

*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*

## ***V. Discusión***



## **DISCUSIÓN**

El sistema nervioso es el órgano más complejo del cuerpo humano y a pesar del tiempo que lleva siendo objeto de estudio todavía hoy en día se desconocen los mecanismos exactos que gobiernan su desarrollo. El conocimiento de las poblaciones de precursores neurales que van a dar lugar a la generación de la inmensa diversidad neuronal existente en el cerebro, así como la caracterización de los patrones de expresión secuencial de factores de transcripción que siguen estos precursores que junto con la señalización derivada de factores extrínsecos solubles, modulan la determinación hacia linajes específicos, nos va a permitir entender como se desarrolla el sistema nervioso, y también como guiar la diferenciación de células madre hacia fenotipos neuronales concretos con el fin de instaurar terapias de sustitución celular en enfermedades neurodegenerativas como la corea de Huntington.

La enfermedad de Huntington cursa con la degeneración selectiva de las neuronas GABAérgicas de proyección estriatales, es por ello que el objetivo de la presente tesis ha sido el estudio de factores solubles extrínsecos así como de factores de transcripción que están implicados en la diferenciación de dichas neuronas. Para ello se han utilizado diferentes aproximaciones. En primer lugar se han utilizado ESC de ratón para el estudio de la implicación del ácido retinoico y el LIF, dos factores solubles extrínsecos, en la diferenciación de las neuronas GABAérgicas estriatales. El ácido retinoico es un potente factor neurogénico que ha sido ampliamente utilizado para inducir la diferenciación neuronal de ESC (Bain y col., 1996; Okada y col., 2004). Por su parte el LIF es un factor que se utiliza para mantener las células madre embrionarias en un estado indiferenciado. Sin embargo, diversos autores lo utilizan también en sus protocolos de diferenciación neuronal de dichas células (Tropepe y col., 2001; He y col., 2006) Nosotros hemos estudiado la interrelación entre estos dos factores en la diferenciación neuronal de ESC de ratón en cultivos a corto y largo plazo. Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con LIF inhibe la diferenciación neuronal inducida por el ácido retinoico. En segundo

lugar, el tratamiento con elevadas concentraciones de ácido retinoico en ausencia de factores de crecimiento induce una diferenciación neuronal madura que supone una reducción en la viabilidad de las ESC diferenciadas a largo plazo. Además el elevado número de neuronas derivadas de la diferenciación de las ESC tratadas con ácido retinoico *in vitro* no se observa tras el trasplante cerebral de éstas.

En una segunda aproximación al estudio de los factores implicados en la diferenciación de las neuronas GABAérgicas de proyección estriatales y teniendo en cuenta que en el desarrollo de los precursores estriatales intervienen diversos factores de transcripción, en la presente tesis se ha estudiado el papel del factor de transcripción Ikaros durante el desarrollo del núcleo estriado y en concreto en la diferenciación de las neuronas GABAérgicas estriatales. Nuestros resultados muestran que Ikaros-1 es esencial para la correcta generación de las neuronas encefalinérgicas estriatales a partir de la diferenciación de precursores neurales Dlx-2 positivos de la LGE. La salida de ciclo de los precursores que van a poblar la matriz del núcleo estriado requiere Ikaros-1 y la falta de éste afecta a las poblaciones de células madre de la zona germinal, no sólo durante el desarrollo sino también en el adulto. En consecuencia, el embrión nulo para Ikaros presenta una zona germinal mayor a expensas de una reducción en el volumen estriatal. El menor tamaño del núcleo estriado observado en el ratón deficiente de Ikaros en comparación con el ratón normal es debido a la disminución en el número de neuronas totales y en particular de la subpoblación encefalinérgica de las neuronas de proyección. Es decir, que Ikaros induce la diferenciación neuronal encefalinérgica en precursores neurales tal y como se confirma mediante experimentos de sobre-expresión de Ikaros-1.

El estudio de la implicación del ácido retinoico y el LIF, como factores solubles extrínsecos, y de Ikaros, como factor de transcripción, en la diferenciación de las neuronas GABAérgicas de proyección estriatales nos acerca un poco más al establecimiento de un método reproducible y controlado de diferenciación de células madre que permita la generación *ex vivo* de

neuronas GABAérgicas funcionales que puedan ser utilizadas para el trasplante en terapias sustitutivas de la enfermedad de Huntington.

### **1. LIF bloquea la diferenciación neuronal inducida por el tratamiento con ácido retinoico de ESC de ratón**

Las ESC de ratón se mantienen *in vitro* en un estado indiferenciado mediante el cultivo sobre una monocapa de fibroblastos inactivados mitóticamente y en presencia de LIF. Diversos autores establecen que el LIF, como factor que mantiene las ESC en un estado indiferenciado, debe ser eliminado del medio de cultivo para inducir la diferenciación neural de las ESC mediante la formación de agregados (Bain y col., 1995; Okabe y col., 1996). Sin embargo, otros autores demuestran que LIF juega un papel positivo en la diferenciación de ESC de ratón hacia un fenotipo neuronal (Murphy y col., 1994; Shimazaki y col., 2001; Tropepe y col., 2001; He y col., 2006). Nuestros resultados indican que las ESC de ratón se diferencian a neuronas cuando son agregadas para formar los llamados cuerpos embrioides en ausencia de este factor de crecimiento (LIF), lo cual es consistente con el modelo por defecto de la especificación neural (Smukler y col., 2006). También hemos demostrado que la presencia de LIF durante los dos primeros días de formación de cuerpos embrioides inhibe la diferenciación neuronal ya que bloquea el incremento de expresión de marcadores neuronales observado en la condición control, aunque por otro lado este tratamiento incrementa la viabilidad de los agregados. Estos resultados sugieren que LIF presenta un papel protector durante la formación de cuerpos embrioides. En esta misma línea se ha postulado que LIF podría ser muy importante para la transición de ESC a NSC formadoras de colonias, actuando principalmente como factor permisivo para mantener la supervivencia celular bajo unas condiciones de cultivo mínimas (Tropepe y col., 2001). Así pues, los efectos protectores de LIF podrían explicar el incremento que se produce en el número de cuerpos embrioides que contienen neuronas en presencia de este factor trófico (He y col., 2006), a pesar de que el número de neuronas por cada cuerpo embrioides sea muy bajo y, como mostramos nosotros

aquí, no produzca un incremento en la expresión global de marcadores neuronales.

