

Caracterización de los factores de transcripción de la familia Ikaros durante el desarrollo estriatal

Desemparats Crespo March

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Departament de Biologia Cel·lular, Immunologia i Neurociències
Facultat de Medicina

CARACTERIZACIÓN DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE LA FAMILIA IKAROS DURANTE EL DESARROLLO ESTRIATAL



Tesis presentada por Desemparats Crespo March
para optar al título de Doctora por la Universitat de Barcelona

Programa de Doctorado en Biomedicina

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

Dr. Josep M. Canals

Desemparats Crespo March

Barcelona, Diciembre de 2010

I el que compta és l'esforç de cada dia
compartit tenaçment amb els qui creuen
que cada gest eixampla l'esperança,
que cap dia no es perd per als qui lluiten.

Miquel Martí i Pol

Als meus pares

A Joan

AGRAÏMENTS

Ja s'ha acabat la tesi, ja està escrita i a punt d'imprimir-se, i això és sinònim d'escriure els agraïments. Sembla mentida el que costa començar aquest apartat: serà la síndrome del full en blanc o serà la dificultat de posar ordre als sentiments. Siga el que siga és la cinquena vegada que comence aquest apartat i encara no acabe d'estar del tot segura de ser un bon començament. Realment és complicat poder tornar, d'una manera o altra, tot el suport que la gent que m'ha donat durant aquestos quatre anys de treball. És molt enriquidor formar-se científicament però molt més important és conèixer a nous coneguts, a nous companys i a nous amics i saber que sempre pots comptar amb ells.

En primer lloc voldria agrair al Pep l'oportunitat que em va donar per poder realitzar la tesi doctoral a aquest laboratori. Gràcies per haver-me ajudat a solucionar els problemes que durant la tesi han anat apareixent. Durant tots aquestos anys, sovint, hem vist el got des de diferents perspectives; però, sense dubte, m'ha ajudat a formar-me com a persona i com a científica. De manera molt especial, m'agradaria agrair al Jordi tot el suport que m'ha ofert. Encara recorde la primera entrevista (allà pel maig del 2006)... i no ha plogut ni res des d'aleshores. Sempre que l'he necessitat m'ha aconsellat dient-me les coses clares i en català. Semblava mentida però, al remat, la tesi ha aconseguit arribar al final i passar totes les comissions! Tot i que amb l'Esther i la Sílvia no he tingut l'oportunitat de treballar directament, els he d'agrair els seus comentaris i suggeriments que m'han fet al llarg d'aquest temps, sobretot als seminaris. Mai no he parlat d'*Akt* o *CDK5* però sempre heu participat en els debats dels resultats cosa que m'ha ajudat a millorar la feina de la tesi.

Al llarg de la tesi, si d'una cosa et fas especialista, és d'omplir papers i més papers. Per sort, al departament sempre he contat amb unes "secres" que m'han ajudat en el que fes falta: Núria i Carme. Gràcies per donar-me una mà (hi havia dies que necessitava tot el braç) al principi de tot, quan em van concedir una beca misteriosa que ningú de la UB la controlava: la famosa beca FIS. I també al final de tot, quan a la tesi li havien tirat un mal d'ull i no passava les comissions ni a la de tres! Sense la vostra ajuda i el vostre bon humor, tots aquestos entrebancs hagueren sigut molt difícils de superar. I a tu Eva, sempre has tingut un moment per ajudar en qualsevol dubte, merci!

Per sort, la tesi doctoral no sols és burocràcia. Són moltes i moltes hores de treball al laboratori, d'aprenentatge i de compartir molts moments amb els companys. En arribar a un lloc nou, s'agraeix molt que la gent t'ajude a adaptar-te al nou hàbitat. Per això, agrair als ja Doctors JR, Juanma, Jesús, Inés, Cecilia, Yován, Emma, Frank i Susana's tota l'ajuda que em van donar. A tots ells molta sort en els diversos camins que heu seguit. A les qui vau

deixar la ciència per una vida millor, Bego i Maria, tot un plaer haver compartit els anys de tesi amb vosaltres. una persona que no és Doctor, encara, i que hem compartit molt de temps en xerrades per arreglar el món. Sergi, espere que per la UAB tot vaja de meravella i a vore si el proper concurs de castells m'aconsegueixes una entradeta... jajajaja.

Moltes gràcies a tots aquells que m'heu ensenyat que existeixen altres visions de la recerca fora del nostre laboratori. Gustavo, molta sort amb el teu laboratori. Gràcies Montse Jaumot per haver-me ajudat a endinsar-me en el món del cicle cel·lular i totes les proteïnes que comencen per "p". Gràcies Oriol Bachs, per haver tingut sempre un moment per discutir la relació dels inhibidors de cicle amb l'apassionant família Ikaros. I moltes gràcies a Óscar Marín, per deixar-me estar al teu *labo*, aprendre noves tècniques i conèixer altres indrets.

Vaig començar la tesi a la tercera planta de la mà de Solène. Moltes gràcies per haver tingut la paciència d'ensenyar-me a disseccionar aquelles miniatures d'embrions de ratolins, els cultius de neurosferes i haver aguantat que durant uns mesos fora la teva ombra. *Merci beaucoup!* Raquel, Noe, Míriam i Cris, han sigut les meves companyes de laboratori amb les qui hem passat moltes hores al "*mini lab*" de la tercera! Molta sort en tots els nous projectes que porteu entre mans. I, moltes gràcies a tu, Ana López. Per la feina que fas, però sobretot, per tots els esmorzar i converses que hem compartit. Amb l'optimisme i serenor que transmetes és molts més fàcil començar els dies de treball, inclòs aquells dies que tot està muntanya amunt! Moltes gràcies!

Però, exigències del guió han fet que moltes de les hores de treball les passara al laboratori de la cinquena. Gràcies a tots vosaltres les hores passades als microscopis i al "*sintonitzadors de cotis*", vull dir criostat, han sigut molt més fàcils de portar. Abans de res, m'agradaria agrair a una persona que, sense ella, el laboratori no seria el mateix. Maite, gràcies per la paciència d'aguantar-nos a cadascun de nosaltres, de mantindre el *labo* en ordre però sobretot per ajudar-me en el meravellós món de les revisions d'Olympus. Moltes gràcies! Bet, tot i que no estàs a la cinquena, gràcies per no haver-me tirat del despatxet estos últims dies de conversa de tesis sempre sentint les mateixes històries. A tu Olga, haver après a utilitzar el criostat del CSIC ha sigut un plaer! Ja que seràs la següent, molta sort i aprofita d'aquesta última temporada que et queda al *labo* que és la millor i passa volant!. Vero, molta sort en el projecte de p75 i a vore si la maleïda immuno ix d'una vegada... Ànims! A la xiqueta de la família, a la "*PÉRCAL*"... Carla desitjar-te molta sort en tot el que et queda per endavant. Trobar a una persona que li agraden els meus "*xists*" no és fàcil. Això si, menja que

molt de temps les papallones a la panxa no poden estar; pot arribar a ser molt perjudicial! Tot i que acabes d'aterrar i ja m'has pillat en l'època d'escriptura, gràcies Juanma pels ànims que m'has donat durant la última etapa de tesi. Enric, després de tants anys que ens coneguem, què et puc dir?. Si una cosa he après durant aquestos anys és que els qui no fumem també morim. Molts ànims i molta sort en la lectura de tesi. Gràcies Ana pel suport mostrat durant aquestos anys de tesi. Tot i haver-te vist unes quantes vegades, encara em meravella la capacitat de fer 8, 10 o 12 westerns a l'hora. I molta sort amb l'experiència de ser mare, ja m'aniràs contant. Laia, molta sort en la recta final de la tesi i aprofita molt de l'estada en els EE.UU. Jo ja marxe, però pensa que el ministeri del "cotis" el deixi en molt bones mans! I a tu Ingrid, tot i que ens situem en dos extrems oposats, moltes gràcies pels grans moments que ens vas donar, i encara de quan en quan ens dones. A banda del llegat de les fotos del Barça i d'immortalitzar molts moments del *labo*, has d'estar contenta que s'està recuperant Màxima FM al laboratori!

