



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

**Caracterización de factores de
transcripción estriatales para su uso en
la diferenciación de células madre.**

**Tesis presentada por Noelia Urbán Avellaneda
para optar al título de doctora por la Universidad de Barcelona**

Esta tesis ha sido realizada bajo la dirección del
Dr. Josep M. Canals Coll en el Departament de Biologia
Cel·lular i anatomia Patològica de la Facultat de Medicina
de la Universitat de Barcelona.

Dr. Josep M. Canals Coll

Noelia Urbán Avellaneda

Barcelona, Enero de 2009

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mi director de tesis, Pep, por haberme dado la oportunidad de emprender esta aventura. Gracias por ver siempre las cosas por el lado positivo, por haber estado siempre abierto a nuevas y extrañas teorías y por haber seguido tan de cerca y con tanta confianza mi trabajo. La pasión y constancia que pones en los proyectos me anima a seguir creyendo en este complicado mundo de la ciencia. Gracias también a Jordi por permitirme realizar la tesis en su laboratorio, por su sinceridad y por ser un ejemplo de llegar a conseguir tus metas sin perder de vista las cosas que importan de verdad. Gracias a Silvia por haberme ayudado a encontrar sentido a los misterios de los anticuerpos sin perder nunca la sonrisa. Y a Esther por hacer tan interactivos los seminarios.

Un agradecimiento muy especial a Raquel, la persona que me lo ha enseñado todo sobre las células madre casi al mismo tiempo que lo iba aprendiendo. Admiro mucho tu fuerza y tu seguridad y has sido una gran compañera en la tarea de poner en marcha un laboratorio. A Ana por el duro trabajo que realiza con los animales, sin el cual sería imposible el nuestro y porque ha sido un placer que nos acompañe en el viaje a la tercera planta. A Solène, por su agradable compañía y su ayuda en los inicios de la era de las stem girls. A Empar, por su ilusión y su forma especial de ver las cosas (ser valenciana y del Barça es un estilo de vida, jeje). A Cristina por haber compartido conmigo parte del trabajo de Nolzi sin desesperarse del todo, por intentar mantener un poco de orden dentro del caos y por la enorme energía que transmite. A Miriam por su seguridad y sus ganas de aprender cosas nuevas. También a María y Mari Ángeles porque me alegro mucho de haberos conocido y haber compartido un tiempo con vosotras. Gracias a todas por haber estado conmigo en este camino tan complicado y por haber hecho tan fácil y agradable el ir a trabajar cada mañana.

Muchas gracias a Dani, mi compañero de aventuras desde el principio del doctorado. Por estar siempre dispuesto a echar una mano y lo que haga falta, y por nuestras largas charlas en las que nunca estamos de acuerdo. Mucha suerte aunque estoy segura de que no la vas a necesitar, sigas el camino que sigas. Gracias también a ti, Albert, una de las mejores personas que conozco, por tu capacidad de comprensión, tu empatía y porque me lo he pasado genial hablando contigo de cosas “frikis”. Echaré de menos que regules tan estrictamente mi hora de comer. A Xavi, porque me lo he pasado muy bien “peleándome” contigo, y con nuestras charlitas en la campana y fuera de ella. A Ana, por su valentía y por no perder la fe ni en los peores momentos. A Paola porque nunca la he visto de mal humor y es genial encontrarse a alguien que siempre te recibe con una sonrisa. A Bego, por su capacidad de cambiar las cosas, por perseguir sus sueños sin miedo a las consecuencias. A las peques, Laura e Ingrid, y a las nuevas incorporaciones, Olga, Verónica y Mar, espero que disfrutéis de las cosas buenas de la ciencia y de la buena compañía y el buen rollo del laboratorio.

