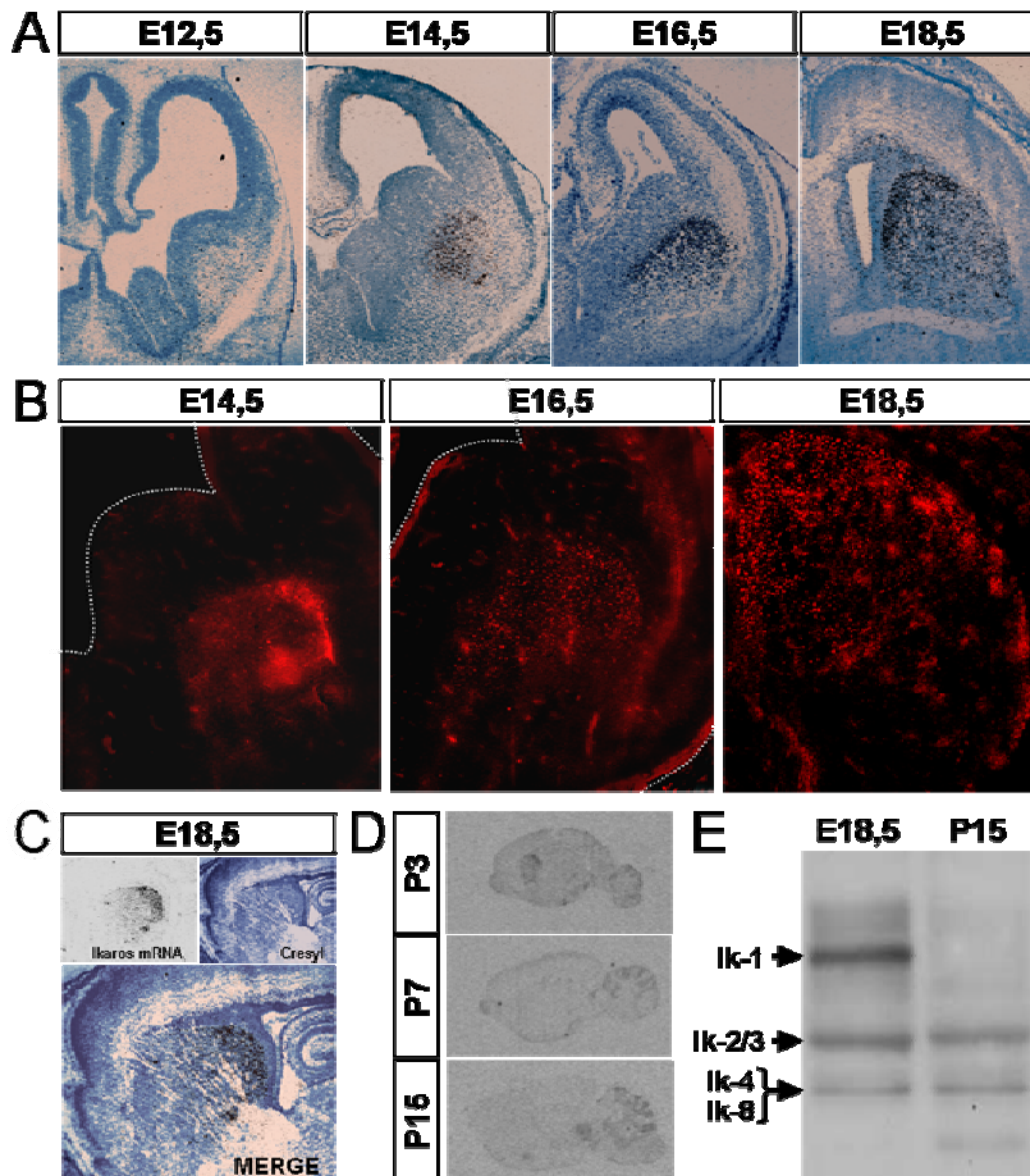


Figura 23. Ikaros-1 se expresa selectivamente en el núcleo estriado durante el desarrollo. A, C, D: Hibridación *in situ* realizada con una sonda de Ikaros que reconoce todas las isoformas de este factor de transcripción a diferentes estadios de desarrollo del núcleo estriado, desde E12,5 a P15. A: Fotomicrografías representativas de cortes coronales de los diferentes estadios embrionarios en los que se ha realizado la hibridación *in situ* de Ikaros y una contratinción de Nissl. B: Fotomicrografías fluorescentes representativas del análisis realizado por inmunohistoquímica del patrón proteico de expresión de Ikaros realizado en de cortes coronales de cerebros a E14,5, E16,5 y E18,5. C: Hibridación *in situ* de Ikaros junto con la tinción de Nissl en corte sagital a E18,5 que muestra el gradiente de expresión caudorostral que presenta Ikaros durante estadios embrionarios. D: Hibridación *in situ* de Ikaros realizada en cortes sagitales a tres estadios postnatales P3, P7 y P15. E: Western blot representativo de las diferentes isoformas de Ikaros expresadas en muestras estriatales de E18,5 y P15.

el análisis inmunohistoquímico. Es decir, que el patrón de expresión de Ikaros es igual tanto a nivel de mRNA como a nivel de proteína.

Existen diferentes isoformas de Ikaros que pueden estar reguladas diferencialmente, así pues, con el fin de analizar si eso está sucediendo durante

el desarrollo del núcleo estriado se analizan los niveles de expresión proteicos de diferentes isoformas de Ikaros (1, 2/3, 4 y 8) en muestras estriatales a diferentes estadios del desarrollo por western blot utilizando un anticuerpo que reconoce todas esas isoformas de Ikaros (figura 23E; muestra bandas representativas a E18,5 y P15). Se observa que Ikaros-1 (Ik-1) es la isoforma que presenta una mayor expresión comparada con el resto de isoformas Ik-2/3, Ik-4 e Ik-8 (ver bandas representativas a E18,5). Asimismo, es ésta misma isoforma 1 la que está regulada durante el desarrollo estriatal como muestra la desaparición total de esta banda (Ik-1) a P15 mientras que las bandas correspondientes a las otras isoformas se mantienen igual.

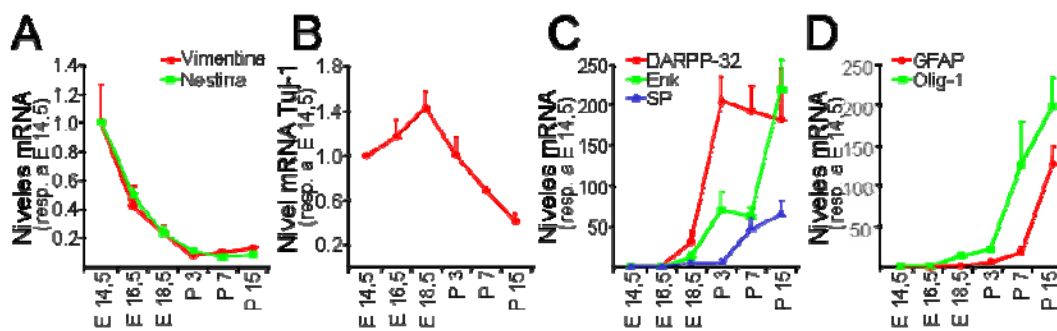


Figura 24. El pico de expresión de Ikaros correlaciona con el inicio de la expresión de marcadores de neuronas de proyección estriatales. A-D: Muestras estriatales a diferentes estadios del desarrollo (de E14,5 a P15) son analizadas por PCR cuantitativa para determinar la expresión de diferentes marcadores como: Nestina y Vimentina, marcadores de precursores neurales y gliales, respectivamente (A), β -III-tubulina, marcador de neuronas inmaduras (B), DARPP-32, encefalina (Enk) y sustancia P (SP), marcadores de neuronas de proyección estriatales (C) y GFAP y Olig-1, marcadores de astrocitos y oligodendrocitos, respectivamente (D). Los resultados son expresados como los niveles de expresión medios a cada estado de desarrollo respecto a la expresión a E14,5 considerada 1, de un mínimo de tres muestras diferentes. Barras de error = SEM.

El análisis por PCR cuantitativa de los niveles de mRNA de diferentes marcadores durante el desarrollo del núcleo estriado nos muestra que, el patrón de expresión de Ikaros correlaciona con el marcador neuronal inmaduro β -III-tubulina, ya que los niveles de expresión de éste último incrementan desde E14,5 hasta E18,5 y a partir de aquí disminuyen para desaparecer a estadios postnatales (figura 24B). Por el contrario, no se observa ningún tipo de correlación con el patrón de expresión de los marcadores de precursores neurales Nestina y Vimentina, los cuales disminuyen su expresión a partir de E14,5 (figura 24A). Asimismo, tampoco se observa ningún tipo de correlación

con los marcadores astrogliales GFAP y Olig-1 los cuales empiezan a expresarse a estadios postnatales (figura 24D), coincidiendo con la ya descrita astrogénesis postnatal (Levison y Goldman, 1993). No obstante, al analizar el patrón de expresión de diferentes marcadores de neuronas estriatales de proyección (que suponen el 95% de neuronas estriatales) tales como DARPP-32, encefalina y sustancia P se observa que el pico de expresión de Ikaros coincide con el inicio de expresión de éstos marcadores (figura 24C). Estos resultados y la localización de Ikaros en el margen entre la zona subventricular y la zona del manto sugieren un posible papel de este factor de transcripción en la diferenciación de neuronas inmaduras hacia fenotipos más maduros.