I de la meua companya de taula, a l'experta de Power Points i la *prostaglandina woman*, què vols què et diga? Per molt que em posara a escriure, no sabia com donar-te les gràcies per tots els moments que m'has aguantat. Tots els consells que m'has donat, els ànims que sempre tenies a punt, per la visió externa de tot però sobretot per compartir tantes birres! Sempre hi havia algú que feia la última amb mi! Moltíssimes gràcies Marta, ets un encant! Per cert, cuida al Sr. Modem que un dia d'aquestos haurem d'anar a visitar-lo! I com no, no em puc oblidar de l'altra part del tàndem, la Mar. L'energia que transmetes des que arribes de bon matí al laboratori, la força de superació que mostres dia rere dia i l'empatia que tens, no té preu. Sempre tens un moment per a la gent que t'envolta, i això és molt d'agrair en una societat on l'esperit crític no sé per on està... haurem d'anar a buscar-lo. Quan quedem? Quan el trobem ja cantarem una cançoneta per celebrar-ho. Moltes gràcies, guapa, per tots els moments compartits: les rialles i els plors, els cants i els balls... Espere poder continuar compartint molts altres moments tot i la distància. A totes dues, molta sort en la tesi (ja voreu com passa volant!), encara que estic convençudíssima que no la necessitareu; la joventut pugeu molt preparats!

I què és del Club del Tupper? Adrià, ara que comences a entendre el valencià va i me'n vaig. Gràcies pels partits del Barça, per haver comptat amb mi per fer l'escapada de tots els xics del *labo*, gràcies pels moments de conversa a hores intempestives, gràcies pel recolzament que sempre he trobat per part teua, gràcies per ser tan Pompeu i estimar-te tant la llengua... gràcies per mil coses més. Et queden dos dures feines que espere i supose que ho

faràs de categoria: continuar informant del que passa però sobretot de mantindre la rutina dels cafès. La gent normal a vegades ens en sortim tot i que vulguem anar en un tren transsiberià que fa *xuxuxu*. Molta sort en la tesi i et recorde que a València encara t'espera una *fallereta* diabòlica que havies de comprar... I Laura, gràcies a tu m'he assabentat que a la Índia hi ha castells, que a Mongòlia es menja arròs i que la cançó dels Manel del tren transsiberià no és del tot verídica (quin fiasco!). Moltes gràcies per haver-me recollit en els pitjors moments de la tesi, pels consells en qualsevol camp però també per totes les bones estones que hem passat: cercavila del barri, falles a València i moltes altres festes. Molts cops he semblat "*l'abuelo Pitiu que igual plora que s'enriu*" però sempre has estat ahí ! I gràcies per compartir un projecte tan interessant com ha sigut el documental sobre Huntington. Per cert, encara guardes aquell esquema que em vas fer per març de l'any passat, et recordes? ... Moltes gràcies i molta sort en l'autofagia i en el futur!

Hi ha dues persones, vull dir dos Doctors, amb els qui he compartit cada dia dels quatre anys llargs que ha durat la tesi. Dani, tot i que vas marxar cap a les Alemanyes, vaig aprendre moltes coses amb tu. Sempre que he necessitat alguna cosa has tingut un moment per ajudar-me, per explicar-me algun dubte científic o contar l'anècdota més anècdota del món. Des que vas marxar, ara ja no sé què posa al Pronto, necessite un informe ja! I el Dr. Albert, perdó però vaig a agarrar-me la llicència de tutejar-te! Al meu Sant Polenc preferit, moltes gràcies per estar sempre tan atent i donar-me tantes idees en tot el treball del laboratori. S'aprèn molt d'una persona, tan bona persona i tan culta com ets. Quan ja tingues el teu laboratori muntat, recorda-te'n d'una companya que va fer la tesi amb tu... De ben segur que tens molts més èxits dels que ja has tingut! Gràcies per ser com eres i per estar sempre ahí.

Sense dubte hi ha tres persones a les que m'agradaria donar-los un reconeixement molt especial. Totes tres m'han ajudat molt i, gràcies a elles, he aconseguit arribar fins a ací i he sigut capaç d'escriure aquestes línies d'agraïments. Durant tot el camí de la tesi he caigut molts cops i ells sempre han estat ahí per ajudar a aixecar-me i tirar endavant. A tu Javi, RR.PP. on hi haja, hem compartit íntegrament tota l'aventura. Des del començament del Màster fins als últims dies de paperassa de dipòsits de tesi. T'hauria d'agrair tantes coses... però no sé per on començar. M'has vist molt fotuda i m'has ajudat moltíssim; m'has vist riallera, i m'has punxat per fer-me discutir (cosa que no m'agrada gens); m'has vist seriosa i sempre has tingut un moment per preguntar què em passava... Què més puc demanar? Qualsevol cosa que et puga dir ja ho saps, així que molta sort en la tesi (que de ben segur

t'ixirà brodada). Gràcies a tu he aconseguit mirar-me la vida des d'un altre punt de vista. Com deia el teu estimat Gila, "La vida toda es un chiste. Nacer, morir.....¡Menuda broma!". Moltes gràcies per tot el suport mostrat. A l'altra companya de batalletes, Paola, què dir deprés de tantes hores compartides formant el Pin i Pon del *labo*. Companya de reivindicacions de Màster, de comissions de seguiment, de cafès, de visites a l'Anna Alsina, de sopars, de xerrades... Ufff, de quantes coses! Quants cops he caigut a les teves mans demanant-te ajuda i sempre has estat ahí amb un somriure a la boca? Milers! La majoria de persones sempre pots comptar amb elles per a moment bons, però realment són en moments fotuts on et mostren quin tipus de persona és. Per això, he tingut molta sort en poder comptar amb tu en tot moment. Moltíssimes gràcies per tot el suport i pensa que no és fàcil desfer-se de mi com ja ho hauràs estat notant des de que fa unes mesos vas llegir la tesi! I per últim, una bellíssima persona que des del principi de tota la tesi he pogut comptar amb ell per qualsevol cosa. Xavito, amb tu he pogut parlar de ciència, però també dels temes d'actualitat, de temes personals, de política i de mil coses més. Quants cops hem arreglat el món i tot s'ha quedat igual? Sembla mentida que tenint visions de la vida tan diferents, coincidim en tantes coses. Quants cops m'has ajudat a relativitzar els meus impulsos? Quantes vegades m'has ajudat en els moment més baixos? Amb tu he après a fer fum de les tristors i sempre de mirar les coses des del punt més positiu. Moltes gràcies per tota l'ajuda i per tot el que he après amb tu. No canvis mai però recorda't de contestar els missatges o les trucades!

I darrerament el laboratori s'ha fet gran. Andreas, Gerardo, Mònica, Blanca, Marta i Graciela, molta sort en la tesi i a disfrutar!

A banda de tota la gent del laboratori que m'ha permès que dia rere dia el treball fora molt més fàcil, he d'agrair a les persones que més prop he tingut durant els quatre anys llargs de treball. Primerament, agrair a la meva família catalana que m'ha ajudat en tot moment a no abandonar aquest camí i avançar fermament fins el final. Gràcies Anna i Agustí per tota l'estima rebuda i, sobretot, per compartir tants sopar i dinars i aguantar-me contant-vos cosetes dels ratolins i de les proteïnes amb noms de mitologia grega. També agrair a les meves companyes de pis tot el suport que sempre m'han donat. Carol i Neus, merci per totes aquelles cerveses al bar, pels ànims rebuts i per sempre estar a casa quan tornaves un dia de feina contenta o un altre trista. Conviure amb vosaltres ha fet que el camí fora més planer. I com no, a tots els amics que sempre han hagut d'esperar-me, d'aguantar les anulacions de plans perquè havia treballar i a pesar d'això encara compten amb mi. Eva, Sílvia, Núria,

Marta, Pol i Cris gràcies per ser amics per a lo bo i per a lo roín. I a molta altra gent com l'Anna, la Sílvia i la resta de gent que m'han ajudat a no oblidar que en la vida hi ha moltes més coses que la feina.

I per últim, sense el suport de tota la meva família açò no ho haguera pogut acabar. En especial nomenar a Joan que, tot i que estaves en l'altra punta del món, sempre has tingut un moment per sentir-me i aconsellar-me. Sembla mentida que eres el xicotet, de vegades ho oblide!. I als meus pares que, gràcies a la línia telefònica, he aconseguit tindre'ls a prop sempre que els he necessitat (que no han sigut poques vegades!). Sempre heu pensat i m'heu encoratjat perquè tirara endavant aquesta travessia de la tesi. I ara, ja estic ací amb tot acabat! Quants cops m'heu sentit dir que no ho acabaria? Moltes gràcies per tot el suport i l'esforç que sempre heu fet perquè poguera arribar als objectius que m'he fixat!