Gracias también a la gente que ha tomado ya otros caminos, a la que deseo toda la suerte del mundo. A aquellos con los que compartí poco tiempo, Susana, Nuria y en especial Miquel por ser el pionero en las células madre. A Juanma por ser un ejemplo de trabajo y meticulosidad. A Jesús por su calidez, su buen humor y por tener siempre unas palabras amables para animar en los malos momentos. A J.R. por ser un ejemplo de superación, y por haberme ayudado en los inicios de mi vida en el laboratorio. A María y Sonia, porque fue una suerte haber coincidido con ellas.

Muchas gracias a los otros inquilinos del laboratorio, los “Gustavos”. A Javi, por transmitir tan buenas vibraciones y decir siempre lo que piensa, aunque sean cosas muy raras (jeje). A Inés, por su enorme dedicación al trabajo sin perder la alegría. A Beth, Laia, Enric, y Susana por su amabilidad y compañía. A los que ya no están, Frank, Sergi, Emma,

Cecilia, Yovan, Stefan, Miguel, Olga, Isabel y Juanma por haber contribuido a generar un ambiente de trabajo tan agradable.

Gracias a la gente que he conocido en mis estancias en otros laboratorios. A Philippe Naveilhan por acogerme y por sus excelentes consejos sobre biología molecular, y a Manuel y Reynald por su ayuda dentro y fuera del laboratorio. A Isabel Fariñas por ser un ejemplo de esfuerzo y dedicación a la ciencia y a todas sus chicas (y chico), Laura, Ana, Nati, Zoraida, Teresa, Mari Fe, Mari Paz, Sacri, Miguel, Pili, Helena, Isabel, y en especial a Celia, por enseñarme tanto y haberme hecho sentir como una más. A Salvador Martínez por ver siempre los resultados de forma tan positiva, y a toda la gente de su laboratorio, Diego, Eduardo, Mónica, Ana, Aurelia, Jesús, Elena, Nora, Elisabetta, y en especial a Carolina por enseñarme tan bien y preocuparse tanto de que las cosas me salieran bien.

Gracias también a los arqueovínicos, y en especial a los que siguen resistiendo, Maria, Orlando, Citlali, Patricia, David, Vanesa y Tomàs porque ha sido una suerte encontrarme con vosotros y mantener vuestra amistad.

A mis amigos de siempre, de toda la vida, por haber estado siempre ahí y haberme ayudado a desconectar. Gracias a Nieves y Olga por esperarme tantas veces con tanta paciencia. Gracias a Berna por tener fe en mí y a Carles por su interés en el número de animales “utilizados”. Gracias también a Natxo, Laura y María, por vuestra amistad aunque no nos veamos tan a menudo.

A Iván por compartir gran parte de este camino conmigo y por haberme escuchado y comprendido mejor que nadie. Has sido la persona más importante en mi vida y espero que tengas mucha suerte en lo profesional y lo personal.

A mi hermano por haber estado (casi) siempre ahí. Porque su forma de entender el mundo, tan parecida y tan distinta a la mía al mismo tiempo, me ha ayudado a relativizar muchas cosas. A toda mi familia, mis

tíos y mis primas, por hacerme sentir que hago algo importante, aunque no tengan muy claro qué es.

A mi padre, por lo orgulloso que se ha sentido de mí hasta el final, y por enseñarme que la capacidad de querer y sentirse querido es lo último que se pierde.

Y por último, a mi madre, la persona más fuerte y buena que conozco, porque sin ella nada de esto sería posible. Gracias por apoyarme siempre, por los muchos sacrificios que has hecho para que nosotros podamos realizar nuestros sueños, por haber sido el mejor ejemplo a seguir y por enseñarme a mirar siempre hacia adelante.