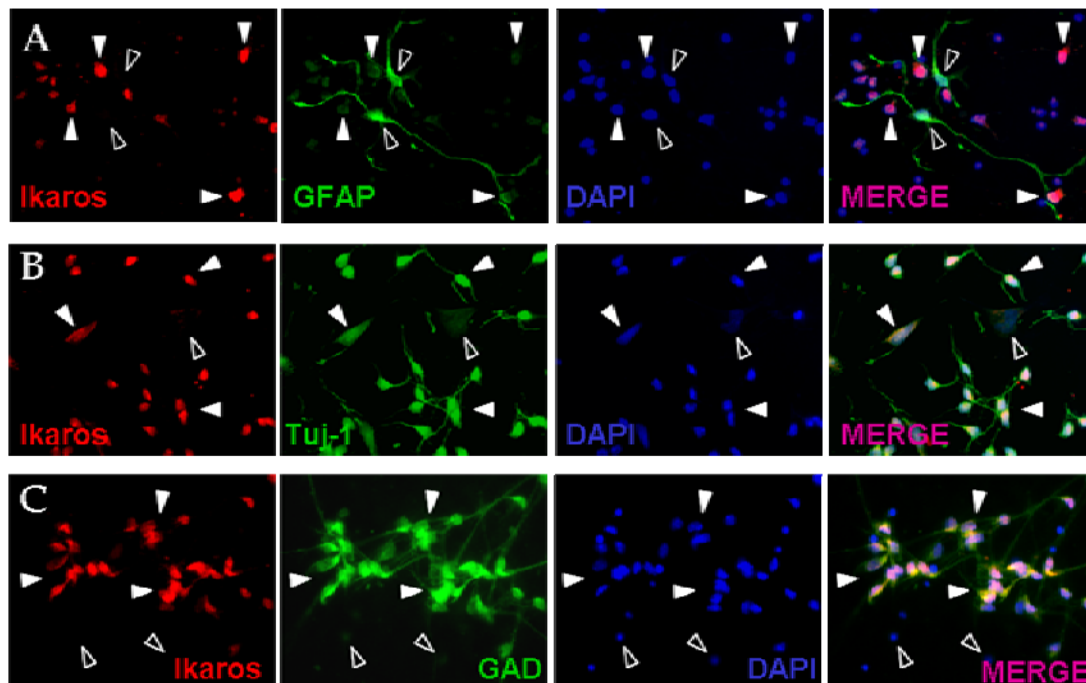


Figura 25. Ikaros se expresa en neuronas postmitóticas GABAérgicas. Mediante doble inmunocitoquímica fluorescentes realizadas en un cultivo primario de LGE a E14,5 a los 5 DIV se observa que las células que expresan Ikaros no son positivas para el marcador de astrocitos GFAP (A), mientras si que lo son para el marcador de neuronas inmaduras β -III-tubulina (B) y el marcador de neuronas GABAérgicas, GAD (C). Todas las inmunocitoquímicas han sido contrateñidas con el marcador nuclear DAPI. Las flechas cerradas señalan células con doble marcaje (excepto en A que señalan las células Ikaros positivas) y las flechas abiertas señalan células con un solo marcaje.

Para estudiar más en detalle el papel de Ikaros en el desarrollo del núcleo estriado se analiza el fenotipo de las células que expresan este factor de transcripción (figura 25). Estudios de doble marcaje en cultivos primarios de LGE de E14,5 muestran que Ikaros se expresa en neuronas inmaduras β -III-tubulina positivas (figura 25B), pero no en astrocitos GFAP positivos (figura

25A). Además, la mayoría de células que expresan Ikaros son también positivas para el marcador de neuronas GABAérgicas, ácido glutámico descarboxilasa (GAD, del inglés *glutamic acid decarboxylase*) (figura 25C), pero no para el marcador colinérgico, acetilcolinesterasa (ChAT, del inglés *cholinacetyl transferase*) (datos no mostrados). De estos resultados, podemos concluir que la mayoría de células que expresan Ikaros son neuronas post-mitóticas inmaduras. Así pues, la localización de Ikaros en el margen entre la zona subventricular y el manto y su expresión en neuronas post-mitóticas inmaduras nos sugiere un posible papel de este factor de transcripción en la generación de neuronas estriatales mediante la diferenciación de precursores neurales que salen de la zona germinal hacia el manto. Es por ello que a continuación procedemos a estudiar el papel de Ikaros en la neurogénesis estriatal.

6. La falta de Ikaros bloquea la segunda oleada de neurogénesis del núcleo estriado en desarrollo produciendo una reducción en el volumen estriatal que va acompañada de un incremento en el volumen de la zona germinal

Para tratar de demostrar la implicación de Ikaros en la generación de neuronas durante el desarrollo del núcleo estriado se analiza la neurogénesis estriatal en animales deficientes de Ikaros y normales. Estos experimentos se llevan a cabo administrando pulsos de BrdU a diferentes estadios del desarrollo, desde E12,5 hasta E16,5 y analizando, en todos los casos, los cerebros a E18,5 (ver esquema y fotografías representativas en figura 26). De esta manera, las células que en el momento de la administración de BrdU estén proliferando y seguidamente salgan de ciclo, es decir, que dejen de proliferar para diferenciarse, retendrán el BrdU y podrán ser detectadas por inmunohistoquímica. Mientras que las células que sigan proliferando diluirán el BrdU pasándoselo a su descendencia y no serán detectadas. Así, podremos determinar el número de neuronas generadas a cada edad a la que se ha administrado BrdU. El número de células BrdU positivas se cuantifica por separado en la zona germinal y en la zona del manto a E18,5 para cada edad de inyección (figura 27A). La generación temprana de neuronas estriatales no

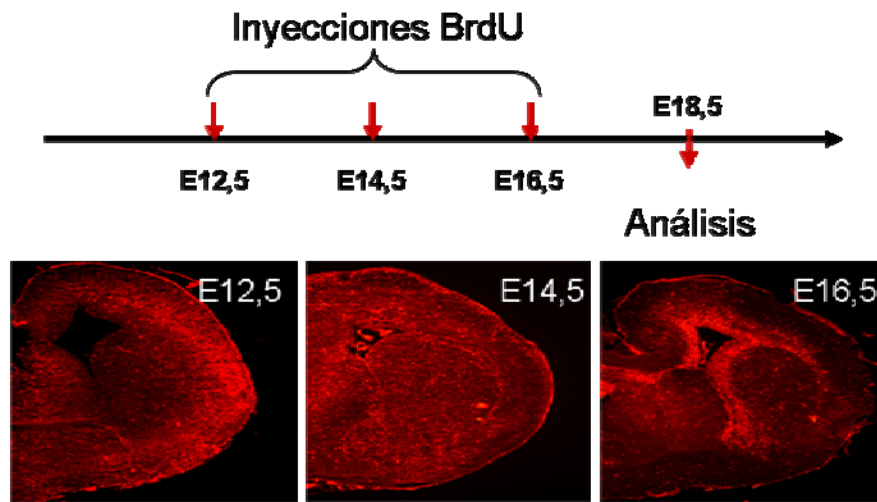


Figura 26. Esquema del estudio de proliferación con BrdU para determinar el efecto de la falta de Ikaros en la generación de neuronas estriatales. En ratones gestantes se inyecta BrdU en los días E12,5 o E14,5 o E16,5 y dichos embriones son procesados para inmunohistoquímica contra BrdU el día gestacional E18,5 con el fin de estudiar las neuronas que se han generado a cada edad embrionaria en la que se ha inyectado BrdU. Fotos representativas del marcaje de BrdU obtenido para cada estadio de desarrollo.

parece estar afectada por la falta de Ikaros ya que no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los animales normales y deficientes de Ikaros en cuanto a la densidad de células BrdU positivas marcadas a E12,5 tanto a nivel de la zona germinal como a nivel del manto. El análisis del número total de células BrdU positivas a nivel del manto denota una cierta tendencia a descender en el ratón deficiente de Ikaros aunque ésta podría ser debida probablemente al menor tamaño que presenta el animal (número total de células BrdU positivas/zona germinal; wt: 22819 ± 7124 e Ik^{-/-}: $16865,71 \pm 990,6$ y número total de células BrdU positivas/manto estriatal; wt: $75700,98 \pm 11405,74$ e Ik^{-/-}: 44225 ± 613 ; figura 27A). El mismo resultado se observa para las células nacidas a E16,5, es decir, que la falta de Ikaros no parece estar afectando tampoco a la generación de neuronas tardías (número total de células BrdU positivas/zona germinal; wt: 148267 ± 33283 e Ik^{-/-}: 129761 ± 28929 y número total de células BrdU positivas/manto estriatal; wt: 71974 ± 3108 e Ik^{-/-}: 45684 ± 1687 ; figura 27A). Por el contrario, la falta de Ikaros produce una