Moltes gràcies a tots per haver-me acompanyat per aquesta travessia!

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AP	Anteroposterior
AR	Ácido retinoico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BDNF	Del inglés, <i>Brain derived neurotrophic</i>
bHLH	Del inglés, <i>Basic helix loop helix</i>
BMP	Del inglés, <i>Bone morphogenetic factor</i>
BO	Bulbo olfatorio
BrdU	Bromodeoxiuridina (análogo de Timidina)
BSA	Albúmina de suero
CAG	Citosina-Adenosina-Guanina
CDK	Del inglés, <i>Cyclin dependent kinases</i>
CGR	Células de glía radial
CPI	Células progenitoras intermedias
CTNF	Del inglés, <i>Ciliary neurotrophic factor</i>
DAPI	4,5-diamindino-2-fenilindole.
DARPP-32	Dopamina y cAMP regulada por fosforilación 32 Kda
DTX	Deltex
DIV	Del inglés, <i>Days in vitro</i>
DV	Dorsoventral
E__	Edad embrionaria ____
EGC	Eminencia ganglionar caudal
Egf	Del inglés, <i>Epidermal growth factor</i>
EGL	Eminencia ganglionar lateral
EGM	Eminencia ganglionar medial
FBS	Del ingles, <i>Fetal bovine serum</i>
Fgf	Del ingles, <i>Fibroblastic growth factor</i>
Fgfr	Receptor Fgf
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GFAP	Del ingles, <i>Glial fibrillary acidic</i>
GPe	Globus pálido externo
GPi	Globus pálido interno
ICD	Del inglés, <i>Intracellular domain of Notch</i>
Ik	Ikaros
Ik^{+/+}	Animal salvaje del tansgénico de Ikaros
Ik^{+/-}	Animal heterocigoto del transgénico de Ikaros
Ik^{-/-}	Animal deficientes de la proteína Ikaros
MD1	Medio de diferenciación 1

MD2	Medio de diferenciación 2
MOI	Del inglés, <i>Multiplicity of infection</i>
MSN	Del inglés, <i>Medium spiny neurons</i>
NGF	Del inglés, <i>Nerve growth factor</i>
Ngn	Neurogeninas
NSC	Del inglés, <i>Neural stem cells</i>
NST	Núcleo subtalámico
NT-3 o NT-4/5	Neurotrofina 3 o neurotrofina 4, 5
P __	Edad postnatal __
PBS	Del inglés, <i>Phosphate buffere saline</i>
PCR	Del inglés, <i>Polymerase chain reaction</i>
PDGF	Del inglés, <i>Platelet derived growth factor</i>
PFA	Paraformaldehido
Ptch1	Patched1
Raldh1 y 3	Del inglés, <i>Retinaldehyde dehydrogenase type 1 y 2</i>
RAR_	Del inglés, <i>Retinoic acid receptor</i>
RT-PCR	Del inglés, <i>Real time polymerase chain reaction</i>
S.E.M.	Del inglés, <i>Standard error of mean</i>
Shh	Sonic hedgehog
Smo	Smoothened
SN	Sustancia Negra
SNC	Sistema nervioso central
TGF-β	Del inglés, <i>Transforming growth factor β</i>
Tuj-III	β -III-tubulina
ZM	Zona del manto
ZSV	Zona subventricular
ZV	Zona ventricular
Wt	del inglés, <i>wild type</i>

MARCADORES UTILIZADOS

Nestina	Precusores neurales inmaduros
Tuj-III	Precusores neuronales inmaduros
NeuN	Neuronas maduras
MAP-2	Neuronas maduras
DARPP-32	Neuronas de proyección estriatales DARPP-32 positivas
Encefalina	Neuronas de proyección estriatales encefalina positivas
Calbindina	Neuronas de proyección estriatales calbindina positivas
GFAP	Precusores astrocitarios
O4	Precusores oligodendrocitarios
DAPI	Núcleos celulares

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1 - Estructura de los ganglios basales	3
1.1 - Los ganglios basales: composición y relación	4
1.2 - Estructura del estriado.....	5
1.2.1 - Composición neuronal.....	6
1.2.2 - Compartimentalización estriatal	7
1.2.3 - Funciones del núcleo estriado.....	8
1.3 - Alteraciones y funcionamiento anómalo del estriado	10
1.3.1 - Enfermedad de Huntington.....	11
1.3.2 - Terapia celular en la enfermedad de Huntington	13
2 - Embriología del telencéfalo	15
2.1 - Compartimentalización del telencéfalo: <i>pallium</i> i <i>subpallium</i>	15
2.2 - Determinación anteroposterior del telencéfalo.....	17
2.3 - Determinación dorsoventral del telencéfalo	18
2.3.1 - Factores extrínsecos	19
2.3.1.1 - Sonic hedgehog	19
2.3.1.2- Factores de crecimiento fibroblástico	20
2.3.1.3 - Proteínas morfogenéticas óseas	21
2.3.1.4 - Ácido retinoico.....	22
2.3.2 - Factores intrínsecos	23
2.4 - Desarrollo de estructuras derivadas del telencéfalo	25
2.4.1 - La corteza	25
2.4.2 – El estriado	26
3 – Control del desarrollo de los derivados telencefálicos	27
3.1 – Proliferación celular	28
3.1.1 – Ciclinas e inhibidores de ciclinas.....	30
3.1.2 – Vía de Notch	32
3.2 – Control de la diferenciación celular	33
3.2.1 - Neurogénesis	35
3.2.2 – Astrogénesis	38
3.2.3 – Oligodendrogénesis.....	40
3.3 – MIGRACIÓN CELULAR	41
II. OBJETIVOS	45

III. MATERIALES Y MÉTODOS	49
1 – Animales	51
2 - Cultivos celulares	52
2.1 – Cultivos de neurosféricas	53
2.2 – Cultivos estriatales primarios	55
3 – Transfecciones e infecciones víricas	56
4 – Recogida de muestras	57
5 – Experimentos de expresión génica	58
6 – Análisis de expresión proteica (Western Blot)	60
7 – Ensayos de muerte celular (TUNEL)	61
8 – Hibridaciones <i>in situ</i>	62
9 – Estudios de proliferación celular <i>in vivo</i>	63
10 – Inmunocitoquímica e inmunohistoquímica	65
11 – Recuentos celulares	67
12 – Estadística	69
IV. RESULTADOS	71
1 - El factor de transcripción helios se expresa en diferentes áreas del encéfalo en desarrollo	75
1.1 – Helios se localiza en diferentes áreas neurogénicas del encéfalo	75
1.2 – La expresión de Helios en la EGL se localiza tanto en la ZSV como en la ZM.....	77
1.3 – Helios se relaciona con la expresión de marcadores neuronales durante el desarrollo	79
2 - Helios está implicado en el proceso neurogénico aumentando la diferenciación hacia neuronas en detrimento de los astrocitos	81
2.1 – Helios se expresa en el estado proliferante del ensayo de neurosféricas.....	81
2.2 – La sobreexpresión de Helios induce una reducción de la tasa de proliferación en el ensayo de neurosféricas	83
2.3 – La sobreexpresión de Helios no induce muerte celular apoptótica en el ensayo de neurosféricas	83
2.4 – Helios induce la diferenciación neuronal de los precursores neurales de la EGL a expensas de diferenciación astrocitaria	84