El ácido retinoico, que actúa a través de sus receptores RAR $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , es uno de los factores neurogénicos más importantes (Bain y col., 1996; Dinsmore y col., 1996; Guan y col., 2001; Bosch y col., 2004; Okada y col., 2004; Goncalves y col., 2005). Nuestros resultados son consistentes con trabajos previos que muestran que el ácido retinoico induce la expresión de marcadores neuronales durante la diferenciación de las ESC de ratón. El incremento en la expresión de marcadores neuronales inducido por el ácido retinoico coincide tanto con una disminución del marcador neural temprano Sox-1, así como con una reducción en el número de células en proliferación. Estos resultados sugirieron que el tratamiento con ácido retinoico de las ESC de ratón durante la formación de cuerpos embrioides induce un fenotipo neuronal maduro a expensas de la proliferación celular. Además, y de acuerdo con trabajos previos (Bain y col., 1996; Dinsmore y col., 1996; Okada y col., 2004) la mayoría de neuronas obtenidas son GABAérgicas.

En nuestras condiciones de cultivo, demostramos que el efecto del ácido retinoico en la diferenciación neuronal es inhibido cuando los cuerpos embrioides se han tratado previamente con LIF (figura 36). Sin embargo, observamos que las ESC tratadas o no con LIF durante la formación de cuerpos embrioides presentan una reducción similar en los niveles de expresión de Oct-3/4 después del tratamiento con ácido retinoico. Estos resultados indican que estas células han sido diferenciadas bajo las dos condiciones, pero hacia determinaciones fenotípicas diferentes. Estos resultados coinciden con los obtenidos en trabajos previos en los que muestran que la adición de ácido retinoico al medio de cultivo de ESC supera el efecto de auto-renovación de LIF (Chen y col., 1996; Tighe y Gudas, 2004). Una posible explicación para los diferentes efectos producidos por el ácido retinoico en presencia o ausencia de LIF puede ser que en cada caso se esté activando una señalización específica que pueda estar influyendo a la expresión de los receptores de ácido retinoico.

De hecho, se ha descrito que la activación de la

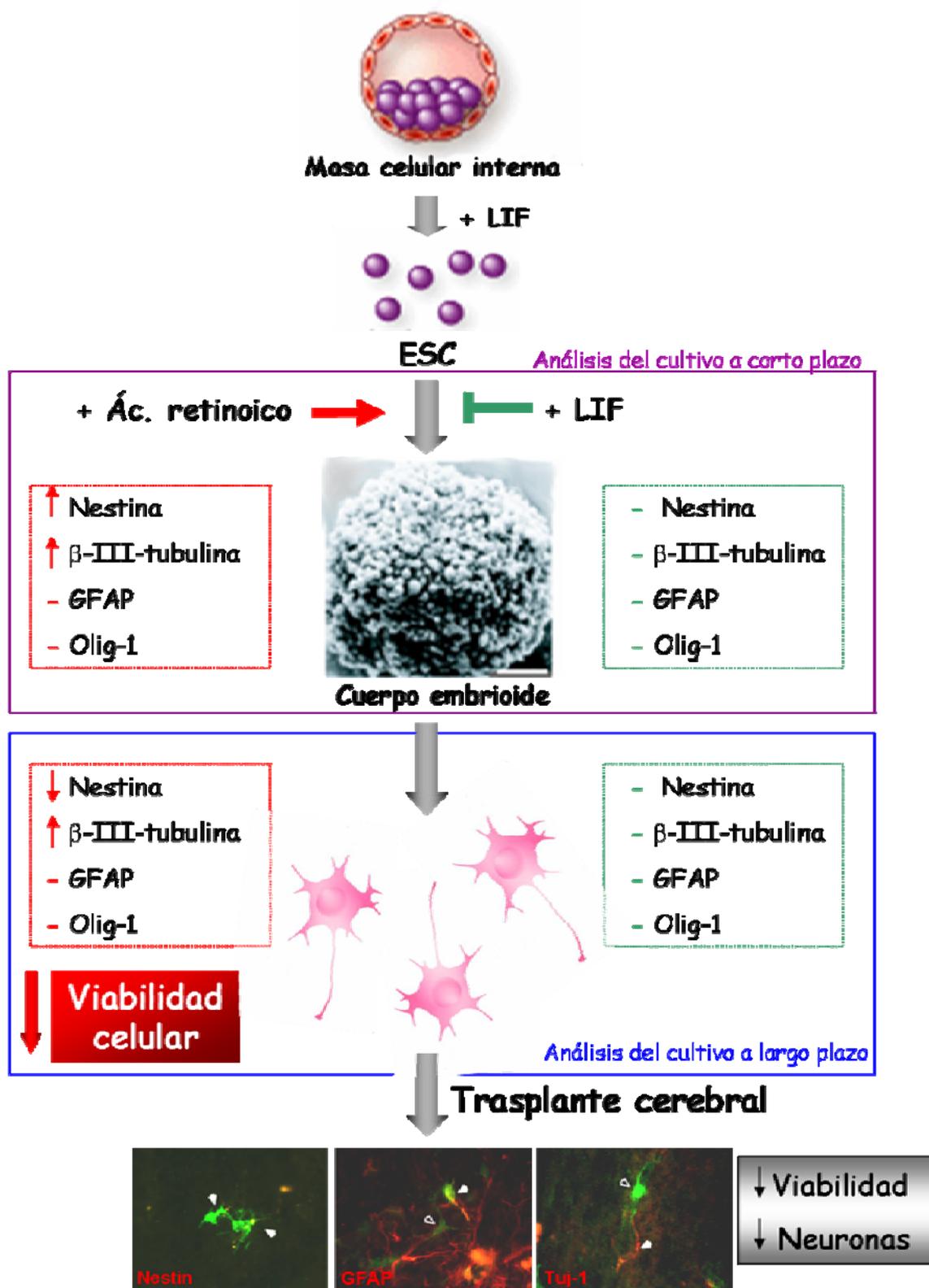


Figura 36. Esquema resumen de los efectos del ácido retinoico y LIF en la diferenciación neuronal de ESC.