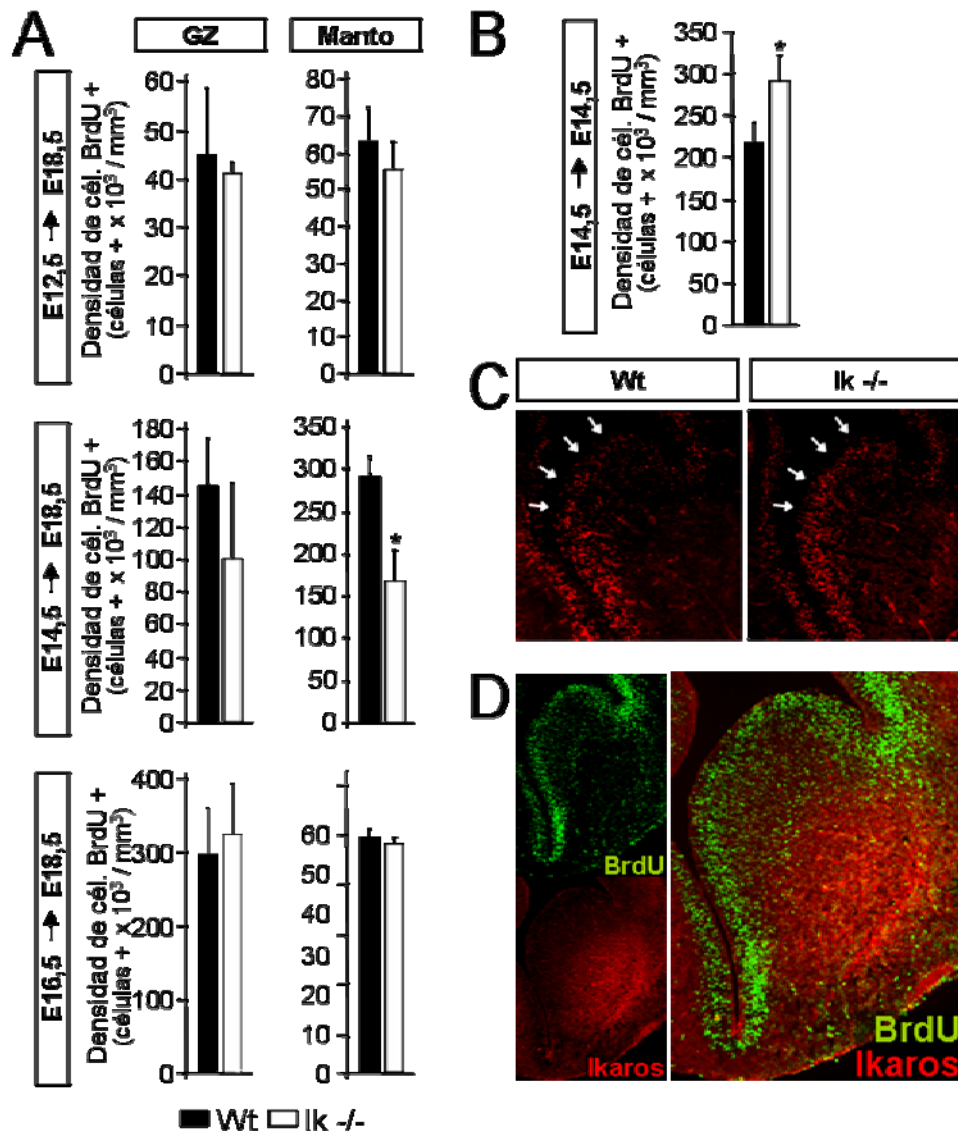


Figura 27. La falta de Ikaros reduce la generación de neuronas durante la segunda oleada de neurogénesis estriatal incrementando la población proliferativa de la zona germinal. **A:** Estudio del efecto de Ikaros en la generación de neuronas estriatales para el que se realiza un ensayo de proliferación inyectando BrdU en ratones gestantes a E12,5, E14,5 y E16,5 y procesando dichos animales a E18,5 para el análisis del número de células BrdU positivas tanto a nivel de la zona germinal (GZ) como a nivel de la zona del manto estriatal (Manto). **B:** Análisis de las células en proliferación en la zona germinal de animales que han sido inyectados con BrdU a E14,5 y que 30 minutos después han sido sacrificados para realizar el recuento de células BrdU positivas. Ambos estudios se realizan en embriones normales (Wt) y deficientes de Ikaros (IK^{-/-}). El resultado se expresa como la densidad media de células BrdU positivas (células positivas $\times 10^3 / \text{mm}^3$) de un mínimo de 3 animales. Barras de error = SEM. El análisis estadístico se ha realizado utilizando el test *t* de Student. * $p < 0,05$ relativo al animal normal. **C:** Fotomicrografías fluorescentes representativas de inmunohistoquímica contra BrdU en animales de E14,5 normales (Wt) y deficientes de Ikaros (IK^{-/-}) que está marcando las células proliferativas de la zona germinal (marcada por flechas) que se han contado en B. **D:** Corte coronal de embrión de 14,5 días inyectado con BrdU durante 30 minutos, donde se puede observar la LGE doble marcada con BrdU e Ikaros los cuales están delimitando respectivamente la zona germinal proliferativa y la zona del manto post-mitótica.

reducción significativa en el número de células nacidas a E14,5 en el manto del núcleo estriado respecto al animal normal (número total de células BrdU positivas/manto estriatal; wt: 347899 ± 30694 e Ik-/-: 135043 ± 28605 ; figura 27A). A nivel de la zona germinal también se observa una tendencia de disminución en la densidad de células BrdU positivas en el animal deficiente de Ikaros respecto al animal normal (número total de células BrdU positivas/zona germinal; wt: 73936 ± 15022 e Ik-/-: 41118 ± 13564 ; figura 27A).

A continuación se analiza si la reducción en el número de células generadas a E14,5 se correlaciona con un incremento en el número de células en proliferación. Para ello se administra BrdU en el día de gestación E14,5 y 30 minutos después los cerebros son disecados para proceder a su análisis. De esta manera, las células que incorporen BrdU durante esos 30 minutos serán aquellas que se encuentren proliferando en ese momento del desarrollo. La figura 27D muestra una fotomicrografía representativa de un animal normal de E14,5 inyectado con BrdU durante 30 minutos en el que se ha realizado una doble inmunohistoquímica contra Ikaros y BrdU. En ella se puede observar que la zona germinal positiva para BrdU corresponde a la zona proliferativa mientras que la zona marcada con Ikaros corresponde a la zona del manto post-mitótica. Así pues, se cuantifica el número de células BrdU positivas de la zona germinal y se observa un incremento significativo en el número de células proliferativas en el ratón deficiente de Ikaros respecto al animal normal (número total de células BrdU positivas/zona germinal; wt: 86148 ± 8193 e Ik-/-: 109616 ± 9211 ; figura 27B; ver fotomicrografías representativas en la figura 27C). Este resultado sugiere que Ikaros está implicado en la generación de neuronas estriatales a E14,5 ya que la falta de este factor de transcripción produce algún tipo de bloqueo en la diferenciación de los precursores neurales en ese estadio de desarrollo que las hace quedar retenidas en proliferación dentro de la zona germinal.

Teniendo en cuenta estos resultados se decide estudiar el volumen del núcleo estriado, la zona germinal y el bulbo olfativo en el animal deficiente de

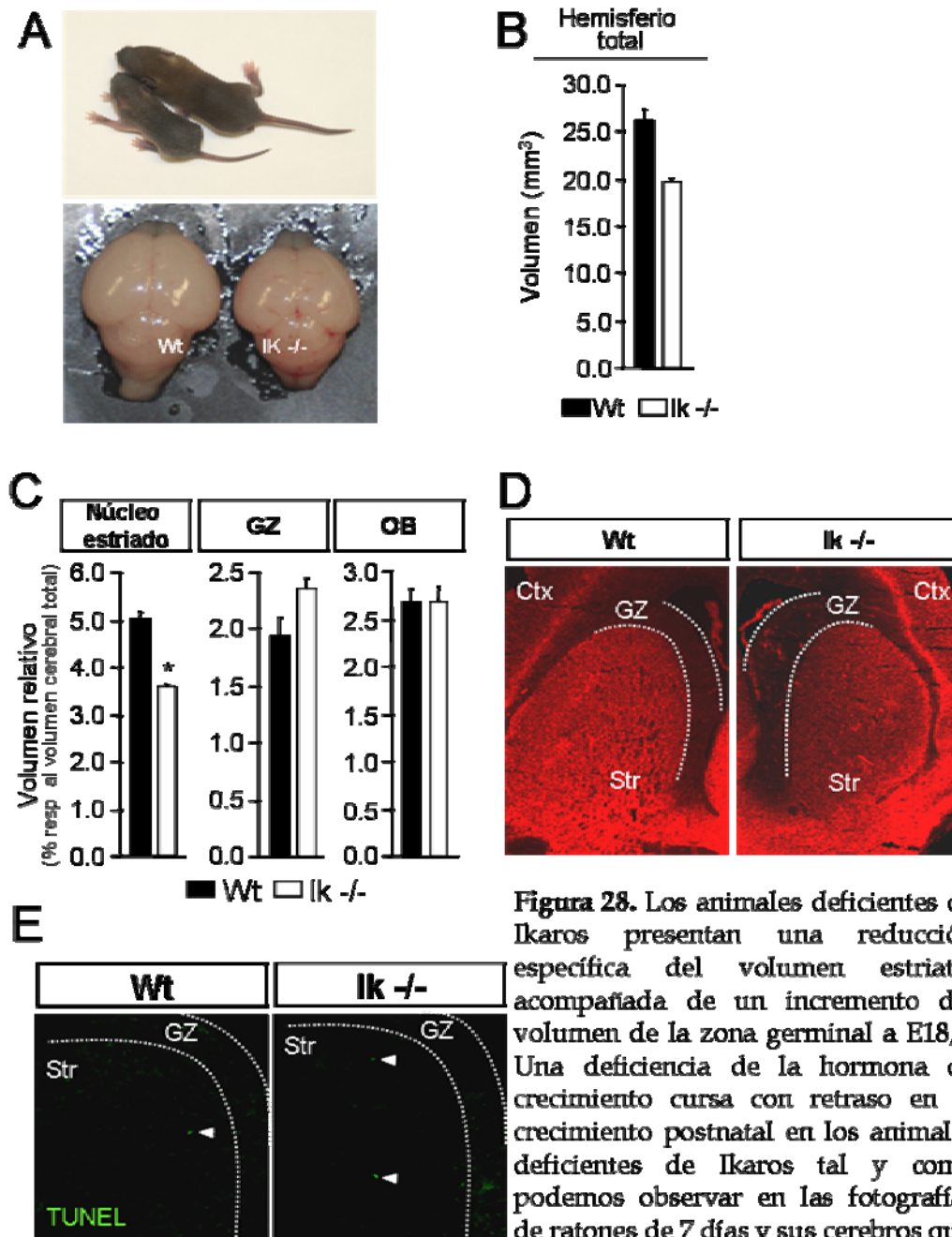


Figura 28. Los animales deficientes de Ikaros presentan una reducción específica del volumen estriatal acompañada de un incremento del volumen de la zona germinal a E18,5. Una deficiencia de la hormona de crecimiento cursa con retraso en el crecimiento postnatal en los animales deficientes de Ikaros tal y como podemos observar en las fotografías de ratones de 7 días y sus cerebros que

se muestran en **A**. Esta reducción en el tamaño se ha cuantificado a nivel del cerebro midiendo el volumen (mm^3) total de un hemisferio **B** y los volúmenes concretos del núcleo estriado, zona germinal (GZ) y bulbo olfativo (OB) medidos en animales normales (wt) y deficientes de Ikaros (Ik^{-/-}) se han relativizado al volumen cerebral total para evitar los cambios debidos al tamaño del animal **C**. Los resultados se expresan como el porcentaje del volumen relativo de cada núcleo respecto al volumen cerebral total. Las gráficas representan la media de un mínimo de tres animales \pm SEM. El análisis estadístico se ha realizado utilizando el test *t* de Student. * $p < 0.05$. **D**: Cortes coronales de animales de E18,5 normales (wt) y deficientes (Ik^{-/-}) de Ikaros teñidos con marcador neuronal MAP2 que está marcando la zona postmitótica del manto estriatal (Str) y permite ver la diferencia de tamaño entre ambos genotipos. **E**: Fotomicrográficas representativas del ensayo de TUNEL realizado a E18,5 en embriones normales y deficientes de Ikaros que muestran la ausencia de diferencias en cuanto al número de neuronas muertas. Las flechas señalan células TUNEL positivas.