2.5 – Helios incrementa la población neuronal madura en cultivos primarios estriatales.....	88
3 - El factor de transcripción Ikaros se expresa en las células postmitóticas de la ZM de la EGL.....	90
3.1 – La expresión de Ikaros se limita a la ZM de la EGL durante las etapas embrionarias	90
3.2 – Ikaros se expresa en la estirpe neuronal durante el desarrollo estriatal.....	92
4 – Ikaros promueve la salida de ciclo celular de los progenitores neurales	94
4.1 – Ikaros induce una disminución de la tasa de proliferación actuando a nivel del inhibidor de ciclinas p21 ^{Cip/Waf1}	94
4.2 – La disminución de la tasa de incorporación de BrdU viene acompañado por un aumento de diferenciación neuronal.....	98
5 – Ikaros es necesario para la correcta diferenciación neuronal.....	101
5.1 – La ausencia de Ikaros afecta principalmente las neuronas nacidas durante la segunda oleada de neurogénesis.....	102
5.2 – La ausencia de Ikaros afecta selectivamente la población encefalinérgica del núcleo estriado en ratones adultos.....	106
5.3 – Ikaros regula la diferenciación neuronal a expensas de la diferenciación astrocitaria.....	108
6 – Ikaros y Helios actúan de manera secuencial durante el desarrollo embrionario de la EGL.....	108
6.1 – Helios e Ikaros se expresan en diferentes células en la EGL en el desarrollo.....	109
6.2 – Ikaros es esencial para la neurogénesis inducida por Helios.....	110
7 – Helios e Ikaros están relacionados con la vía de señalización estriatal de la familia Dlx pero no con Ebf-1.....	113
7.1 – La expresión de Helios e Ikaros está controlada por miembros de la familia de factores de transcripción Dlx	113
7.2 – La expresión de Helios e Ikaros no modifica la expresión de los factores de transcripción Dlx1/2.....	115
7.3 – Helios e Ikaros muestran una diferente relación con la proteína Dlx5/6.....	116
7.4 – Helios e Ikaros no están implicados en la diferenciación de neuronas controlada por Ebf-1	117
V. DISCUSIÓN	119
1 – Helios e Ikaros se expresan en una subpoblación de precursores neurales	122

2 – Helios e Ikaros actúan regulando diferentes etapas de la diferenciación de los precursores neurales	123
2.1 – La salida de ciclo inducida por Ikaros la realiza mediante el control de las proteínas inhibidoras de ciclinas.....	124
2.2 – Helios e Ikaros favorecen la diferenciación neuronal inhibiendo la astrocitaria en el desarrollo de la EGL	126
2.3 – Ikaros promueve la correcta diferenciación neuronal de la segunda oleada de neurogénesis.....	128
3 – Helios e Ikaros actúan secuencialmente para promover la diferenciación neuronal en el desarrollo de la EGL.....	129
4 – Los miembros de la familia Ikaros participan en el control del patrón de diferenciación de la EGL	131
VI. CONCLUSIONES	135
VI. BIBLIOGRAFÍA	139
VII. ANEXO	161

I. INTRODUCCIÓN

Desde los primeros trabajos de la descripción neuronal por Ramón y Cajal a principios del siglo XX, las neurociencias han avanzado a paso de gigante. Aunque la anatomía y las conexiones entre las diferentes regiones se han descrito con alta precisión, los mecanismos moleculares que controlan cada una de nuestras acciones y conexiones neuronales faltan ser elucidadas. Además, el cerebro humano se caracteriza por presentar una enorme complejidad celular y funcional. Así pues, hemos avanzado mucho durante el último siglo pero aún quedan muchas incógnitas por conocer. Nuestro cerebro es tan complejo que sólo un cerebro con capacidades superiores podría entender completamente el funcionamiento del nuestro.

El desarrollo embrionario del sistema nervioso es uno de los procesos más desconocidos del campo de las neurociencias. Para entender el correcto funcionamiento del sistema nervioso será necesario entender qué procesos se llevan a cabo durante la embriogénesis y cuáles son los mecanismos que lo controlan. Sólo conociendo qué ocurre durante la embriogénesis seremos capaces de entender el funcionamiento y las alteraciones que sufre el cerebro en la vida adulta: procesos de neurodegeneración, malformaciones anatómicas... Toda esta información nos ayudará a desarrollar terapias más evolucionadas que restauren las células neurales que presentan alteraciones funcionales en algunas enfermedades neurodegenerativas. Utilizando la terapia celular con células madre como punto de partida, se pretende conseguir el reemplazamiento de las células perdidas tras el periodo de degeneración.

La presente tesis se centra en el estudio de la diferenciación de las neuronas de proyección estriatales durante el desarrollo embrionario en animales roedores. Un mayor conocimiento de los mecanismos implicados en la diferenciación embrionaria de estas células facilitaría entender por qué hay células que presentan mayor vulnerabilidad en algunas enfermedades. Además, mimetizando en el laboratorio los patrones que ocurren durante el desarrollo se podrán generar *in vitro* neuronas a partir de células madre. Tras la obtención de las neuronas deseadas se podrían utilizar con el fin de regenerar las células degeneradas durante la evolución de las enfermedades neurodegenerativas tales como la corea de Huntington, el Parkinson o el Alzheimer.

1 - ESTRUCTURA DE LOS GANGLIOS BASALES

El telencéfalo es la región más grande del cerebro humano. Consisten en la corteza cerebral, la sustancia blanca subyacente, los ganglios basales, el núcleo

amigdalino y la formación del hipocampo. Los dos hemisferios están conectados entre sí por el cuerpo caloso ofreciendo la conexión de las regiones simétricas en ambos hemisferios. El telencéfalo se ocupa de funciones tanto perceptivas como motoras y cognitivas, incluidas la memoria y la emoción. Cada una de las funciones están realizadas específicamente por las diferentes regiones que conforman el telencéfalo (Kandel, 2000).

1.1 - LOS GANGLIOS BASALES: COMPOSICIÓN Y RELACIÓN

Los ganglios basales constan de cuatro núcleos subcorticales implicados en la realización de funciones motoras, cognitivas, asociativas y mnemotécnicas. La parte dorsal de los ganglios basales, que controla funciones motora y asociativa, está formado por el núcleo estriado (subdividido en caudado y putámen en humanos y primates), el globus pálido (dividido en una porción interna y externa, GPi y GPe respectivamente), la sustancia negra (SN; formada por una parte reticulada y una parte compacta) y el núcleo subtalámico (NST). La parte más ventral, asociada a funciones límbicas, la constituye el estriado ventral o núcleo accumbens, el pálido ventral y el área tegmental ventral. Todos los núcleos están altamente interconectados formando una red compleja que integra la información proveniente de la corteza, tálamo y del tronco cerebral (Bolam y col., 2000; Lévesque y col., 2003) (figura 1).

El núcleo estriado, y en menor manera el núcleo subtalámico, recibe las proyecciones aferentes de la corteza cerebral. La información proveniente de las diferentes capas de la corteza se integra en el estriado junto con la información proveniente de otras áreas del cerebro como el tálamo, la parte reticulada de la SN y los núcleos del tronco encefálico rafe y locus coeruleus. Desde el estriado, la información procesada se envía al GPi y la parte reticulada de la SN. De aquí, la información es enviada al tálamo y posteriormente terminará el circuito devolviendo la señal a la corteza. La transmisión de la información puede realizarse mediante la vía directa en la que conecta el estriado con los núcleos anteriormente citados. Por otra parte, la transmisión de la información desde el estriado a la parte reticulada de la SN puede hacer escala en otros núcleos como el GPe y el NST, constituyendo la vía indirecta. Dependiendo del tipo de información que se transmita, se procesará por una vía o por otra (Bolam y col., 2000; Yelnik, 2002).

La mayor parte de los ganglios basales están compuestos por neuronas que utilizan el neurotransmisor inhibitorio ácido γ -aminobutírico (GABA) excepto el NST y el tálamo que lo forman neuronas excitatorias glutamatérgicas. Así pues, tanto en la vía

directa como en la indirecta, la información que sale del núcleo estriado será transmitida por proyecciones inhibitorias. La parte reticulada de la SN integrará las señales inhibitorias recibidas por la vía directa y las activadoras procedentes de la vía indirecta. De esta manera se genera un mayor control de la transmisión de la información entre los ganglios basales (Smith y col., 1998; Graybiel, 2000; Yelnik, 2002; McHaffie y col., 2005).