Índice

Índice	pág. I
Abreviaciones	pág. VII
I. Introducción	pág. 1
1. Desarrollo del telencéfalo	pág. 5
1.1. Inducción Neural	pág. 5
1.2. Especificación telencefálica	pág. 7
1.2.1. Determinación anteroposterior	pág. 8
1.2.2. Determinación dorsoventral	pág. 11
1.2.2.1. Sonic Hedgehog	pág. 12
1.2.2.2. FGF	pág. 14
1.2.2.3. Otros morfógenos ventralizantes	pág. 15
1.2.2.4. Factores intrínsecos	pág. 16
1.3. Control de la proliferación	pág. 17
1.3.1. Control del ciclo celular	pág. 17
1.3.2. Vía de Notch	pág. 19
1.3.3. Factores de transcripción tipo bHLH	pág. 21
1.3.4. Remodelación de cromatina	pág. 22
1.4. Control de la diferenciación neural	pág. 23
1.4.1. Neurogénesis	pág. 27
1.4.2. Oligodendrogénesis	pág. 30
1.4.2.1. Aplicaciones del cultivo de precursores oligodendrogiales	pág. 33
1.4.3. Astrogénesis	pág. 34
2. Histología y desarrollo del núcleo estriado	pág. 35
2.1. Histología y organización de los ganglios basales	pág. 35
2.2. Aparición del primordio estriatal	pág. 37
2.2.1. Especificación de la zona intermedia	pág. 38
2.2.1.1. Ácido retinoico	pág. 40
2.2.2. Oleadas de neurogénesis en la LGE	pág. 41
2.2.3. Migración celular	pág. 44
2.2.3.1. Migración radial	pág. 44
2.2.3.2. Migración tangencial	pág. 45
2.3. Maduración estriatal	pág. 46
2.3.1. Establecimiento de los compartimentos estriatales	pág. 46
2.3.2. Establecimiento de conexiones	pág. 48
2.4. Funciones de los ganglios basales	pág. 48
2.4.1.1. Enfermedad de Huntington	pág. 49
3. Células madre	pág. 52
3.1. Definición	pág. 52
3.2. Tipos de células madre según su origen	pág. 54
3.2.1. Células madre embrionarias	pág. 55
3.2.1.1. Obtención de ESCs a partir de células somáticas	pág. 56
3.2.2. Células madre fetales	pág. 57
3.2.3. Células madre adultas	pág. 59
3.2.4. Otros tipos de células madre	pág. 61
3.3. Células madre neurales	pág. 62
3.3.1. Origen de las NSCs	pág. 62
3.3.1.1. A partir de ESCs	pág. 62

3.3.1.1.1. Factores que contribuyen a su diferenciación	pág. 63
3.3.1.2. Fetales	pág. 65
3.3.1.3. Adultas	pág. 66
3.3.1.3.1. SVZ	pág. 67
3.3.2. Control epigenético	pág. 68
3.3.2.1. RNAs no codificantes	pág. 70
3.4. Terapias de trasplante celular para enfermedades del sistema nervioso	pág. 71
3.4.1. Tipos de terapias	pág. 71
3.4.2. Ensayos clínicos y perspectivas de futuro	pág. 74
II. Objetivos	pág. 77
III. Materiales y Métodos	pág. 81
1. Animales	pág. 83
2. Cultivos celulares	pág. 84
2.1. Cultivo primario de LGE de embriones de 14.5 días	pág. 84
2.2. Cultivo primario de neuroesferas embrionarias de E14.5	pág. 85
2.2.1. Transfección	pág. 86
2.2.2. Diferenciación	pág. 87
2.3. Cultivo y transfección de la línea de células madre neurales C17.2	pág. 88
2.4. Cultivo y diferenciación de células madre embrionarias	pág. 89
3. Obtención y cultivo de rodajas telencefálicas embrionarias	pág. 90
3.1. Electroporación de rodajas telencefálicas embrionarias	pág. 91
4. Ensayos de RT-PCR cuantitativa	pág. 91
5. Obtención de anticuerpo policlonal contra Nolz1	pág. 93
6. Western blot e inmunoprecipitación	pág. 96
7. Estudio de proliferación celular: tratamiento con BrdU	pág. 97
7.1. Estudio de proliferación durante el desarrollo del núcleo estriado	pág. 97
7.2. Estudio de proliferación de neuroesferas embrionarias	pág. 98
8. Procedimientos de detección inmunocito e inmunohistoquímica	pág. 99
8.1. Inmunocitoquímica	pág. 99
8.2. Inmunohistoquímica	pág. 100
9. Ensayo de TUNEL para la detección de muerte celular	pág. 102
10. Hibridación <i>in situ</i>	pág. 103
10.1. Hibridación <i>in situ</i> radioactiva	pág. 103
10.1.1. Cuantificación de la expresión de encefalina y sustancia P	pág. 103
10.2. Hibridación <i>in situ</i> no radioactiva	pág. 104
10.3. Sondas utilizadas para la hibridación <i>in situ</i>	pág. 104
10.4. Marcaje doble de hibridación <i>in situ</i> y de inmunohistoquímica	pág. 105
11. Recuentos celulares	pág. 105
11.1. Recuentos para la evaluación de la capacidad de autorenovación y proliferación de neuroesferas embrionarias	pág. 105
11.2. Recuentos de tipos celulares en las diferenciación de	