Ikaros y en el animal normal en el estadio de desarrollo E18,5. El animal deficiente de Ikaros presenta un fenotipo deficiente de hormona de crecimiento caracterizado por un retraso en el crecimiento postnatal (Georgopoulos y col., 1994). Así pues, asumiendo que el animal deficiente de Ikaros presenta una reducción en el tamaño (ver foto representativa del animal entero y cerebro en figura 28A), los volúmenes de las diferentes estructuras se relativizan al volumen total del cerebro (volumen hemisferio total wt: $26,23 \pm 1,21 \text{ mm}^3$ e Ik-/-: $19,73 \pm 0,05 \text{ mm}^3$; figura 28B). La falta de Ikaros produce una reducción significativa en el volumen estriatal (volumen absoluto wt: $1,27 \pm 0,06 \text{ mm}^3$ e Ik-/-: $0,78 \pm 0,08 \text{ mm}^3$; figura 28C), tal y como podemos observar en la figura 28D donde se muestra una inmunohistoquímica contra MAP-2 representativa de un animal normal y deficiente de Ikaros. Por el contrario, no se observan diferencias entre los dos genotipos en cuanto al volumen relativo del bulbo olfativo (volumen absoluto wt: $0,70 \pm 0,03 \text{ mm}^3$ e Ik-/-: $0,53 \pm 0,02 \text{ mm}^3$; figura 28C), otra estructura que tiene parte de su origen en la LGE. Además, esta reducción en el volumen estriatal va acompañada de un incremento en el volumen de la zona germinal (volumen absoluto wt: $0,51 \pm 0,02 \text{ mm}^3$ e Ik-/-: $0,41 \pm 0,04 \text{ mm}^3$; figura 28C), lo cual es consistente con el aumento en el número de células proliferativas presentes en esta zona observado anteriormente. Se ha descartado que la reducción del volumen estriatal sea debido a un incremento de muerte celular ya que no se observan diferencias entre el animal deficiente de Ikaros y el animal normal en cuanto al número de neuronas muertas detectadas por TUNEL en el núcleo estriado (figura 28E). Así pues, podemos resumir todos estos resultados diciendo que la falta de Ikaros produce una reducción en la segunda oleada de neurogénesis estriatal que supone un incremento en la población proliferativa en la zona germinal produciendo un aumento del volumen de esta zona y una reducción del volumen relativo del núcleo estriado.

7. La falta de Ikaros durante el desarrollo estriatal produce una reducción en la capacidad de auto-renovación y una alteración de las poblaciones de la zona germinal adulta.

Una vez determinado que la falta de Ikaros produce alteraciones en la diferenciación de neuronas estriatales, lo cual supone cambios en la proliferación de la población de progenitores presente en la zona germinal, se procede a realizar cultivos primarios de neuroesferas de embriones deficientes de Ikaros, heterocigotos y normales para estudiar el efecto de éste factor de transcripción en la proliferación y capacidad de auto-renovación (figura 29). Los progenitores derivados de los animales deficientes de Ikaros presentan una menor capacidad de auto-renovación tal y como indica el menor número de neuroesferas primarias obtenidas a partir de estos animales en comparación con los normales, ya sea considerando el número total de neuroesferas obtenidas por cerebro (figura 29A), como el número de neuroesferas por cada millón de células, donde eliminamos la posible reducción debida al tamaño del cerebro (figura 29B). No se observan diferencias en la capacidad de auto-renovación

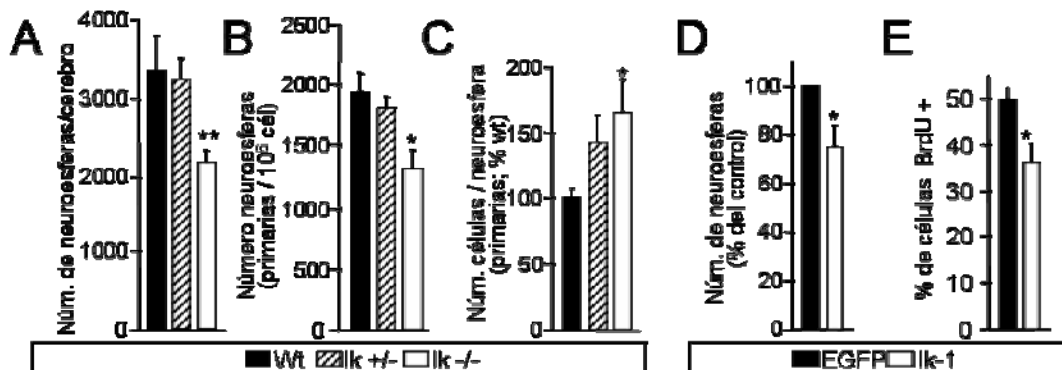


Figura 29. La falta de Ikaros produce un incremento en la tasa de proliferación de neuroesferas embrionarias acompañada de una reducción en la capacidad de auto-renovación. Se estudia el efecto de Ikaros en la proliferación y capacidad de auto-renovación de neuroesferas embrionarias generadas a partir de cerebros de animales de E14,5 deficientes de Ikaros (Ik^{-/-}), heterocigotos (Ik^{+/-}) y normales (wt). A: Número de neuroesferas generadas por cerebro a los 5 DIV de formación. B: Número de neuroesferas generadas a partir de 10⁶ células de manera que se evita el efecto debido al tamaño del cerebro. C: Estimación de la tasa de proliferación de los progenitores neurales mediante recuento del número de células por neuroesfera. D-E: Análisis de la capacidad de formación de neuroesferas (D) y de la tasa de proliferación por incorporación de BrdU (E) en precursores neurales embrionarios que sobre-expresan Ikaros-1 (Ik-1) y su control EGFP. Los resultados se expresan como el número de neuroesferas (en porcentaje) formadas a partir precursores neurales que sobre-expresan Ikaros respecto al control y porcentaje de células BrdU positivas en las neuroesferas que sobre-expresan Ikaros y en las neuroesferas control. Los gráficos representan los valores medios de un mínimo de tres experimentos independientes \pm SEM. La estadística se ha realizado utilizando ANOVA de una vía seguida del test *post-hoc* de Bonferroni en A-C y el test *t* de Student para D y E. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,005$.

entre los animales normales y los heterocigotos de Ikaros a pesar de que hay una cierta tendencia a estar reducida en estos últimos. Al analizar el número de células por neuroesfera se observa un incremento en la tasa de proliferación de los progenitores obtenidos a partir del animal deficiente de Ikaros y del animal heterocigoto respecto al normal (figura 29C). Así pues, la falta de Ikaros induce un incremento en la tasa de proliferación de las neuroesferas que podría estar relacionada con el incremento en la proliferación observado en la zona germinal del animal deficiente de Ikaros.

Para continuar con el estudio del papel de Ikaros en la auto-renovación y proliferación de precursores neurales se procede a estudiar dichos parámetros en neuroesferas que sobre-expresan este factor de transcripción. La sobre-expresión de Ikaros produce una disminución en la capacidad de auto-renovación de los precursores neurales, es decir, que la formación de neuroesferas primarias es menor (figura 29D). También la proliferación se ve reducida en las neuroesferas que sobre-expresan Ikaros tal y como indica el menor número de células que incorporan BrdU en el cultivo (figura 29E). Todos estos resultados muestran que Ikaros reduce la tasa de proliferación de los progenitores neurales concordando con el incremento de proliferación producido por la falta de Ikaros. Esta reducción podría ser debida al papel de este factor de transcripción en la inducción de la diferenciación de progenitores neurales hacia fenotipos neuronales más maduros. Por el contrario, los resultados obtenidos en los estudios del efecto de Ikaros en la capacidad de auto-renovación son contradictorios ya que tanto la sobre-expresión de este factor de transcripción como el déficit expresión producen una reducción en la capacidad de auto-renovación. Si Ikaros juega un papel en la diferenciación de precursores neurales hacia fenotipos maduros es lógico pensar que su sobre-expresión produce una reducción en la capacidad de auto-renovación. Así pues, en los animales deficientes de Ikaros lo que podría estar pasando es que se produzcan alteraciones en las poblaciones de progenitores presentes en la zona germinal debido a un exceso de proliferación y que esto produzca una reducción en la capacidad de auto-renovación, como ocurre en el mutante nulo

para P21 (Kippin y col., 2005). Puesto que las poblaciones de progenitores de la zona germinal en estadios embrionarios no están bien definidas, se decide estudiar la zona subventricular adulta donde las poblaciones de precursores están bien descritas. Así pues, se realizan los mismos experimentos en neuroesferas generadas a partir de la zona subventricular adulta de animales normales,