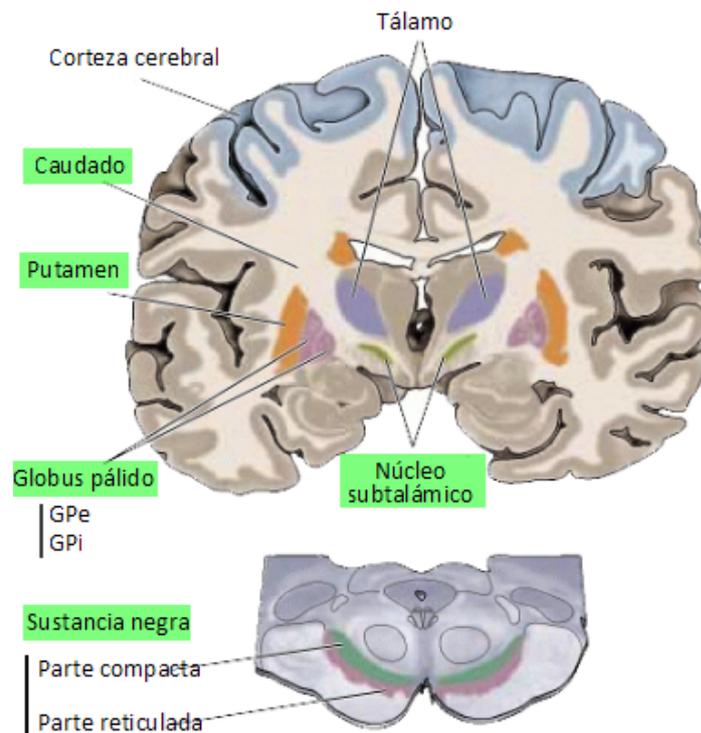


FIGURA 1: Composición de los ganglios basales. (A): En este corte coronal del encéfalo se representan los principales ganglios basales implicados en el control motor. Los cuadros verdes indican los ganglios basales. Los núcleos marcados en color verde corresponden a los que forman parte de los ganglios basales. Imagen modificada de Neuroscience 2nd edition (2001) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf> .

1.2 - ESTRUCTURA DEL ESTRIADO

El núcleo estriado es una masa de sustancia gris situada subcorticalmente en la base del cerebro y la parte externa de cada uno de sus ventrículos laterales. En humanos, este ganglio está formado por el núcleo caudado y por el putámen separados por fibras de sustancia blanca. En cambio, en los animales roedores no existe esta acumulación de fibras y únicamente existe una formación estriatal formada por un único

núcleo. La descripción de las neuronas que forman este ganglio, la funcionalidad y las alteraciones en esta estructura serán explicadas detalladamente en esta sección.

1.2.1 - Composición neuronal

La población neuronal estriatal se ha clasificado en dos grandes grupos según sus características anatómicas, histológicas y fisiológicas (Kawaguchi y col., 1995) (figura 2). La mayor parte de células estriatales, entre el 90 y 95%, constituyen las neuronas de proyección o neuronas espinosas, del inglés *medium spiny neurons* (MSNs), debido al alto contenido de espinas dendríticas en sus ramificaciones. Las neuronas restantes, entre el 5-10%, constituyen las interneuronas caracterizadas por la ausencia de una ramificación tan elevada en sus proyecciones (Ribak y col., 1979; Oertel y Mugnaini 1984; Kreitzer, 2009).

Como ya he comentado, las neuronas de proyección estriatales utilizan el neurotransmisor GABA, por tanto, son células inhibitorias. Además, todas ellas se caracterizan por expresar la proteína DARPP-32 (dopamina y cAMP regulada por fosforilación de 32 KDa) (Ouimet y col., 1992; Gerfen, 1992). Reciben información glutamatérgica proveniente de la corteza y del tálamo y son la principal diana de las neuronas dopaminérgicas de la parte compacta de la SN (Kemp y Powell, 1971). Dependiendo de las conexiones axonales que realicen, las neuronas de proyección se dividen en dos grupos con características histológicas diferentes:

- *neuronas de proyección de la vía directa o neuronas estriato-nigrales*: los axones proyectan a la SN pars compacta. Histoquímicamente se caracterizan por presentar altos niveles de los receptores de dopamina D1, receptores muscarínicos M4, el neurotransmisor dinorfina y sustancia P (Kreitzer, 2009; Ince y col., 1997; Gerfen, 1992)

- *neuronas de la vía indirecta o estriato-palidales*: los axones proyectan a las neuronas del GPe. A nivel químico, estas neuronas presentan altos niveles de los receptores de dopamina D2 y de adenosina A2A y de la endorfina encefalina (Kreitzer, 2009; Gerfen, 1992; Schiffmann y col., 1991).

Las interneuronas o neuronas no espinosas (del inglés *aspiny interneurons*), pese a su escaso número, tienen un papel fundamental en la regulación de la actividad del núcleo estriado ya que envían la información directamente a las MSNs formando microcircuitos estriatales (Tepper y Bolam, 2004). Según su composición química las interneuronas se clasifican en cuatro grupos: a) neuronas de gran tamaño celular que

utilizan como neurotransmisor la acetilcolina; b) neuronas GABAérgicas que coexpresan la proteína de unión al calcio parvalbúmina; c) células nerviosas de tamaño mediano que coexpresan GABA con calretinina; d) neuronas que utilizan el neurotransmisor GABA junto con la hormona proteica somatostatina, el neuropéptido Y y el enzima sintetizador de óxido nítrico (Vincent y col., 1983; Chesselet y Graybiel, 1986; Smith y Parent, 1986; Cowan y col., 1990; Bennett y Bolam, 1993; Kreitzer, 2009).

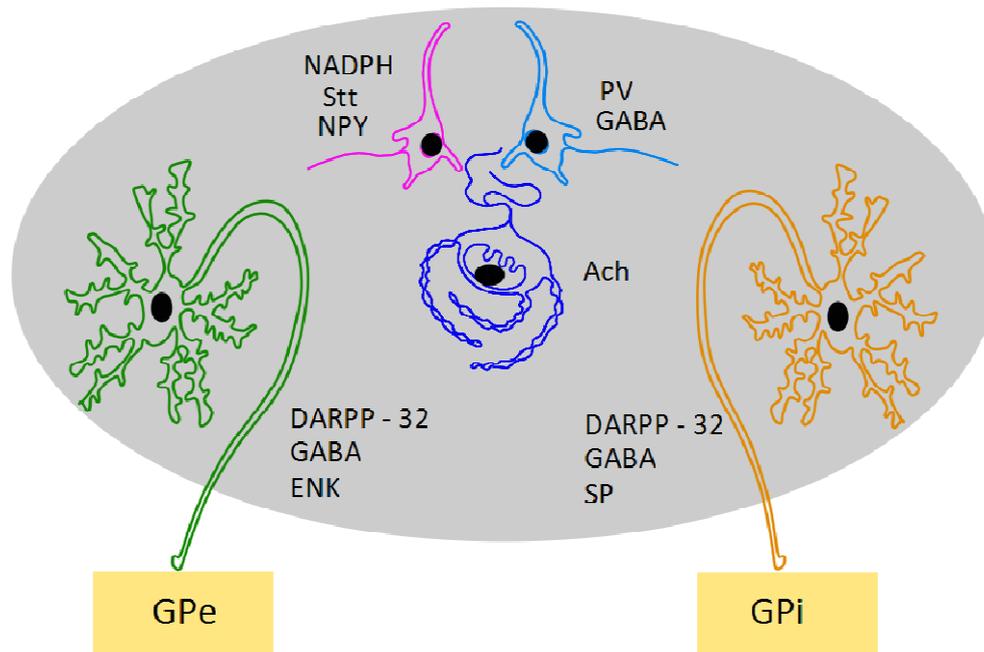


FIGURA 2: Representación esquemática de los diferentes tipos neuronales del estriado adulto. La población de neuronas de proyección, tanto de la vía indirecta (verde) como de la directa (naranja), se caracteriza por presentar espinas en sus dendritas. Existe también una pequeña proporción de interneuronas que se expresan diferentes neurotransmisores tales como neuropéptido Y (NPY), parvalbúmina (PV) o acetilcolina (Ach). Imagen adaptada de la tesis de la Dra. Sonia Marco.

1.2.2 - Compartimentalización estriatal

Las neuronas de proyección del cuerpo estriado se organizan formando dos compartimentos separados: estriosomas (del inglés patches) y la matriz. Un 10-15% de las MSNs se agrupan formando los estriosomas mientras el resto se distribuyen alrededor de éstos formando la matriz. Los dos compartimentos difieren entre ellos por su conectividad y por las características bioquímicas (Gerfen, 1992).