neuroesferas	pág. 106
11.3. Recuentos estereológicos	pág. 106
12. Estadística	pág. 107
IV. Resultados	pág. 109
1. Durante el desarrollo del núcleo estriado Nolz1 se expresa en precursores neurales de la SVZ y el manto, mientras que la expresión de Ikaros está restringida a células postmitóticas en la zona del manto	pág. 112
2. Nolz1 se expresa en precursores neuronales que poblarán el núcleo estriado	pág. 114
3. La sobre-expresión de Nolz1 en neuroesferas afecta negativamente a su capacidad proliferativa y autorenovadora	pág. 118
4. La sobre-expresión de Nolz1 en neuroesferas induce la expresión de marcadores de precursores oligodendrogiales	pág. 122
5. La expresión de Nolz1 no se mantiene en oligodendrocitos, pero es necesaria para la correcta aparición de los precursores oligodendrogiales plp/dm20 en la LGE	pág. 125
6. La expresión de Nolz1 en la LGE o en NSCs no está regulada por RA pero depende de Gsh2	pág. 128
7. La expresión de Nolz1 activa la síntesis de RA en neuroesferas induciendo la expresión de Raldh3	pág. 131
8. Nolz1 se expresa de forma similar al correpressor transcripcional Tle4 tanto <i>in vivo</i> como <i>in vitro</i>	pág. 133
9. Ikaros1 se expresa selectivamente en neuronas encefalinérgicas del núcleo estriado durante el desarrollo	pág. 136
10. Ikaros regula los niveles del inhibidor de ciclinas p21, promoviendo así la salida de ciclo de los precursores neurales	pág. 138
11. Ikaros es necesario durante el desarrollo estriatal para promover la salida de ciclo de los precursores estriatales que comienzan la neurogénesis a E14.5	pág. 142
12. Ikaros promueve la diferenciación neuronal encefalinérgica tanto en neuroesferas como en cultivos primarios provenientes de la LGE a E14.5	pág. 146
13. La falta de Ikaros produce un déficit selectivo de neuronas estriatales de proyección encefalinérgicas en el animal adulto	pág. 150
14. Ikaros1 regula el desarrollo del manto estriatal por debajo de Dlx y de forma paralela e independiente a Ebf1	pág. 153
V. Discusión	pág. 157
1. Nolz1 e Ikaros actúan en momentos distintos del desarrollo estriatal	pág. 161
2. Nolz1 se expresa en progenitores basales indiferenciados de la SVZ y regula la proliferación y auto-renovación de las NSCs	pág. 162
3. Nolz1 es necesario para la correcta especificación de precursores oligodendrogiales en la LGE	pág. 167
4. Nolz1 contribuye a la aparición de síntesis de RA en la propia LGE	pág. 172
5. Nolz1 puede actuar como integrador de la multitud de señales que llegan a la zona intermedia telencefálica uniéndose	