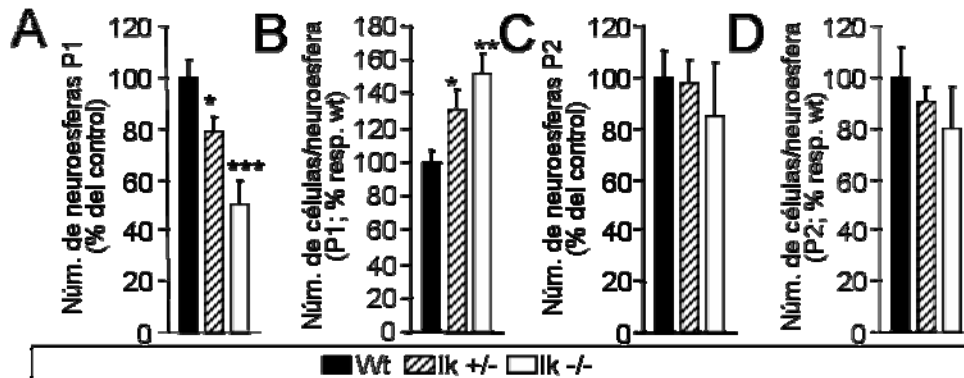


Figura 30. Alteraciones en la tasa de proliferación y capacidad de auto-renovación de neuroesferas adultas generadas a partir de la zona subventricular producidas por la falta de expresión de Ikaros durante el desarrollo. Se estudia el efecto de Ikaros en la capacidad de proliferación y auto-renovación de neuroesferas primarias y secundarias generadas a partir de la zona subventricular de animales adultos deficientes de Ikaros (Ik^{-/-}), heterocigotos (Ik^{+/-}) y normales (wt). La capacidad de auto-renovación se evalúa contando el número de neuroesferas primarias (P1) (A) y secundarias (P2) (C) que se expresa como el porcentaje medio de neuroesferas respecto al animal normal (wt) considerado el 100%. La tasa de proliferación se determina contando el número de células por neuroesfera primaria (P1) (B) y secundaria (P2) (D) que se expresa como el porcentaje medio de células por neuroesfera respecto al animal normal (wt) considerado el 100%. Los gráficos muestran los valores medios de tres experimentos diferentes \pm SEM. La estadística se ha realizado utilizando ANOVA de una vía seguida del test *post-hoc* de Bonferroni. * $p < 0,05$ ** $p < 0,005$ y *** $p < 0,001$

deficientes y heterocigotos de Ikaros (figura 30). Se observa una reducción significativa en el número de neuroesferas primarias obtenidas a partir tanto de animales nulos de Ikaros como de animales heterocigotos (figura 30A). Esta reducción en la capacidad de auto-renovación va acompañada de un incremento en la tasa de proliferación de los progenitores de la zona subventricular (figura 30B), tal y como indica el mayor número de células por neuroesfera presentes. Por el contrario, cuando se analizan los mismos parámetros para neuroesferas secundarias, se observa que no existen diferencias entre los tres genotipos estudiados ni en la capacidad de auto-

renovación de los progenitores neurales (figura 30C) ni en la tasa de proliferación de éstos (figura 30D). La falta de diferencias en estos resultados indica que la capacidad intrínseca de auto-renovación y proliferación de los progenitores neurales del animal deficiente de Ikaros no está afectada. Así pues, las diferencias observadas en los experimentos realizados con neuroesferas primarias pudieran ser debidas a alteraciones de las poblaciones de progenitores presentes en la zona subventricular adulta del animal deficiente de Ikaros.

Existen tres tipos de progenitores en la zona subventricular adulta; (Doetsch y col., 1997). Las células B son células quiescentes que presentan una elevada capacidad de auto-renovación y son positivas para GFAP. Otro tipo de progenitores neurales derivados de los anteriores son las células C también conocidas como células de rápida amplificación por su elevada capacidad proliferativa. Y por último tenemos las células A que son neuroblastos positivos para PSA-NCAM. Para determinar si estas poblaciones se encuentran alteradas en el animal deficiente de Ikaros, a continuación se analizan los tres tipos de progenitores de la zona subventricular adulta y su capacidad de proliferación *in vivo*. En primer lugar se cuantifica la proliferación de la población total de células de la zona subventricular. Para ello se administran siete dosis de 50 mg/kg de BrdU cada dos horas a animales adultos normales y deficientes de Ikaros y una hora después de la última dosis se sacrifican los animales para proceder al análisis. Las células que hayan incorporado BrdU serán aquellas que están proliferando. No se observan diferencias entre el ratón normal y el ratón deficiente de Ikaros en cuanto al número de células BrdU positivas totales, es decir, que no hay diferencias en cuanto al número de células proliferativas presentes en la zona subventricular de los animales de ambos genotipos (células BrdU+/zona subventricular ; wt: 31233 ± 3679 e Ik-/-: 33046 ± 4048 ; figura 31A y 31E). A continuación se analizan las poblaciones de progenitores individualmente. Se observa una disminución en el número de células GFAP positivas (células B) en la zona germinal del ratón deficiente de

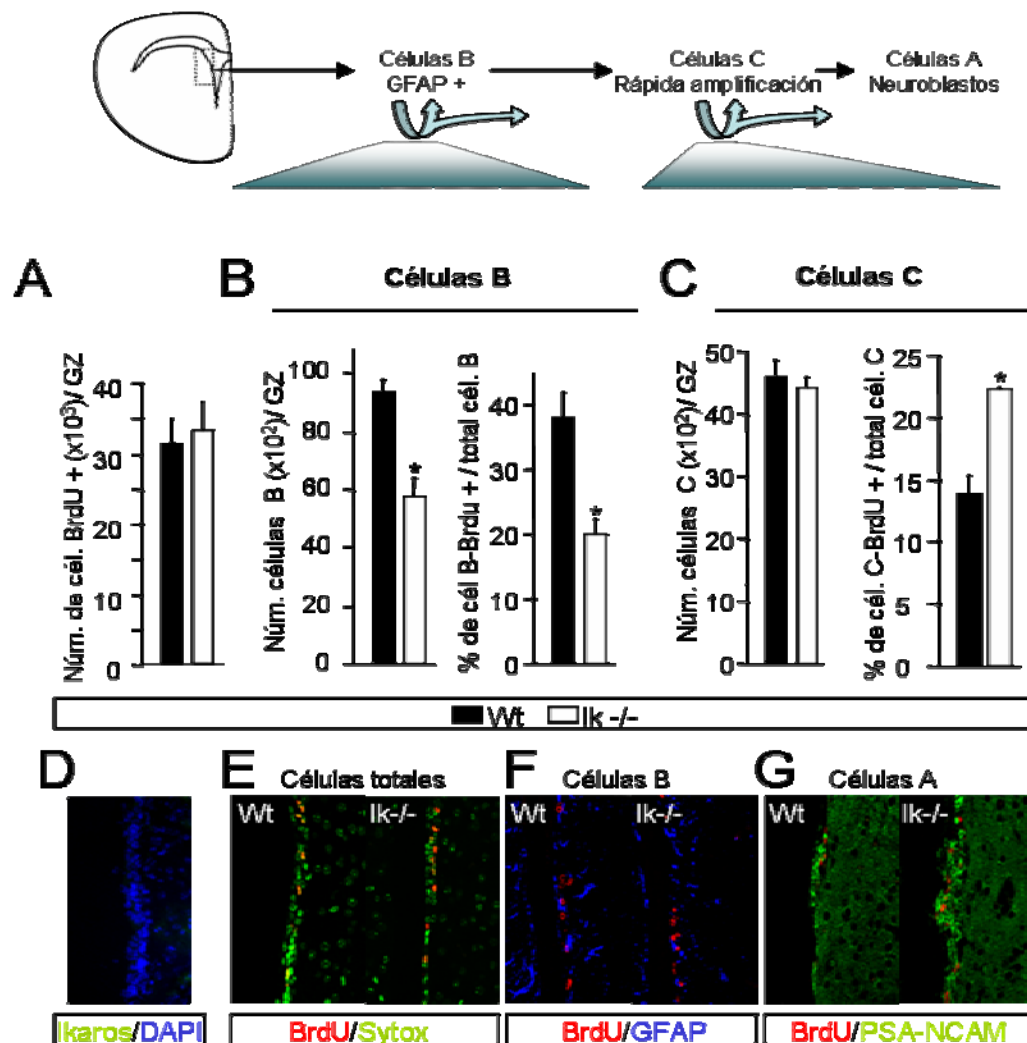


Figura 31. La falta de Ikaros durante el desarrollo produce alteraciones en la zona germinal embrionaria que alteran las poblaciones de progenitores de la zona subventricular adulta. Análisis de las poblaciones de progenitores de la zona subventricular adulta y de su tasa de proliferación *in vivo*. **A:** La proliferación en la zona germinal adulta se evalúa administrando 7 dosis de 50 mg/kg de BrdU cada dos horas a animales adultos normales (wt) y deficientes de Ikaros (Ik^{-/-}). Una hora después de la última dosis se sacrifican los animales y se procede al análisis. Se cuenta en número total de células BrdU positivas en la zona germinal (GZ) adulta. **B:** Análisis del número de células B en la zona germinal y del número de células B proliferativas, es decir células B-BrdU positivas. Esto último se expresa como el porcentaje de células B proliferativas respecto al número total de células B en la zona germinal. **C:** Análisis del número de células C en la zona germinal y del número de células C proliferativas, es decir células C-BrdU positivas. Esto último se expresa como el porcentaje de células C proliferativas respecto al número total de células C en la zona germinal. Las gráficas muestran los valores medios de al menos tres animales diferentes \pm SEM. La estadística se ha realizado utilizando el test *t de Student*. * $p < 0.05$. **D:** Fotomicrografía representativa de la falta de expresión de Ikaros en la zona subventricular adulta de un animal normal. **E-G:** Fotomicrografías representativas de los resultados obtenidos para el número total de células BrdU positivas (**E**), el número de células B GFAP-BrdU positivas (**F**) y el número de células A PSA-NCAM-BrdU positivas (**G**) en la zona germinal para el animal normal (wt) y deficiente de Ikaros (Ik^{-/-}).