señalización intracelular de JAK/STAT mediada por LIF modula la activación transcripcional de los receptores de ácido retinoico (Si y Collins, 2002). Nuestros resultados demuestran que el tratamiento con LIF de las ESC de ratón durante los dos primeros días de formación de cuerpos embrioides induce tanto una disminución de RAR $\beta$  como un incremento de RAR $\gamma$ . El primero (RAR $\beta$ ) ha sido asociado con procesos de diferenciación neuronal (Goncalves y col., 2005; Liao y Liu, 2005) mientras que RAR $\gamma$  se ha definido como un regulador fisiológico y farmacológico crítico de las células hematopoyéticas (Ludanyi y col., 2005; Purton y col., 2006). Además, se ha descrito que la activación de RAR $\beta$  pero no la de RAR $\alpha$  o RAR $\gamma$  incrementa la expresión de Islet-1, que es un factor de transcripción necesario para conseguir un fenotipo de motoneuronas maduro (Goncalves y col., 2005). De manera similar, un incremento en la expresión de RAR $\alpha$  y de RAR $\beta$  acompañado de la disminución de la expresión de RAR $\gamma$  han sido asociados con la diferenciación neuronal inducida por el ácido retinoico en células madre de carcinoma embrionario (Jonk y col., 1992; Yokota y Ohkubo, 1996). Así pues, los cambios que se producen en las diferentes subunidades de los receptores del ácido retinoico tras el tratamiento con LIF son los responsables de la inhibición de la diferenciación neuronal. Nuestros resultados también muestran que el tratamiento con ácido retinoico en ausencia de LIF, produce un elevado incremento de RAR $\beta$  pero no de RAR $\alpha$  o RAR $\gamma$ , lo cual sugiere el importante papel de esta subunidad del receptor en la diferenciación neuronal de las ESC de ratón. De acuerdo con estos resultados, se ha demostrado que la estimulación de RAR $\beta$  media la regulación genética durante el desarrollo del telencéfalo (Liao y col., 2005), particularmente en las poblaciones neuronales estriatales (Liao y Liu, 2005) donde un 95% de neuronas son GABAérgicas (Gerfen, 1992). A pesar de que los resultados obtenidos parecen implicar a la subunidad RAR $\beta$  en la diferenciación neuronal inducida por el ácido retinoico en ESC de ratón, deberían llevarse a cabo más experimentos utilizando agonistas y/o antagonistas específicos de las tres subunidades de los receptores del ácido retinoico para poder asegurar específicamente cual de ellas está implicada en la diferenciación neuronal de las

ESC de ratón. Sin embargo, la falta de agonistas y/o antagonistas específicos comerciales no nos ha permitido llevar a cabo dichos estudios.

El ácido retinoico puede inducir la diferenciación de ESC no sólo hacia fenotipos neuronales, si no también hacia fenotipos gliales (Laeng y col., 1994; Wohl y Weiss, 1998; Jang y col., 2004). Sin embargo, bajo nuestras condiciones de diferenciación no observamos ningún incremento en la expresión de marcadores gliales ni en presencia ni en ausencia de LIF. El tratamiento con ácido retinoico a las concentraciones utilizadas en nuestro trabajo, no afecta a la expresión del marcador astrocítico GFAP y de forma similar no detectamos ningún cambio en los niveles de expresión de marcadores de oligodendrocitos. De acuerdo con trabajos previos, el número de oligodendrocitos es muy bajo en todas las condiciones estudiadas (Okabe y col., 1996). Así pues, podemos concluir que el ácido retinoico, ni en presencia ni en ausencia de LIF, induce la determinación hacia fenotipos gliales de las ESC de ratón.

## ***2. El tratamiento de cuerpos embrioides con ácido retinoico produce neuronas post-mitóticas que comprometen la viabilidad del cultivo a largo plazo***

La mayoría de estudios de diferenciación de ESC de ratón en los que se utiliza ácido retinoico como inductor neural examinan los efectos de este factor neurogénico tras la formación de los cuerpos embrioides. Sin embargo, la diferenciación de ESC para ser utilizadas en trasplantes relacionados con la terapia de enfermedades neurodegenerativas requiere la evaluación a largo plazo después del tratamiento con ácido retinoico. Por esta razón, a continuación estudiamos seis días después de la finalización del tratamiento, durante la fase de selección celular de precursores neurales las repercusiones de la administración de este factor neurogénico. Observamos que después del tratamiento con ácido retinoico las ESC diferenciadas muestran una disminución concentración-dependiente de los niveles de expresión del marcador de precursores neurales Nestina así como un incremento en los niveles de expresión del marcador neuronal  $\beta$ -III-tubulina en ausencia de LIF

(figura 36). Por tanto podemos concluir que el efecto del ácido retinoico en la diferenciación neuronal observado al final de la formación de cuerpos embrioides se mantiene seis días después de su administración y además va un paso más allá ya que los precursores neurales nestina positivos disminuyen a expensas de un incremento en el número de neuronas  $\beta$ -III-tubulina positivas. Sin embargo, el número de cuerpos embrioides viables que se adhieren y sobreviven está severamente reducido después del tratamiento con ácido retinoico, lo que sugiere que las ESC que se han diferenciado hacia fenotipos neuronales maduros durante la formación de los cuerpos embrioides no pueden ser mantenidas en estas condiciones de cultivo proliferativas. Esto se corrobora con el incremento en el número de células con núcleos fragmentados observado en los cuerpos embrioides tratados con ácido retinoico en ausencia de LIF. Así mismo, el número de células totales 6 días después del tratamiento con ácido retinoico también está disminuido. Es decir, que el tratamiento de ESC de ratón con elevadas concentraciones de este factor neurogénico en ausencia de LIF produce una diferenciación neuronal a largo plazo pero al mismo tiempo compromete su viabilidad.