al correpresor transcripcional Tle4	pág. 176
6. Ikaros1 se expresa de forma específica y regulada durante el desarrollo en la zona del manto estriatal	pág. 180
7. Ikaros1 promueve la salida del ciclo celular de los precursores neurales a través del incremento de p21	pág. 182
8. Ikaros promueve la diferenciación de la segunda oleada de neuronas estriatales hacia un fenotipo encefalinérgico de proyección	pág. 185
9. Las células Ikaros positivas requieren la expresión de Dlx1/2 en etapas anteriores y su especificación se produce de forma independiente a Ebf1	pág.188
10. Nolz1 e Ikaros controlan distintos aspectos de la diferenciación neural durante el desarrollo del núcleo estriado	pág. 190
VI. Conclusiones	pág.193
VII. Bibliografía	pág. 197

Abreviaciones

BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BL	Lámina basal
BMPs	Proteínas morfogenéticas del hueso
BrdU	2'-bromo-5'-desoxiuridina
BV	Vasos sanguíneos
CAG	Citosina adenosina guanidina
CGE	Eminencia ganglionar caudal
ChAT	Acetilcolinesterasa
CNTF	Factor neurotrófico ciliar
Ctx	Corteza cerebral
DAB	Diaminobenzidina
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DEAB	4-Dietilaminobenzaldeído
DG	Giro dentado
DIV	Días in vitro
dLGE	Zona dorsal anterior de la LGE
DMSO	Dimetilsulfóxido
DARRPP-32	Fosfoproteína regulada por dopamina- y AMP cíclico
E14	Día embrionario 14
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFP	Proteína verde fluorescente mejorada
ENK	Encefalina
ESCs	Células madre embrionarias
FACS	Selección celular por activación fluorescente
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
GABA	ácido γ -aminobutírico
GAD	Ácido glutámico descarboxilasa
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la glía
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GFP	Proteína verde fluorescente
GPe	Globus pallidus, segmento externo
GPi	Globus pallidus, segmento interno
GZ	Zona germinal
HDACs	Histona deacetilasas
IRES	Lugar interno de entrada ribosomal
Ik	Ikaros
Htt	Huntingtina
IGF	Factor de crecimiento tipo Insulina
IL1	Interleuquina-1
LGE	Eminencia ganglionar lateral
LIF	Factor inhibidor de leucemia
LV	Ventrículo lateral
MGE	Eminencia ganglionar medial
Mhtt	Huntingtina mutada
MZ	Zona del manto
NGF	Factor de crecimiento nervioso
Ngn	Neurogenina
NMDA	N-metil-D-aspartato
NOS	Óxido nítrico sintasa
NSCs	Células madre neurales
NT3	Neurotrofina 3

NT4	Neurotrofina 4
NT4/5	Neurotrofina 4/5
NTRN	Neurturina
OB	Bulbo olfativo
p21	p21Cip1/Waf1
p27	p27Kip1
P4	Día postnatal 4
PB	Buffer fosfato
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDGFR	Receptor del PDGF
RA	Ácido Retinoico
RARE	Elemento de respuesta a ácido retinoico
RARs	Receptores de ácido retinoico
RT-PCR	PCR a tiempo real
SEM	Error estándar de la media
SGZ	Zona subgranular
Shh	Sonic hedgehog
SNc	Sustancia Negra pars compacta
SNr	Sustancia Negra pars reticulata
SP	Sustancia P
STN	Núcleo subtalámico
Str	Núcleo estriado
SVZ	Zona subventricular
TGF	Factor de crecimiento tumoral
TUNEL	Del inglés: terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling
VZ	Zona ventricular
WB	Western Blot
WT	Animal salvaje