Los estriosomes presentan una alta densidad de receptores μ -opiáceos, alta concentración de sustancia P pero una baja presencia de marcadores colinérgicos siendo esta neuromodulación prácticamente ausente en estas agrupaciones (Graybiel y Ragsdale, 1978; Herkenham y Pert 1981; Bolam y col., 1988). Las neuronas de los estriosomes reciben conexiones de regiones de control límbico y de la corteza frontal (Gerfen y col, 1985). Por su parte, la matriz del estriado presenta una alta concentración de encefalina, altos niveles de los enzimas acetilcolinesterasa y colina acetiltransferasa, calbindina y somatostatina (Gerfen y col, 1985; Graybiel y col., 1986; Donoghue y Herkenham 1986). Las neuronas de proyección de la matriz reciben información de la corteza y del tálamo para enviar la información hacia la parte reticulada de la SN y el GP (Gerfen, 1984; Donoghue y Herkenham 1986). Además, estas regiones reciben la mayoría de las conexiones sensorio-motoras aferentes y están altamente reguladas por dopamina y acetilcolina (Keitzer, 2009).

Esta organización de estriosomes-matriz es especialmente importante durante el desarrollo embrionario de las neuronas de proyección. Durante este periodo, las neuronas nacen y se diferencian en dos oleadas de neurogénesis separadas temporalmente (van der Kooy y Fishell, 1987). Inicialmente las neuronas se encuentran desorganizadas en el estriado en desarrollo y en al final de la etapa prenatal se reorganizan conformando los estriosomes. La agregación selectiva de los diferentes tipos celulares podría estar ocasionada por diferencias en las propiedades adhesivas entre las diferentes MSNs, jugando la familia de las cadherinas un papel importante, sin embargo, aún no se conoce con exactitud (Krushel y col., 1989; Krushel y col., 1995; Redies y col., 2002). Todo el proceso de diferenciación y organización del estriado adulto es, actualmente, el objetivo de estudio de muchos laboratorios para poder así entender mejor la neurogénesis y la relación de este núcleo dentro de los ganglios basales.

1.2.3 - Funciones del núcleo estriado

El estriado, como miembro de los ganglios basales, controla los movimientos motores así como el aprendizaje implícito o de procedimiento (Graybiel, 2000). Las proyecciones corticales que llegan al estriado están topográficamente ordenadas en bucles formando macrocircuitos cortico-estriatales (Middleton y Strick, 2000). El bucle motor, que controla el movimiento de las extremidades, está formado por aferencias neuronales del estriado provenientes de la corteza motora primaria, área suplementaria motora de la corteza y corteza premotora. Como ya se comentó anteriormente, el estriado envía la información hacia la parte reticulada de la SN por la vía directa o

indirecta. Cuando se activa el estriado por la vía directa, las señales excitadoras de la corteza permite una regulación inhibitoria sobre el núcleo GPi con la consecuente activación de las neuronas del tálamo y, posteriormente, la corteza motora. En cambio, la activación de la vía indirecta aumenta transitoriamente la inhibición del tálamo y, consecuentemente, la información que llega a la corteza es menor. En esta vía, la activación de las neuronas inhibitorias del estriado por parte de la corteza permite una activación de la parte reticulada de la SN y una inhibición del tálamo (figura 3). Por lo tanto, la vía directa puede proporcionar una retroalimentación positiva, y la vía indirecta una negativa en la transmisión de la información a partir del estriado. Como resultado, la activación de la vía directa facilita el movimiento, mientras que la activación de la vía indirecta lo inhibe (Smith y col., 1998; Graybiel, 2000; Yelnik, 2002; McHaffie y col., 2005).

Las dos vías de eferencia del cuerpo estriado se ven afectadas de forma diferente por la proyección dopaminérgica que llega a este ganglio procedente de la parte compacta de la SN. Las neuronas del estriado que envían prolongaciones por la vía directa tienen receptores de dopamina D1 que facilitan la transmisión de la información. En cambio, las neuronas que contactan con los núcleos implicados en la vía indirecta presentan receptores D2 que reducen la transmisión. El efecto final de los terminales dopaminérgicos en el control de la transmisión de la información en los bucles cortico-estriatales es reducir la inhibición de las neuronas talamocorticales y, de esta forma, facilitar los movimientos iniciados en la corteza. Sin la acción dopaminérgica en el cuerpo estriado, la actividad de los núcleos de eferencia aumenta (Kandel, 2000).

Estudios realizados en monos han demostrado que no sólo existe un único bucle que controla el movimiento. Existen unos "sub-bucles" que vienen especificados según la región de la corteza donde se originan las aferencias. Dependiendo del origen de las proyecciones, los terminales realizarán contactos en áreas específicas de los diferentes ganglios basales. Es decir, todos los ganglios basales están subdivididos en áreas promotoras, suplementarias motoras o motoras primarias dependiendo del origen de las aferencias. De esta manera, la generación de todos los sub-bucles permite una mayor convergencia de la información y un mayor control del movimiento (Nakano y col., 2000).

Aunque tradicionalmente se ha relacionado el núcleo estriado con el control motor, estudios actuales demuestran la implicación del estriado en otros procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria. Ciertas subregiones de la neocorteza y del estriado reciben conexiones del hipocampo y de la amígdala, estructuras claves en el control del aprendizaje y la memoria (Pennartz y col., 2009). Así pues, dependiendo

del origen de las conexiones, el estriado realizará funciones de control motor, emocional o estará implicado en el proceso del aprendizaje.

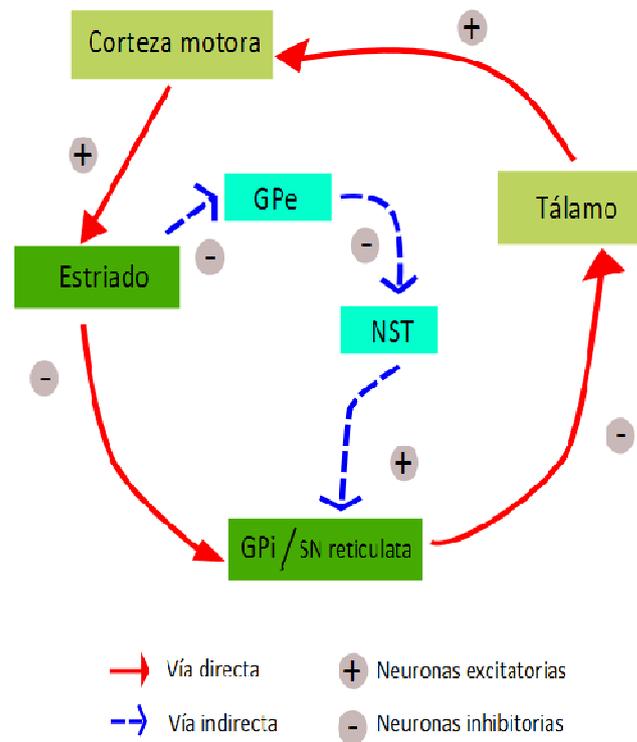


FIGURA 3: Principales conexiones que establece el núcleo estriado con los ganglios basales. Representación de la vía directa (línea continua roja) e indirecta (línea intermitente azul) que transmiten la información motora. En la vía directa, la información de la corteza es enviada por neuronas excitatorias hacia el núcleo estriado. A partir del estriado, las neuronas inhibitorias envían la información hacia el globus pálido interno (GPI) o la parte reticulada de la sustancia negra (SN). De aquí, se envía la información hacia tálamo que termina el control de la vía enviando las señales hacia la corteza usando neurotransmisores excitatorios. La vía indirecta, la información está conducida por neuronas inhibitorias desde el núcleo estriado hacia el globus pálido externo (GPe), de aquí hacia el núcleo subtalámico (NST) que, mediante neuronas excitatorias, devuelve la información hacia la SN reticulada/GPi para cerrar el círculo de control.

1.3 - ALTERACIONES Y FUNCIONAMIENTO ANÓMALO DEL ESTRIADO

Una correcta composición y conexión del núcleo estriado con el resto de ganglios basales es necesario para su correcta función. Alteraciones, tanto en composición celular como en conexiones, provocan graves enfermedades neurológicas. A nivel psiquiátrico, una alteración en la vía cortico-estriato-talámica-cortical y una reducción del volumen del estriado desarrollan el síndrome de Tourette y los trastornos obsesivos compulsivos (TOC) (Tobe y col., 2010). A nivel neurológico, la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SN que proyectan al estriado provoca

una disminución del neurotransmisor en el estriado. Esta falta de proteína afecta negativamente a la actividad del estriado y provoca una hiperactividad de los ganglios basales originando el cuadro típico de la enfermedad de Parkinson. Estas alteraciones acarrearán con graves síntomas motores, emocionales y de aprendizaje (Lewis y Barker., 2009). Por otra parte, las neuronas de proyección del núcleo estriado pueden degenerar progresivamente originando la corea de Huntington. En este apartado describiremos brevemente esta enfermedad para ejemplificar la fuerza de las terapias de sustitución en enfermedades neurodegenerativas.