Ikaros respecto al normal (células B/zona germinal; wt: 8928 ± 458 e Ik-/-: 5716 ± 61 ; figura 31B). Además, estas células presentan una menor capacidad proliferativa, como indica el reducido número de células doble positivas para BrdU-GFAP (porcentaje de células B-BrdU positivas/zona germinal; wt: $38,1 \pm 4,1$ e Ik-/-: $19,9 \pm 2,5$; figura 31B y 31F). Este resultado correlaciona con la reducción en la capacidad de auto-renovación observada en las neuroesferas primarias obtenidas de la zona subventricular de animal deficiente de Ikaros. Respecto a las células C, a pesar de que no se observan diferencias en el número total de estas células entre los animales de los dos genotipos estudiados (células C/zona germinal; wt: 45742 ± 2951 e Ik-/-: 43936 ± 2173 ; figura 31C), cuando estudiamos la proliferación de estas células observamos un incremento en el número de células C proliferativas en el ratón deficiente de Ikaros respecto al normal (porcentaje de células C-BrdU positivas/zona germinal; wt: $13,9 \pm 1,41$ e Ik-/-: $22,3 \pm 0,1$; figura 31C). Por último, en cuanto a las células A no se observan diferencias entre el animal normal y el deficiente de Ikaros en el número total (datos no mostrados) aunque se observa una disminución en el número de neuroblastos proliferativos (figura 31G). Así pues, los resultados obtenidos muestran que en la zona subventricular adulta del ratón deficiente de Ikaros existe una reducción en el número de células B, mientras que las otras dos poblaciones no se encuentran afectadas, lo cual correlaciona con la disminución en la capacidad de auto-renovación observada para las neuroesferas adultas generadas a partir de animales deficientes de Ikaros. Además, la proliferación de las células A y B se encuentra disminuida en el ratón deficiente de Ikaros mientras que la proliferación de las células C está incrementada significativamente y este incremento en la tasa de proliferación de las células de rápida amplificación puede ser el responsable del incremento de proliferación observado en las neuroesferas obtenidas de la zona subventricular adulta del ratón deficiente de Ikaros.

8. Ikaros interviene en la diferenciación de las neuronas estriatales de proyección encefalinérgicas.

Una vez demostrado que Ikaros interviene en la diferenciación de neuronas estriatales de generación tardía a través de la salida de ciclo de precursores neurales de la zona germinal, procedemos a estudiar qué tipo de neuronas está diferenciando este factor de transcripción. Teniendo en cuenta que el 95% de las neuronas GABAérgicas del núcleo estriado son neuronas de proyección y que éstas se generan a partir de precursores de la zona germinal de la LGE, a continuación se realizan estudios de doble marcaje para Ikaros y marcadores de estas neuronas de proyección estriatales en muestras de cerebros a diferentes estadios del desarrollo. En primer lugar, se realiza una doble inmunohistoquímica para este factor de transcripción y DARPP-32 en cerebros de animales de E18,5 que corresponde a la edad de máxima expresión de Ikaros (figura 32A). El doble marcaje muestra una distribución complementaria de estos dos marcadores, estando Ikaros mayoritariamente expresado en la parte dorsomedial, tal y como se ha descrito anteriormente, mientras que la expresión de DARPP-32 se encuentra localizada en la parte más ventrolateral de la zona del manto estriatal, probablemente marcando las neuronas estriatales de generación temprana. Esta distribución nos sugiere que tal vez las células que están saliendo de la zona subventricular para diferenciarse hacia fenotipos neuronales maduros en la zona del manto inicialmente expresan Ikaros y a medida que migran radialmente a las zonas más ventrolaterales dejan de expresar Ikaros para expresar marcadores neuronales más maduros como DARPP-32. Al analizar la expresión de estos dos marcadores en el estadio postnatal P3 observamos que a pesar de que existen áreas donde se expresan ambos marcadores simultáneamente, éstos siguen presentando un patrón diferencial, de manera que DARPP-32 se encuentra marcando los estriosomas mientras que Ikaros marca la matriz (figura 32B).

En segundo lugar, se analiza la colocalización entre Ikaros y marcadores específicos de las dos poblaciones de neuronas de proyección estriatales como

encefalina y sustancia P, en el núcleo estriado de ratones a la edad postnatal P3.

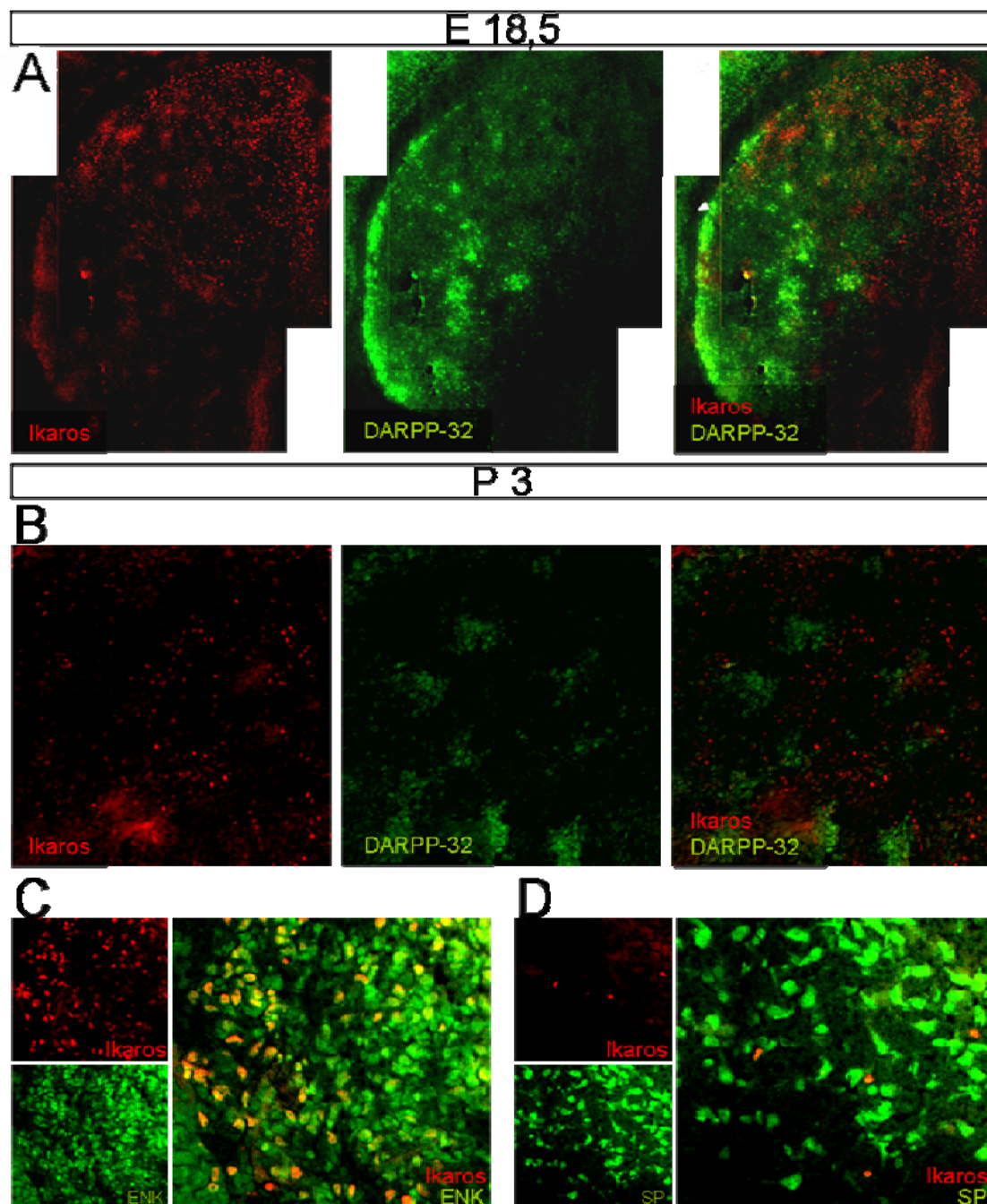


Figura 32. Las células que expresan Ikaros son neuronas estriatales de proyección encefalinérgicas. Estudios de doble inmunohistoquímica contra Ikaros y marcadores de las neuronas de proyección estriatales en cortes coronales de cerebros a E18,5 y P3. **A:** Distribución opuesta de Ikaros (localización dorsomedial) y DARPP-32 (localización ventrolateral) en el núcleo estriado a E18,5. **B:** Distribución opuesta de Ikaros (localización en la matriz) y DARPP-32 (localización en los estriosomas) en el núcleo estriado a P3. **C:** Colocalización entre Ikaros y encefalina (ENK) un marcador de una subpoblación de las neuronas estriatales de proyección a la edad postnatal P3. **D:** No se observa colocalización alguna entre Ikaros y el marcador de la otra subpoblación de neuronas estriatales de proyección sustancia P (SP).

Las doble inmunohistoquímicas muestran un 100% de colocalización entre Ikaros y encefalina, pues todas las células que expresan Ikaros son positivas para encefalina (figura 32C), aunque no al revés. Por el contrario, no se observa ningún tipo de colocalización entre Ikaros y sustancia P (figura 32D) ya que la distribución de ambos marcadores vuelve a ser opuesta, es decir, que la expresión de sustancia P se encuentra mayoritariamente en la zona ventrolateral del manto mientras que Ikaros se expresa en la zona más dorsomedial. A la vista de estos resultados hipotetizamos que Ikaros está implicado en la generación de neuronas de proyección estriatales encefalinérgicas.