### ***3. La diferenciación in vitro de las ESC de ratón previene la formación de teratocarcinomas después del trasplante cerebral***

Con el fin de estudiar el comportamiento de las ESC pre-diferenciadas *in vitro* con ácido retinoico después del trasplante cerebral, ESC de ratón diferenciadas *in vitro* en ausencia de LIF y tratadas o no con ácido retinoico se trasplantan en el núcleo estriado de ratones adultos y se compara su comportamiento con el de ESC no diferenciadas trasplantadas. Nuestros resultados muestran que la formación de teratocarcinomas se reduce considerablemente tras el trasplante de ESC pre-diferenciadas *in vitro*, con respecto a los trasplantes de ESC no diferenciadas. Estos teratocarcinomas prácticamente desaparecen especialmente cuando las ESC han sido tratadas con concentraciones moderadas de ácido retinoico. Sin embargo, no se observan diferencias en cuanto al número de neuronas detectadas tras el trasplante de

ESC diferenciadas con o sin ácido retinoico. Es más, se observan muy pocas células con fenotipo neuronal o glial después del trasplante de células madre embrionarias diferenciadas (figura 36). Por el contrario, un trabajo previo había demostrado que ESC diferenciadas con ácido retinoico y trasplantadas en un núcleo estriado lesionado con ácido quinolínico mantienen su estado diferenciado (Dinsmore y col., 1996). La discrepancia entre nuestros presentes resultados, en los que las ESC pre-diferenciadas son trasplantadas en un núcleo estriado no lesionado, y los resultados descritos por Dinsmore y colaboradores podrían explicarse por los mecanismos que se activan cuando se producen lesiones o degeneración, que regulan la diferenciación neuronal y la conectividad de las células trasplantadas (Sotelo y varado-Mallart, 1991; Snyder y col., 1997). De hecho, nuestro grupo (Pineda y col., 2007) y otros (Lundberg y col., 1997) han demostrado que existen diferencias entre NSC trasplantadas en núcleos estriados de animales lesionados versus no lesionados.

Existen numerosos protocolos de diferenciación de ESC hacia fenotipos neuronales en los que se utiliza el tratamiento con ácido retinoico consiguiendo un gran incremento en la inducción neuronal (Bain y col., 1996; Dinsmore y col., 1996; Guan y col., 2001; Bosch y col., 2004; Okada y col., 2004; Goncalves y col., 2005). Sin embargo, el análisis de la diferenciación se ha realizado en la mayoría de los casos a corto plazo y no se ha estudiado la viabilidad del cultivo a largo plazo, la cual va a ser necesaria a la hora de utilizar las ESC diferenciadas para el uso en terapia celular. A la vista de los resultados obtenidos en esta tesis podemos concluir que el tratamiento de las ESC de ratón con ácido retinoico induce una diferenciación neuronal que se mantiene en el tiempo, y que además, reduce significativamente la generación de teratomas tras el trasplante cerebral. Sin embargo, este tratamiento nos está afectando la viabilidad del cultivo a largo plazo, aunque ello no supone un incremento en el número de neuronas obtenidas tras el trasplante cerebral con respecto a la diferenciación sin ácido retinoico. Es decir, que este factor neurogénico nos está diferenciando las ESC aceleradamente hacia fenotipos maduros que no son capaces de

sobrevivir largo tiempo en el cultivo ni soportar el estrés del trasplante intracerebral.

Con el fin de establecer un protocolo de diferenciación de ESC hacia un fenotipo neuronal, que nos permita disponer de una población homogénea de precursores neurales viables se podría utilizar un método de inducción neural de ESC en el que no se realicen tratamientos con factores, seguido de un método de selección. Esto nos permitiría disponer de una población neural homogénea sobre la que ensayar diversos factores que guíen la diferenciación hacia el fenotipo deseado, que en nuestro caso es el GABAérgico estriatal. Dados los presentes resultados, uno de estos factores podría ser el ácido retinoico por ser un potente factor neurogénico. Además se ha descrito que está implicado durante el desarrollo del telencéfalo en la determinación de fenotipos estriatales induciendo la expresión de factores de transcripción tales como Meis-2 (Oulad-Abdelghani y col., 1997) o Nolz-1 (Chang y col., 2004), que son factores que intervienen específicamente en la determinación neuronal estriatal. De hecho datos preliminares obtenidos en nuestro laboratorio muestran que el tratamiento de células madre embrionarias con ácido retinoico incrementa la expresión de Nolz-1. Así pues, podría ser interesante utilizar el ácido retinoico en estadios más avanzados de la diferenciación de las ESC, es decir, cuando ya dispongamos de una población homogénea de precursores neurales con el fin de guiar su diferenciación hacia fenotipos estriatales concretos que puedan ser utilizados para la aplicación en terapias de sustitución celular para la enfermedad de Huntington.