1.3.1 - Enfermedad de Huntington

La corea de Huntington es una enfermedad neurodegenerativa hereditaria autosómica dominante englobada dentro de las enfermedades de tipo poliglutamina. Es una anomalía que se caracteriza por una progresiva disfunción motora presentando movimientos coreicos, disturbios emocionales, demencia y pérdida de peso. La edad media de inicio de desarrollo de la enfermedad comprende entre los 38 y 40 años, llevando a la muerte de los pacientes tras los 15-20 años desde la aparición de los primeros síntomas (Martin y Gusella, 1986; Bates, 2003;). En Europa, la prevalencia de esta enfermedad es de 3-10 afectados por cada 100.000 individuos (Vonsattel y DiFiglia, 1998; Ferrante, 2009).

La enfermedad de Huntington está ocasionada por una expansión no controlada del triplete citosina-adenosina-guanina (CAG) del exón 1 del gen IT15 que codifica para la proteína huntingtina. Consecuentemente se genera una proteína anómala caracterizada por la presencia de una cola de poliglutaminas. La proteína se expresa de manera ubicua tanto en el sistema nervioso como en los tejidos periféricos y, hoy en día, aún no se conoce su función específica en la célula (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993; Pérez-Navarro y col, 2006). En personas sanas, el número de repeticiones CAG varía entre 17 a 30, en cambio, en los enfermos de Huntington el número de repeticiones asciende, como mínimo, a 35 repeticiones (Myers y col., 1988). El número de repeticiones que presenta el gen está directamente relacionado con la aparición y la severidad de la enfermedad: a mayor número de repeticiones, la edad de inicio de la enfermedad aparece a edades más juveniles y es más severa (Duyao y col., 1993). A pesar de la expresión ubicua de la proteína, la mutación de la huntingtina únicamente ocasiona disfunciones en determinadas áreas cerebrales y afecta específicamente a unos tipos neuronales (Ferrante y col., 1987; Strong y col., 1993; Bhide y col., 1996).

En la enfermedad de Huntington, las neuronas de proyección MSN del estriado son las primeras en presentar una progresiva disfunción y posterior degeneración (Ferrante y col., 1991) mientras que las interneuronas no se ven afectadas (Ferrante y col., 1985; Vonsattel y col., 1985). Además, entre las neuronas MSNs, las que expresan encefalina se ven afectadas antes que las que expresan sustancia P (Reiner y col., 1998). A medida que avanza la enfermedad, la atrofia del estriado deja paso a una alteración de otras áreas del encéfalo como la corteza cerebral (figura 4). La afectación específica de las poblaciones neuronales debido a la presencia de la huntingtina mutada también se observa en esta región. Se ha descrito que una degeneración selectiva de las neuronas piramidales de la capa III, V y VI de la corteza motora y asociativa (DiFiglia y col., 1997).

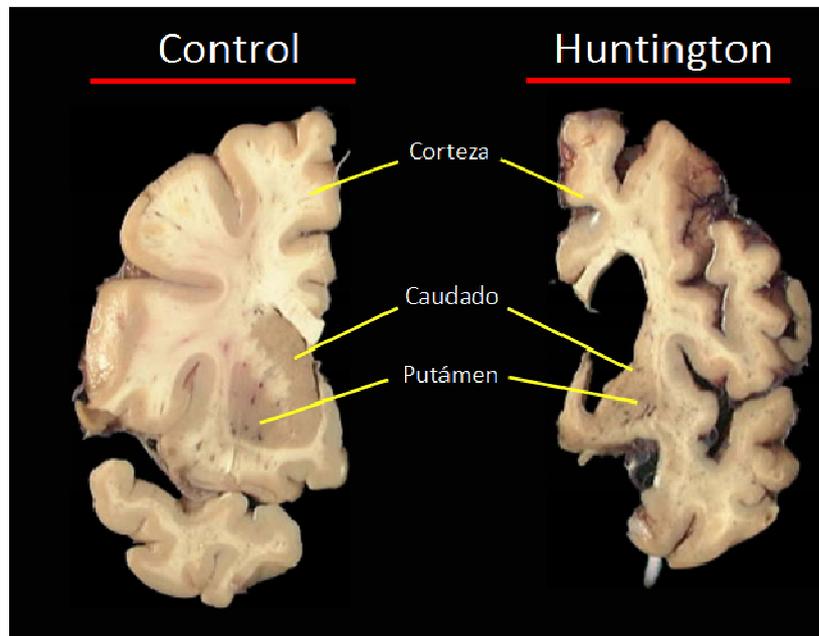


FIGURA 4: Patología de la enfermedad de Huntington. Sección coronal del encéfalo donde se aprecia una degeneración del núcleo estriado (caudado y putámen) junto con una degeneración cortical. Como consecuencia, el volumen del ventrículo lateral aumenta en el cerebro afectado por la enfermedad de Huntington. Imagen adaptada de la web <http://hdroster.iu.edu>.

A pesar del alto grado de conocimiento de la fisiopatología de esta enfermedad, en la actualidad las terapias usadas en el tratamiento de la corea de Huntington únicamente tratan la sintomatología. Aún no se ha desarrollado ninguna terapia efectiva que modifique ni el grado de evolución ni la aparición de la enfermedad (Ramaswamy y col., 2007).

Actualmente se está investigando con tal de abordar la terapia desde tres puntos de vista. Una primera aproximación sería la farmacológica en la que se pretende diseñar fármacos con la finalidad de evitar el malfuncionamiento celular originado por la presencia de la proteína mutada. En una segunda aproximación, actualmente se está apostando por una terapia basada en la erradicación o sustitución de la proteína mutada por otra proteína funcional. Y por último, la terapia celular se presenta como la última aproximación con tal de reparar la muerte neuronal originada por la presencia de la proteína mutada.

1.3.2 - Terapia celular en la enfermedad de Huntington

En este tipo de enfermedades donde hay una muerte neuronal selectiva, la terapia celular se perfila como el tratamiento idóneo para reemplazar las células que han degenerado. Dependiendo del nivel de actuación de las terapias (protección o reemplazamiento) éstas se pueden clasificar en tres tipos: terapias neuroprotectoras, terapias de movilización endógena de la neurogénesis y terapias de sustitución.

El objetivo principal de las terapias neuroprotectoras es el de modificar la progresión de la enfermedad basándose en el concepto de preservación neuronal. De esta manera se intenta atenuar o retrasar el comienzo de los síntomas de la enfermedad preservando los circuitos neuronales más vulnerables a la degeneración (Ramaswamy y col., 2007). Las principales moléculas neuroprotectoras estudiadas en este tipo de terapias son las neurotrofinas. Dentro de esta familia, las más estudiadas han sido el factor de crecimiento nervioso (NGF; del inglés nerve growth factor), el factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF; del inglés brain derived neurotrophic factor), la neurotrofina 3 (NT-3) o la neurotrofina 4/5 (NT-4/5) (Canals y col., 2004; Alberch y col., 2004;). También se han utilizado otros compuestos como el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF; del inglés glial cell-line neurotrophic factor) y varias citoquinas (Alberch y col., 2002; Schober y col., 2007; Lindvall y Wahlberg, 2008). Los compuestos que se utilizan en este tipo de terapias pueden administrarse por vía sistémica, siempre y cuando tengan la capacidad de travesar la barrera hematoencefálica. Como la gran mayoría de ellos son moléculas proteicas que no pueden atravesarla, se ha apostado por el trasplante intracerebral de diferentes tipos celulares con capacidad de liberar estos factores neuroprotectores (Martinez-Serrano y Bjorklund, 1997; Pineda y col., 2007; Giralt y col., 2010).

La otra aproximación terapéutica sería la movilización de la neurogénesis endógena para generar nuevas neuronas que suplan las degeneradas. Diversos estudios demuestran que el aprendizaje, el ejercicio y la riqueza de estímulos del

entorno incrementan la neurogénesis y el reemplazo neuronal en animales de experimentación. La liberación de señales endógenas delante cualquier estímulo puede reparar o evitar la muerte neuronal (Kempermann y col., 1997; Van Praag y col., 2000; Nottebohm, 2002; Lie y col., 2004).