Para corroborar esta hipótesis caracterizamos histológicamente el núcleo estriado del ratón deficiente de Ikaros. Primero se mide el volumen de dicho núcleo y observamos una reducción significativa del volumen del núcleo estriado en el ratón deficiente de Ikaros respecto al normal (wt: $9,3 \pm 0,2 \text{ mm}^3$ e Ik-/-: $6,3 \pm 0,6 \text{ mm}^3$; figura 33A, B). A pesar de que el volumen del cerebro es menor en el ratón deficiente de Ikaros respecto al normal como podemos observar en la reducción del volumen del hemisferio total (wt: $144,44 \pm 5,03 \text{ mm}^3$ e Ik-/-: $117,21 \pm 4,04 \text{ mm}^3$; figura 33A, B), el núcleo estriado presenta una reducción específica que es relativamente más importante y además se mantiene en el tiempo, ya que el mismo resultado ha sido observado a E18,5. Con el fin de determinar si la reducción del volumen del núcleo estriado es debida a una reducción en el número de células, a continuación se cuantifica el número total de neuronas estriatales mediante el recuento de células NeuN positivas. No se observan diferencias en cuanto a la densidad neuronal (células NeuN positivas $\times 10^3/\text{mm}^3$; wt: 110954 ± 2606 e Ik-/-: 110001 ± 7224 ; figura 33C), sin embargo, el animal deficiente de Ikaros presenta una reducción significativa del número total de neuronas respecto al normal (células NeuN positivas/núcleo estriado; wt: 920018 ± 19655 e Ik-/-: 661554 ± 28119). El núcleo estriado presenta diferentes poblaciones neuronales, las cuales son cuantificadas a continuación con el fin de estudiar si la falta de Ikaros está comprometiendo específicamente alguna de ellas. En primer lugar

cuantificamos las neuronas de proyección estriatales contando el número de células DARPP-32 positivas (figura 33D). La falta de Ikaros produce una pequeña reducción en la densidad estriatal de las neuronas de proyección

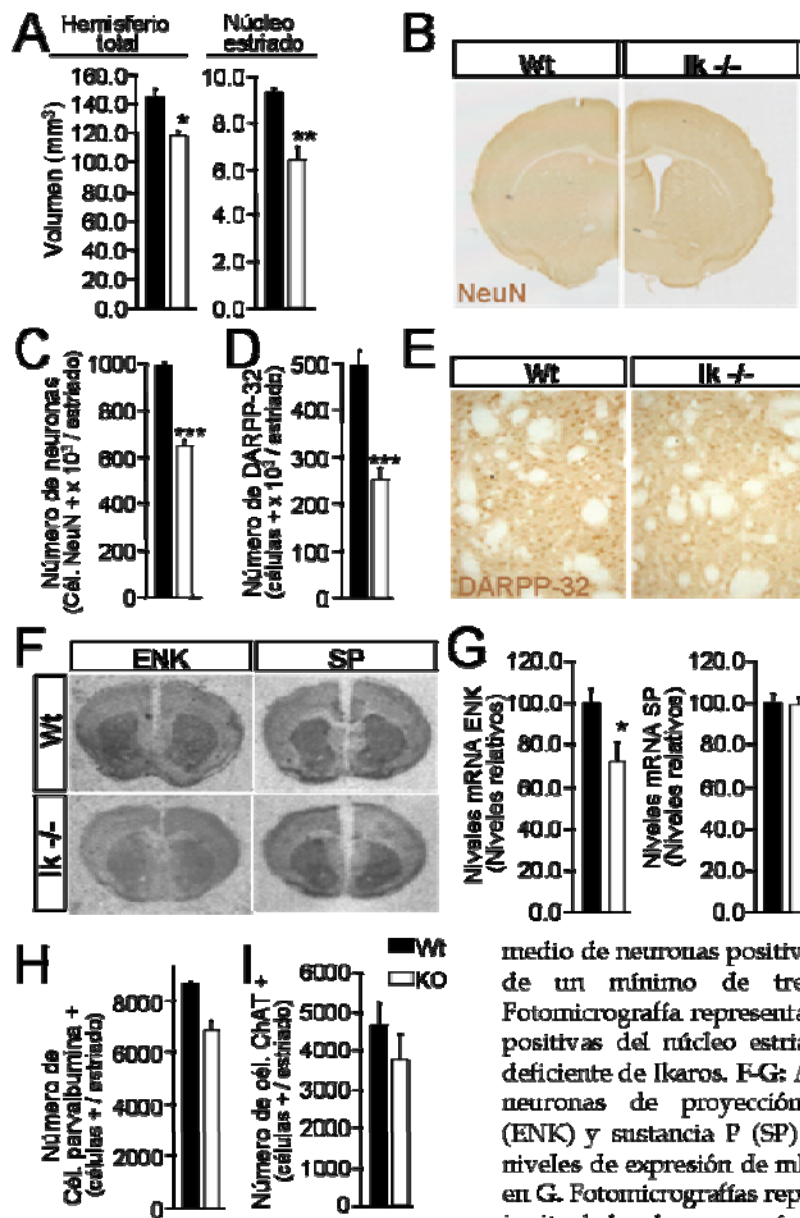


Figura 33. La falta de Ikaros durante el desarrollo del núcleo estriado compromete selectivamente la diferenciación de las neuronas estriatales encefalinérgicas de proyección. **A:** Determinación de los volúmenes del hemisferio total y del núcleo estriado para el ratón deficiente de Ikaros (Ik-/-) y el ratón normal (wt). **B:** Fotomicrografía representativa de inmunohistoquímica contra NeuN realizada en cortes coronales de cerebros de animales de los dos genotipos (wt e Ik-/-). **C-D:** Determinación del número total de neuronas estriatales y de neuronas de proyección GABAérgicas por recuento de las células NeuN positivas (**C**) y DARPP-32 positivas (**D**), respectivamente, en el núcleo estriado. Los resultados se expresan como el número

medio de neuronas positivas x 10³ en el núcleo estriado de un mínimo de tres animales diferentes. **E:** Fotomicrografía representativa de neuronas DARPP-32 positivas del núcleo estriado de un animal normal y deficiente de Ikaros. **F-G:** Análisis de las poblaciones de neuronas de proyección estriatales encefalinérgica (ENK) y sustancia P (SP) por hibridación *in situ*. Los niveles de expresión de mRNA relativos se representan en **G**. Fotomicrografías representativas de la hibridación *in situ* de los dos neuropéptidos para animales deficientes

de Ikaros (Ik-/-) y normales (wt) se muestran en **F**. **H-I:** Determinación del número de interneuronas estriatales GABAérgicas y colinérgicas por recuento del número de células parvalbumina positivas (**H**) y ChAT positivas (**I**), respectivamente, en el núcleo estriado. Los resultados se expresan como el número medio de células positivas por núcleo estriado de un mínimo de tres animales. Barras error = SEM. La estadística se ha realizado utilizando el test *t* de Student: **p*<0.05, ***p*<0.005 y ****p*<0.001 relativo al animal normal.

(células DARPP-32 positivas x 10³ / mm³; wt: 55105 ± 7041 e Ik-/-: 41556 ± 7627; figura 33D) que supone una dramática reducción en el número total de neuronas DARPP-32 positivas presentes en el animal deficiente de Ikaros respecto al normal (células DARPP-32 positivas/núcleo estriado; wt: 456471 ±

14028 e Ik-/-: 262374 ± 27924). En la figura 33E se puede observar una fotografía representativa de la inmunohistoquímica contra DARPP-32 en un animal normal y deficiente de Ikaros. Existen dos poblaciones de neuronas de proyección GABAérgicas, las que proyectan al *globus pallidus* y expresan el neuropéptido encefalina y las que proyectan a la sustancia nigra *pars reticulata* y expresan sustancia P. A continuación se analizan estas dos poblaciones para lo que se realiza una hibridación *in situ* con sondas que reconocen específicamente encefalina y sustancia P y se cuantifican los niveles de expresión de mRNA de estos dos neuropéptidos por densitometría (ver fotografías representativas en figura 33F). No se observan diferencias en los niveles de expresión de sustancia P entre el animal deficiente de Ikaros y el animal normal (figura 33G). Sin embargo, cuando se analizan los niveles relativos de expresión de encefalina se observa una reducción significativa en el animal que no expresa Ikaros respecto al animal que sí expresa el factor de transcripción. Es decir, que la falta de Ikaros está comprometiendo selectivamente la población encefalinérgica de las neuronas estriatales de proyección. Finalmente, para determinar si Ikaros también afecta a la generación de las interneuronas estriatales, se cuantifica el número de células parvalbúmina y ChAT positivas que corresponden a las interneuronas GABAérgicas y colinérgicas, respectivamente (figura 33I, H). Ikaros no interviene en la generación de las interneuronas estriatales ya que no se observan diferencias entre el animal deficiente de Ikaros y el animal normal en cuanto al número de células parvalbúmina positivas (células parvalbúmina positivas $\times 10^3/\text{mm}^3$; wt: 1013 ± 16 e Ik-/-: 1025 ± 110) ni en cuanto al número de células ChAT positivas (células ChAT positivas $\times 10^3/\text{mm}^3$; wt: 525 ± 71 e Ik-/-: 616 ± 72).

9. La sobre-expresión de Ikaros-1 incrementa la determinación encefalinérgica de precursores neurales

Una vez establecido el claro papel de Ikaros en la diferenciación de las neuronas estriatales de proyección encefalinérgicas y dado que este factor de transcripción ha sido descrito como uno de los reguladores de la expresión del gen de la encefalina, a continuación estudiamos si uno de los mecanismos por

los que Ikaros interviene en la diferenciación de precursores neurales hacia neuronas GABAérgicas de proyección encefalinérgicas es a través de la inducción de la expresión del gen de la encefalina.