La expresión de factores de transcripción por parte de progenitores neurales es otro de los mecanismos que intervienen en el control de la determinación celular durante el desarrollo cerebral, probablemente mediante la modulación de la expresión de genes específicos de linajes. Diversos factores de transcripción están implicados en el desarrollo de los precursores estriatales siguiendo patrones de expresión secuenciales. Entre ellos se encuentran los genes de la familia de Dlx que se expresan en precursores neurales de las

eminencias ganglionares, definiendo distintos estadios de diferenciación (Eisenstat y col., 1999) e interviniendo en la generación tardía de las neuronas estriatales de la matriz (Anderson y col., 1997). El factor de transcripción Ebf-1 también juega un papel importante en el desarrollo del núcleo estriado. Éste se expresa exclusivamente en la zona del manto (Garel y col., 1999) donde regula la diferenciación temprana de las neuronas estriatonigrales, sustancia P positivas (Lobo y col., 2006). Sin embargo, ningún gen ha sido implicado en la determinación de la población neuronal encefalinérgica del núcleo estriado, que es la que degenera en la enfermedad de Huntington y en la que nosotros estamos interesados. Tan solo un factor de transcripción tipo-Ikaros ha sido relacionado con la regulación del gen de la encefalina (Dobi y col., 1997). Ikaros es un miembro de una familia de proteínas que se unen a DNA que son necesarias para el desarrollo de los linfocitos (Georgopoulos, 2002). Diversas isoformas de Ikaros son capaces de activar la transcripción de genes cuando éstos se unen en *cis* a los sitios de unión a Ikaros (Molnar y Georgopoulos, 1994; Wargnier y col., 1998), tal y como ha sido sugerido para el gen de la encefalina (Dobi y col., 1997). Ikaros también interviene en la modulación de la expresión de genes que funcionan como efectores de ciclo celular y en la regulación negativa de la transición G1-S (Gomez-del y col., 2004). Se ha mencionado la expresión de Ikaros en el cerebro en diversos trabajos (Georgopoulos y col., 1992; Molnar y Georgopoulos, 1994; Willett y col., 2001), incluso se ha descrito que la expresión de Ikaros en el cerebro podría estar restringida a la LGE (Kohtz y col., 1998), pero en ningún caso se ha caracterizado ni su localización específica ni su función durante el desarrollo cerebral. Todas estas evidencias nos han llevado a plantearnos el estudio de la implicación de Ikaros en el desarrollo del núcleo estriado y en concreto de las neuronas de proyección estriatales encefalinérgicas.

#### ***4. Ikaros-1 se expresa específicamente en las neuronas estriatales en desarrollo***

Nuestros resultados demuestran que durante el desarrollo cerebral Ikaros se expresa específicamente en el núcleo estriado siguiendo un patrón de expresión temporal que tiene su inicio a E14,5 y finaliza a P3, presentando un pico a E18,5 que coincide con la diferenciación de las neuronas estriatales de proyección. Sin embargo, ningún otro miembro de la familia de Ikaros, incluyendo Eos, Aiolos y Helios muestran una expresión específica durante el desarrollo del núcleo estriado (datos no mostrados). El factor de transcripción Ikaros presenta 8 isoformas diferentes (para revisión ver Rebollo y Schmitt, 2003). No obstante, nuestros resultados muestran que los niveles más altos de expresión durante el desarrollo telencefálico corresponden a la isoforma 1, la expresión de la cual está regulada en el tiempo no siendo detectada en estadios postnatales.

Ikaros-1 se expresa específicamente en el margen entre la zona subventricular y la zona del manto del núcleo estriado, presentando un gradiente de expresión dorsomedial a ventrolateral. Teniendo en cuenta que el 95% de las células que van a poblar el núcleo estriado son neuronas de proyección que se generan a partir de precursores de la zona germinal de la LGE (Deacon y col., 1994; Campbell y col., 1995), las cuales migran al manto siguiendo una trayectoria radial (Halliday y Cepko, 1992; De Carlos y col., 1996), postulamos que Ikaros puede estar jugando un papel importante en la diferenciación de precursores neurales que salen de la zona germinal en proliferación participando en la definición territorial del manto. De acuerdo con esta hipótesis, estudios de co-localización en cultivos primarios muestran que Ikaros-1 se expresa en células  $\beta$ -III-tubulina y GAD positivas, dos marcadores característicos de neuronas post-mitóticas inmaduras (Menezes y Luskin, 1994; Kuppens y col., 2000).

### 5. *Ikaros interviene en la diferenciación de precursores neurales de la LGE*

Para comprobar esta hipótesis, estudiamos a continuación la diferenciación de las neuronas durante el desarrollo estriatal. Nuestros resultados muestran que Ikaros está implicado en la neurogénesis estriatal tardía ya que la falta de este factor de transcripción durante el desarrollo del núcleo estriado produce un bloqueo de la diferenciación neuronal entre E14,5-E16,5, que va acompañado de un incremento en la proliferación de la zona germinal. Esto produce una reducción específica del volumen estriatal a expensas de un incremento en el volumen de la zona germinal. Es decir, que Ikaros-1 afecta a la proliferación de los precursores neurales presentes en la zona germinal, a pesar de que se expresa, tal y como se ha descrito anteriormente, en el margen entre la zona subventricular y la zona del manto y no en las zonas proliferativas de la LGE. Se ha propuesto que las NSC de la LGE se vuelven post-mitóticas y empiezan a adquirir características específicas de determinados tipos celulares en la zona subventricular (Bhide, 1996). Sin embargo, las neuronas post-mitóticas encontradas en esta área siguen una migración tangencial que no va dirigida a la formación del núcleo estriado (Menezes y Luskin, 1994). Así pues, nosotros postulamos que los precursores neurales de la zona germinal de la LGE destinados a poblar el núcleo estriado generan neuronas post-mitóticas en el margen entre la zona subventricular y la zona del manto y esto es debido al menos en parte al arresto del ciclo celular producido por Ikaros-1. De esta manera, cuando no se da expresión de Ikaros las células no salen de ciclo y por tanto se quedan en la zona germinal proliferando. Estos resultados están relacionados con la ya descrita implicación de la falta de Ikaros en la formación de tumores linfáticos (Dumortier y col., 2006).

Los resultados obtenidos sobre-expresando Ikaros-1 en neuroesferas derivadas de cerebros de E14,5 confirman nuestra hipótesis. Ikaros-1 induce una reducción en la tasa de proliferación de las neuroesferas que va acompañada de una reducción en el número de neuroesferas y del consecuente incremento en el número de neuronas post-mitóticas (figura 37). Se ha descrito

una reducción en la capacidad de auto-renovación de NSC tras mutaciones en la vía de señalización de Notch que han sido asociadas a la división terminal simétrica diferenciadora (Hitoshi y col., 2002). Asimismo, uno de los mecanismos por los que Ikaros afecta a la proliferación linfocítica es a través de la señalización de Notch (Dumortier y col., 2006). Sin embargo, nuestros resultados no han mostrado ninguna alteración de la señalización de Notch tras la sobre-expresión de Ikaros (datos no mostrados) y esto posiblemente es debido a que la expresión de proteínas que participan en la señalización intracelular de Notch es más temprana que el pico de expresión de Ikaros durante el desarrollo del núcleo estriado (Tokunaga y col., 2004; Mason y col., 2005). Estos resultados nos indican que Ikaros podría estar regulando la proliferación de los precursores neurales a través de la regulación negativa de la transición G<sub>1</sub>-S del ciclo celular tal y como se ha descrito para linfocitos (Gomez-del y col., 2004).

	PROLIFERACIÓN	AUTO - RENOVACIÓN
<b>Neuroesferas embrionarias deficientes de Ikaros</b>	↑	↓
<b>Neuroesferas embrionarias sobreexpresan Ikaros</b>	↓	↓
<b>Neuroesferas adultas deficientes de Ikaros</b>	↑	↓

**Figura 37. Efectos de la falta de expresión y de la sobre-expresión de Ikaros en la proliferación y auto-renovación de neuroesferas**

Para estudiar más en profundidad el papel de Ikaros-1 en la diferenciación neuronal, a continuación caracterizamos las NSC de ratones deficientes de Ikaros y normales a E14,5. Observamos que las neuroesferas obtenidas a partir de ratones deficientes de Ikaros presentan una tasa de proliferación mayor que los ratones normales, lo cual coincide con el

incremento de la proliferación observado en la zona germinal *in vivo* y con los resultados derivados de la sobre-expresión de Ikaros-1. Teniendo en cuenta que Ikaros-1 no se expresa ni en la zona germinal ni en las neuroesferas derivadas de cerebros de E14,5, el resultado observado ha de ser debido a un efecto indirecto o no autónomo de la falta de expresión de este factor de transcripción. Las neuroesferas obtenidas a partir del ratón deficiente de Ikaros muestran una capacidad de auto-renovación reducida respecto al animal normal (figura 37), igual que ocurre en células madre hematopoyéticas (Nichogiannopoulou y col., 1998). Esta discrepancia entre proliferación y auto-renovación puede ser debida a un mecanismo de auto-regulación para controlar el tamaño de las zonas proliferativas. Es decir, que el incremento en la tasa de proliferación de un tipo de precursores neurales está comprometiendo otro tipo de células madre relativamente quiescentes del cerebro anterior como ocurre en el ratón nulo de P21 (Kippin y col., 2005). Esto implica que la falta de Ikaros-1 puede estar afectando indirectamente a las poblaciones de células madre neurales de la LGE. Se ha propuesto que existen diferentes tipos de progenitores en la zona germinal de la LGE en base a las diferentes propiedades de ciclo celular (Bhide, 1996) y a la expresión diferencial de factores de transcripción (Yun y col., 2003; Stenman y col., 2003a). Sin embargo, la falta de una caracterización apropiada de estos progenitores hace difícil estudiar el efecto indirecto de Ikaros-1 sobre estas poblaciones.

La zona subventricular adulta, la cual se podría considerar como un remanente de la zona germinal embrionaria presenta tres tipos de poblaciones de células madre neurales bien caracterizadas (Doetsch y col., 1997). Las células GFAP positivas (Células B), presentan un elevado potencial de auto-renovación y funcionan como precursores primarios de las células de rápida amplificación (Células C), las cuales generan neuroblastos (Células A) (Doetsch y col., 1999). El análisis de la zona subventricular adulta del ratón nulo de Ikaros muestra el mismo efecto no autónomo observado en las células madre neurales embrionarias en cuanto a la capacidad de auto-renovación y a la tasa de proliferación. Recuentos de los diferentes tipos de precursores presentes en la

zona subventricular adulta muestran una reducción en el número de precursores primarios (Células B) y un incremento en la tasa de proliferación de las células de rápida amplificación (Células C). Así pues, como ocurre en el ratón deficiente de P21, la elevada proliferación de las células C está asociada con una reducción en las células B. Todos estos resultados sugieren que Ikaros regula la densidad de algunos precursores de la zona germinal de la LGE durante el desarrollo afectando permanentemente la composición de las poblaciones de precursores de la zona germinal desde estadios embrionarios hasta el adulto.

#### ***6. Ikaros controla específicamente el desarrollo de las neuronas estriatales de proyección encefalinérgicas***

El pico de expresión de Ikaros coincide con la generación de neuronas estriatales de proyección. Se han descrito dos oleadas de neurogénesis en el núcleo estriado (van der y Fishell, 1987; Song y Harlan, 1994), las cuales están relacionadas con la generación de los dos compartimentos estriatales, la matriz y los estriosomas. Estos dos compartimentos también pueden definirse en base a la expresión diferencial de neuropéptidos (Gerfen, 1992). El compartimento estriosomal está formado por agregados de neuronas que expresan sustancia P que se encuentran en la parte rostral del estriado y también incluye algunas neuronas subyacentes al cuerpo calloso (Song y Harlan, 1994). En el ratón estas neuronas se desarrollan temprano y su neurogénesis presenta el pico máximo entre E12-E13 (Mason y col., 2005). Por el contrario, la matriz esta formada mayoritariamente por neuronas encefalinérgicas que se detectan inicialmente en la parte caudal del núcleo estriado (Song y Harlan, 1994) y el pico máximo de neurogénesis se produce entre E13-E15 en el ratón (Mason y col., 2005). Coincidentemente, Ikaros-1 presenta durante el desarrollo embrionario un gradiente caudo-rostral que concuerda con la localización de la neurogénesis encefalinérgica. Además observamos que el ratón deficiente de Ikaros presenta afectada la generación de neuronas principalmente a E14,5 que correspondería a la segunda oleada de neurogénesis estriatal.