Para ello se sobre-expresa la isoforma 1 de Ikaros en una línea de NSC que después se somete a diferenciación. A 1, 2, 3 y 5 DIV después de la transfección se toman muestras de las células en diferenciación que se analizan por PCR cuantitativa para determinar los niveles de expresión de encefalina (figura 34). Ikaros induce unos elevados niveles de expresión de encefalina en las NSC desde el primer día de transfección. Esta expresión disminuye con el paso de los días coincidiendo con la disminución de la sobre-expresión de Ikaros aunque como podemos observar en la figura 34 B a los 5 DIV continuamos teniendo unos niveles de expresión de encefalina de casi mil veces los niveles del control.

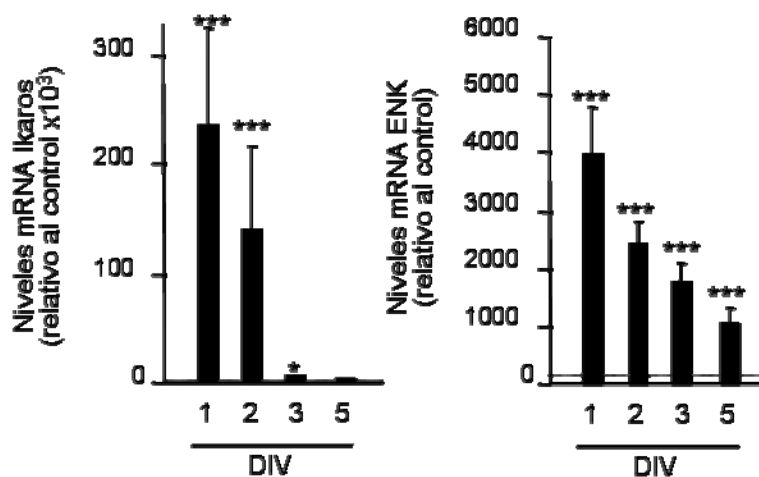


Figura 34. Ikaros induce la expresión de encefalina en precursores neurales. Se sobre-expresa Ikaros 1 en la línea de NSC C17.2 y muestras a 1, 2, 3 y 5 DIV de diferenciación son analizadas por PCR cuantitativa para determinar los niveles de expresión de Ikaros 1 y encefalina (ENK). Los resultados son expresados como los

los niveles relativos de expresión medios \pm SEM a los diferentes días de diferenciación respecto a la expresión de las células no transfectadas considerada como el 100% de un mínimo de tres muestras diferentes. La estadística se ha realizado utilizando el test *t* de Student. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ relativo a la expresión de las células no transfectadas.

10. Ikaros-1 regula el desarrollo encefalinérgico estriatal por debajo de la vía de los factores de transcripción de la familia de Dlx.

Se han descrito diversos factores de transcripción que intervienen en el desarrollo del núcleo estriado y en concreto en la generación de las neuronas que lo forman. La familia de los factores de transcripción Dlx formada por seis miembros distintos es una de ellas. Se ha descrito que Dlx-1 y Dlx-2 se expresan

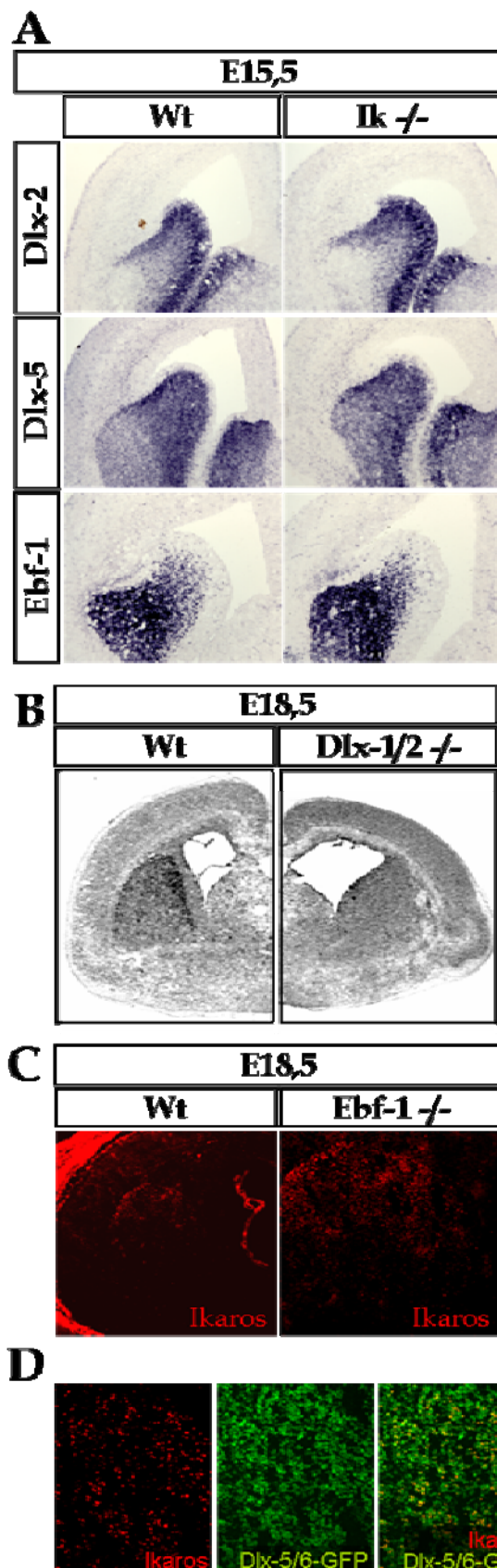


Figura 35. Ikaros interviene en el desarrollo de las neuronas encefalínérgicas de proyección por debajo de la vía de los factores de transcripción de la familia de Dlx. Para determinar la vía por la cual Ikaros interviene en el desarrollo del núcleo estriado se estudia la expresión de diversos factores de transcripción como Dlx-2, Dlx-5 y Ebf-1 por hibridación *in situ* en ratones deficientes de Ikaros y ratones normales a la edad embrionaria de E15,5 (A). Puesto que no se encuentran diferencias se realiza la misma aproximación pero al revés, es decir, se analiza la expresión de Ikaros por hibridación *in situ* en animales deficientes de Dlx-1 y 2 (*Dlx-1/2* $-/-$) y animales normales (wt) (B) y se analiza la expresión de Ikaros por inmunohistoquímica en animales deficientes de Ebf-1 (*Ebf-1* $-/-$) y normales (wt) a la edad embrionaria de E18,5 en los dos casos (C). Por último, se analiza la expresión de Ikaros en células EGFP positivas derivadas de precursores que han expresado los factores de transcripción Dlx-5/6 en el núcleo estriado de animales *Dlx-5/6*-GFP a la edad de E18,5 por doble inmunohistoquímica (D).

en precursores de la zona germinal del primordio estriatal, mientras que Dlx-5 y Dlx-6 se expresan en precursores más maduros de la zona subventricular y el

manto. Además, precursores Dlx-1 y Dlx-2 positivos y una población de precursores Dlx-5 y Dlx-6 positivos intervienen en la generación tardía de neuronas estriatales. Ebf-1 es otro factor de transcripción que se expresa en el manto del primordio estriatal y que interviene en la generación de las neuronas tempranas del núcleo estriado. Con estos precedentes y habiendo determinado la implicación de Ikaros en la generación de neuronas encefalínérgicas de proyección estriatales se consideró interesante estudiar si la señalización mediada por Ikaros se encuentra dentro de la vía de señalización de los factores de transcripción de la familia de Dlx o Ebf-1 o si por el contrario actúa por una vía paralela no relacionada. Para ello, en primer lugar se estudia por hibridación *in situ* la expresión de los factores de transcripción Dlx-2, Dlx-5 y Ebf-1 en el núcleo estriado de ratones deficientes de Ikaros y normales a la edad embrionaria E15,5 (figura 35A). No se observan diferencias en cuanto a la expresión de ninguno de estos tres factores de transcripción entre el ratón deficiente de Ikaros y el ratón normal a la edad embrionaria E15,5. Estos resultados sugieren o bien que la señalización de Ikaros es a través de otra vía independiente de Dlx y Ebf-1 o bien que Ikaros se encuentra por debajo de estos factores en la vía de señalización. Para comprobar esta última hipótesis se analiza por hibridación *in situ* la expresión de Ikaros en ratones deficientes de Dlx-1/2 (Dlx-1/2 -/-) a la edad embrionaria E18,5 (figura 35B) y por inmunohistoquímica la expresión de Ikaros en ratones deficientes de Ebf-1 (figura 35C). A pesar de que no se observan diferencias en los niveles de expresión de Ikaros entre el ratón deficiente de Ebf-1 y el ratón normal (figura 35C), la expresión de Ikaros desaparece por completo en los ratones que no expresan los factores de transcripción Dlx-1/2. Es decir, que Ikaros interviene en el desarrollo del núcleo estriado por una vía independiente del factor de transcripción Ebf-1 que se encuentra por debajo de los factores de transcripción Dlx-1 y Dlx-2. A continuación para corroborar que las células que expresan Ikaros derivan de precursores que expresan Dlx se realizan estudios de colocalización para lo cual se utilizan los animales Dlx-5/6-GFP. En estos ratones aquellos precursores que hayan expresado los factores de transcripción

Dlx-5/6 expresarán EGFP de manera permanente lo cual permite realizar un seguimiento de dichos precursores. Se analizan estos animales a la edad embrionaria E18,5 por doble inmunohistoquímica contra Ikaros y EGFP (figura 35C). Se observa una colocalización total entre las células que expresan Ikaros y las células EGFP positivas, ya que todas las células Ikaros positivas lo son para EGFP. De estos resultados podemos concluir que Ikaros interviene en el desarrollo de neuronas de proyección estriatales encefalinérgicas por debajo de la vía de los factores de transcripción de la familia Dlx.