El patrón de expresión medio lateral de Ikaros no coincide con la localización de las neuronas estriatales de proyección maduras a E18,5. Las primeras neuronas estriatales de proyección maduras aparecen durante el desarrollo embrionario en el primordio estriatal lateral y en los siguientes días se dispersan hacia la parte medial del núcleo estriado en desarrollo (Song y Harlan, 1994). DARPP-32 presenta un patrón de expresión ventrolateral similar durante el desarrollo (Snyder-Keller, 2004) el cual es complementario al patrón dorsomedial que presenta Ikaros-1 a E18,5. Esto sugiere que Ikaros-1 está marcando neuronas inmaduras de generación tardía que expresarán neuropéptidos en estadios de desarrollo posteriores, mientras que DARPP-32 se encuentra marcando las neuronas de generación temprana que forman los estriosomas. Apoyando esta hipótesis, observamos que en estadios postnatales tempranos Ikaros-1 se encuentra marcando la matriz que rodea los estriosomas DARPP-32 positivos. Además, dentro de la matriz Ikaros-1 colocaliza con neuronas encefalinérgicas pero no con neuronas sustancia P. En conjunto, estos resultados sugieren que Ikaros-1 podría estar participando en la diferenciación de precursores hacia neuronas encefalinérgicas maduras que van a formar el compartimento estriatal de la matriz. De acuerdo con esta hipótesis, el análisis de las poblaciones neuronales estriatales en el ratón deficiente de Ikaros muestra una reducción en el número de neuronas de proyección estriatales y en concreto de las neuronas de proyección encefalinérgicas respecto al ratón normal. Además, la determinación de las neuronas encefalinérgicas producida por Ikaros es específica ya que no se observa ningún tipo de afección en las neuronas de proyección sustancia P en el ratón deficiente de Ikaros. Está descrito que proteínas tipo-Ikaros actúan directamente sobre el promotor del gen de la encefalina incrementando su expresión (Dobi y col., 1997), por lo tanto éste podría ser uno de los mecanismos por los que Ikaros induce el fenotipo encefalinérgico. Estudios de sobre-expresión de Ikaros-1 en NSC corroboran estos resultados ya que producen un incremento significativo en los niveles de expresión de encefalina, sin modificar los niveles de sustancia P. Así pues, Ikaros interviene en la diferenciación de precursores neurales de la LGE hacia

un fenotipo estriatal encefalinérgico mediante la salida de ciclo celular de éstos precursores seguida de la inducción de la expresión del gen de la encefalina.

### ***7. Ikaros interviene en el desarrollo del núcleo estriado por debajo de la familia de factores de transcripción Dlx***

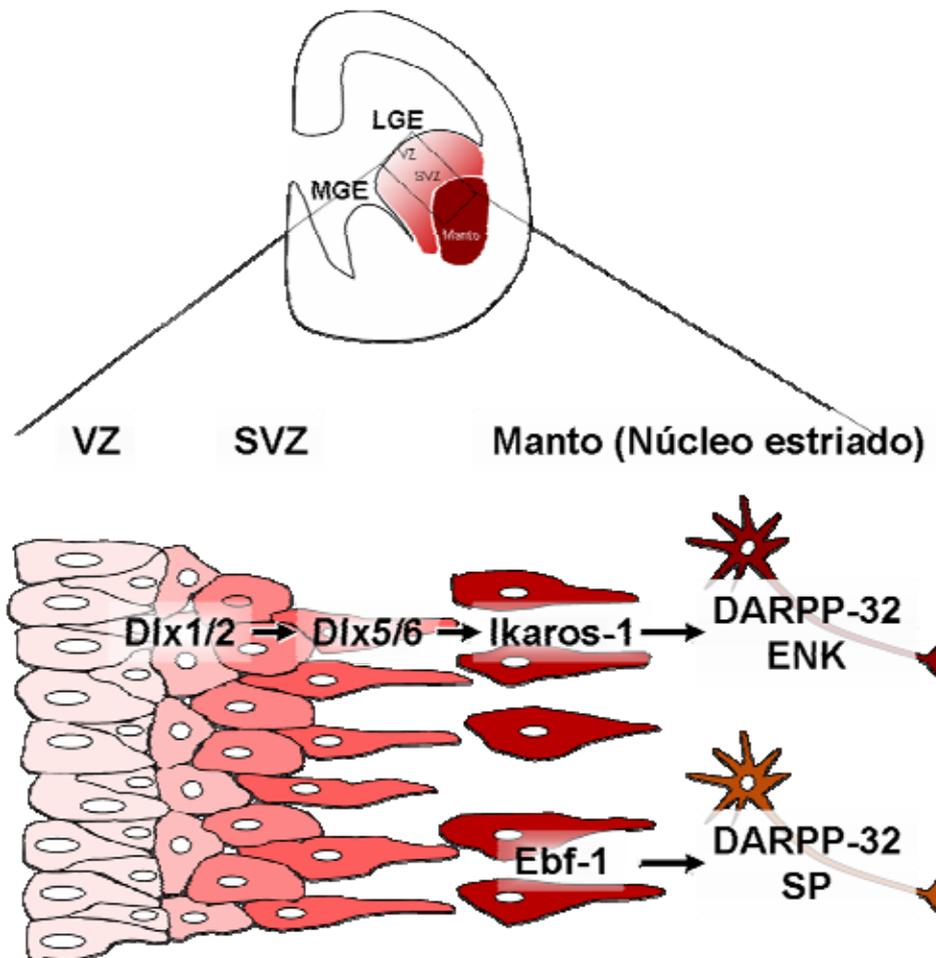
A pesar de no existir una caracterización de los diferentes tipos de precursores presentes en la zona germinal de la LGE en desarrollo y de su localización, se ha descrito la existencia de precursores positivos para Dlx que están claramente implicados en el desarrollo del núcleo estriado. Dlx-1 y Dlx-2 se expresan en la zona germinal de la LGE en desarrollo (Bulfone y col., 1993; Eisenstat y col., 1999) y la deficiencia de estos genes produce una disrupción de la diferenciación de las neuronas estriatales de generación tardía (Anderson y col., 1997). Los ratones que no expresan uno de los dos genes, Dlx-1 o Dlx-2 presentan una histología normal, sin embargo, los ratones nulos para ambos genes Dlx-1/2 presentan una alteración del desarrollo del núcleo estriado en la que aparece un pequeño tejido de tipo estriatal que está enriquecido en marcadores estriosomales (Anderson y col., 1997). Además, se ha demostrado que las células que expresan Dlx-2 en la LGE siguen una serie de rutas migratorias que incluyen la migración radial desde la zona germinal a la zona del manto del núcleo estriado (Nery y col., 2002). Nuestros resultados muestran que Ikaros-1 interviene en la generación de neuronas de proyección estriatales a través de la diferenciación de precursores Dlx positivos, ya que la expresión de Ikaros está severamente comprometida en los ratones nulos para los genes Dlx-1/2, pero no al revés, es decir, que la expresión de estos factores de transcripción no se ve alterada en el ratón deficiente de Ikaros. Además, el seguimiento de precursores estriatales Dlx-5/6 positivos, los cuales son precursores más maduros que provienen de precursores Dlx-1/2 positivos (Eisenstat y col., 1999), muestra que Ikaros-1 se expresa en una subpoblación de éstos precursores. En conjunto, estos resultados demuestran que Ikaros-1 interviene en la generación tardía de neuronas estriatales induciendo la

diferenciación, de al menos parte, de los precursores neurales Dlx positivos que se encuentran en la zona germinal de la LGE.

Existen diversos factores de transcripción que se expresan de manera específica durante el desarrollo del núcleo estriado y que están implicados en la neurogénesis estriatal. Entre ellos encontramos Ebf-1, que es un factor de transcripción implicado en la diferenciación de linfocitos B (O'Riordan y Grosschedl, 1999) y que se caracteriza por ser uno de los pocos factores descritos hasta el momento que está directamente implicado en la determinación del núcleo estriado. Ebf-1 se expresa mayoritariamente en la zona del manto estriatal (Garel y col., 1999) y su función genética es necesaria para la salida de ciclo acoplada a la diferenciación neuronal (García-Domínguez y col., 2003). Así pues, existe un cierto paralelismo entre las funciones de Ikaros y Ebf-1 que nos sugiere que podrían estar actuando a nivel de la misma vía en la determinación estriatal. Sin embargo, nuestros resultados muestran que Ikaros y Ebf-1 siguen vías independientes ya que no se observa ningún tipo de afección en la expresión de Ikaros en el ratón deficiente de Ebf-1, ni en la expresión de Ebf-1 en el ratón deficiente de Ikaros. De hecho, Ebf-1 es un factor específico de linaje esencial para la diferenciación de las neuronas de generación temprana sustancia P positivas (Lobo y col., 2006), mientras que nuestros resultados muestran que Ikaros-1 juega un papel crítico en la diferenciación de las neuronas de generación tardía encefalinérgicas. Así pues, dos mecanismos independientes específicos parecen estar implicados en la generación de las neuronas estriato-palidales y estriato-nigrales.

Estos resultados nos llevan a concluir que la generación de las dos poblaciones de neuronas de proyección estriatales, sustancia P y encefalina, se produce por vías independientes paralelas (figura 38). En el caso de las neuronas de proyección encefalinérgicas, postulamos que durante la neurogénesis estriatal tardía a partir de los precursores inmaduros Dlx-2 positivos que se encuentran en la zona germinal se generan unos precursores algo más maduros Dlx-1 positivos que a su vez madurarán para dar lugar a

nivel de la zona subventricular a los precursores Dlx-5/6 positivos (Eisenstat y col., 1999). Parte de estos últimos precursores cuando salgan de la zona germinal expresarán Ikaros a nivel de la intersección entre la zona subventricular y el manto, y la expresión de este factor de transcripción inducirá la salida de ciclo de los precursores y la diferenciación a neuronas de



**Figura 38.** Representación de las diferentes zonas de la LGE que contienen precursores neurales que expresan factores de transcripción específicos, los cuales van a dar lugar a la formación de de las neuronas de proyección estriadales encefalinérgicas y sustancia P.

proyección encefalinérgicas que ocuparán la matriz estriatal. Por otro lado, las neuronas de proyección sustancia P se generan durante la neurogénesis temprana a partir de una población de precursores neurales Mash-1 positivos (Yun y col., 2002). Estos precursores migrarán hacia el manto utilizando las fibras de glía radial, que son una fuente de retinoides en la LGE (Toresson y col., 1999). Puesto que el ácido retinoico induce la diferenciación hacia neuronas

sustancia P en un cultivo de precursores neurales de la LGE (trabajo en curso), nosotros consideramos que los precursores Mash-1 positivos de la zona germinal migran radialmente hacia el manto de manera que el ácido retinoico secretado por las fibras de glía radial induce la maduración de los precursores promoviendo la expresión de Ebf-1 a nivel de la intersección entre la zona subventricular y el manto, y este factor de transcripción en última instancia induce la diferenciación de los precursores a neuronas de proyección sustancia P (figura 38).