Por último, las terapias de sustitución, pensadas para realizarse en pacientes en estados tardíos de la enfermedad, consisten en el reemplazo de las células que ya han degenerado. A pesar de sus dificultades experimentales, prometen ser las terapias de la medicina personalizada. Las primeras aproximaciones en este tipo de terapias datan de la década de 1980, cuando se trasplantó la eminencia ganglionar fetal (primordio telencefálico) en el estriado de ratas que habían sufrido una lesión excitotóxica en el mismo núcleo (Graybiel y col., 1989). Tras observar una mejora en los síntomas motores y cognitivos, se pasaron a realizar estudios en modelos animales de la enfermedad de Huntington y, posteriormente, ensayos clínicos en humanos. En el campo de la clínica, diferentes grupos han trasplantado tejido fetal pacientes que no muestran una atrofia del estriado muy severa. En todos los casos estudiados, el grado de supervivencia era alto sin producir un crecimiento descontrolado y observándose mejoras motoras y cognitivas en los pacientes menor a las esperadas en largos periodos (Rosser y col., 2002; Peschanski y col., 2004). Tras seis años del trasplante de tejido neural fetal se observó que los pacientes presentaban un periodo de estabilidad y de mejora motora limitado. En ningún caso se les curaba la enfermedad y, a parte, siempre se les tenía que administrar tratamiento neuroprotectivo, hecho que cuestionaba el éxito de esta metodología (Bachoud-Lévi y col., 2006). Aunque el trasplante de tejido fetal puede ser una aproximación viable para el tratamiento de la enfermedad, las cuestiones prácticas y éticas relacionadas con la obtención del tejido suponen un gran obstáculo. Debido a las propiedades de diferenciación de las células madre y las capacidades de reestablecer circuitos neuronales, se ha apostado en esta fuente de células para ser usadas en la terapia sustitutiva.

A pesar de los resultados prometedores obtenidos en los trasplantes de las células madre en modelos animales, el paso definitivo a la clínica parece estar lejos. En el caso del sistema nervioso, la baja efectividad de diferenciación de las células madre hacia el fenotipo deseado supone una dificultad para la aplicación inmediata. Reproducir en el laboratorio las secuencias que ocurren durante el desarrollo embrionario del sistema nervioso central (SNC) es un objetivo llevado a cabo por muchos laboratorios actualmente. Aunque existen muchos grupos trabajando en estudiar los factores que están implicados en la regulación de la diferenciación de las estirpes neuronales durante embriología del sistema nervioso central continúa siendo muy atractivo para los investigadores.

2 - EMBRIOLOGÍA DEL TELENCEFALO

Es fundamental conocer con exactitud el desarrollo del encéfalo para dar respuesta a muchas preguntas de las neurociencias actuales. El SNC se desarrolla a partir del tubo neural formado durante el proceso de neurulación. Las células de la parte rostral del tubo neural presentan diferentes tasas de proliferación originando la formación de tres vesículas diferenciadas: prosencéfalo o cerebro anterior, mesencéfalo y rombencéfalo. A medida que avanza el desarrollo, estas vesículas sufren una serie de pliegues y subdivisiones originando la aparición de 5 vesículas: telencéfalo, diencefalo, mesencéfalo, metencéfalo y mielencéfalo o rombencéfalo. De estas vesículas se desarrollarán las diferentes estructuras del SNC maduro (figura 5). Dado en que en esta tesis únicamente nos centraremos en el desarrollo embrionario del núcleo estriado, pasaremos a comentar el proceso de diferenciación del telencéfalo, que es donde se ubica el primordio de este núcleo.

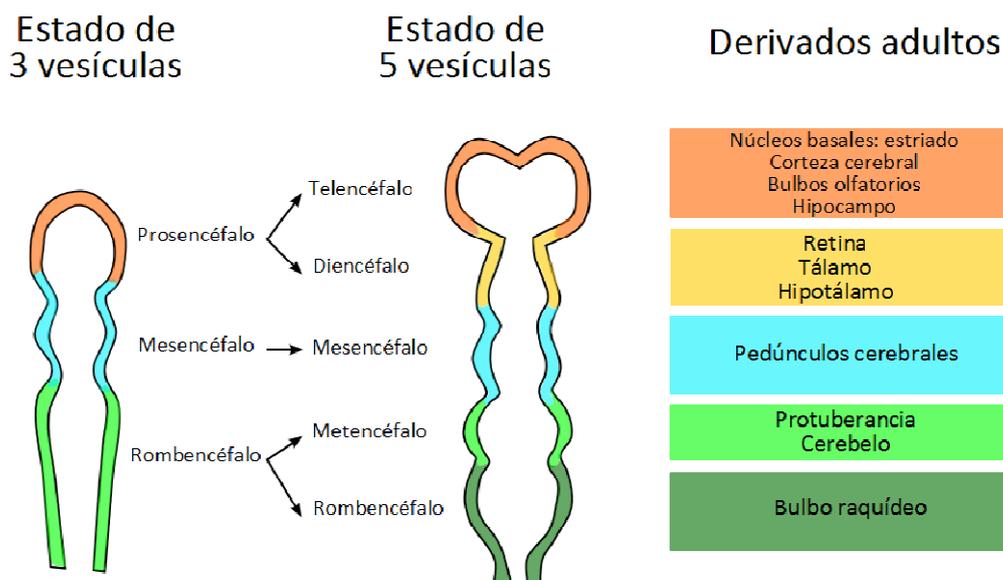


FIGURA 5: Principales subdivisiones del sistema nervioso durante el desarrollo embrionario. Debido a las diferencias en la tasa de proliferación en las zonas del tubo neural, a partir de las 3 vesículas iniciales se formarán 5 que darán lugar a diferentes estructuras en el animal adulto. Imagen modificada de Developmental Biology (2001), Gilbert <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>.

2.1 - COMPARTIMENTALIZACIÓN DEL TELENCEFALO: *PALLIUM* | *SUBPALLIUM*

El telencéfalo embrionario está dividido en dos áreas progenitoras responsables de generar, con alta precisión y de manera compleja, la totalidad de neuronas

excitatorias e inhibitorias del cerebro anterior. En el eje dorsoventral (DV) del telencéfalo se forman las estructuras llamadas *pallium* o telencéfalo dorsal y el *subpallium* o telencéfalo ventral alrededor del ventrículo lateral (Marin y Rubenstein 2001; Wonders y Anderson, 2006).

El *pallium* está subdividido regionalmente en cuatro áreas que originarán diferentes estructuras: el *pallium medial* que originará el hipocampo; el *pallium dorsal* que dará lugar a la isocorteza; el *pallium lateral* que formará la corteza olfativa y una parte de la amígdala; y el *pallium ventral* del que se formará el resto de la amígdala y el *claustrum* (Rubenstein, 2000; Medina y Abellán, 2009) (figura 6). El *subpallium* presenta diferencias en la tasa de proliferación provocando la formación de las eminencias ganglionares. En la parte anterior se distingue la eminencia ganglionar medial (EGM) de la que se originarán las interneuronas de corteza y estriado. En la parte ventrolateral se distingue la eminencia ganglionar lateral (EGL) a partir de la cual se originarán las neuronas de proyección del estriado e interneuronas que migrarán al bulbo olfatorio. Y, en la parte más posterior del telencéfalo, aparecerá la eminencia ganglionar caudal (EGC) que dará lugar a neuronas que migrarán a diferentes destinos del encéfalo adulto (Bulfone y col., 1993; Puelles y col., 2000). La división entre *pallium* y *subpallium* está formada por una zona de transición conocida como zona de unión de *pallium* y *subpallium* o PSB (del inglés pallial-subpallial boundary) donde convergen la expresión de diferentes factores de transcripción que determinan la disposición DV (Carney y col., 2009). Tanto el *pallium* como el *subpallium* están formados por tres áreas diferenciadas según las características de las células que las componen. La zona que está en contacto con el ventrículo lateral llamada zona ventricular (ZV). La zona más profunda en contacto con la ZV se llama zona subventricular (ZSV). Y, por último, la zona más interna alejada del ventrículo recibe el nombre de zona del manto (ZM). En la primera y segunda capa se localizan los progenitores neurales mientras que en la ZM las células que lo componen son células diferenciadas que darán lugar a las diferentes estirpes neurales que conforman el cerebro adulto (Sauvageot y Stiles, 2002; Ross y col., 2003) (figura 6).

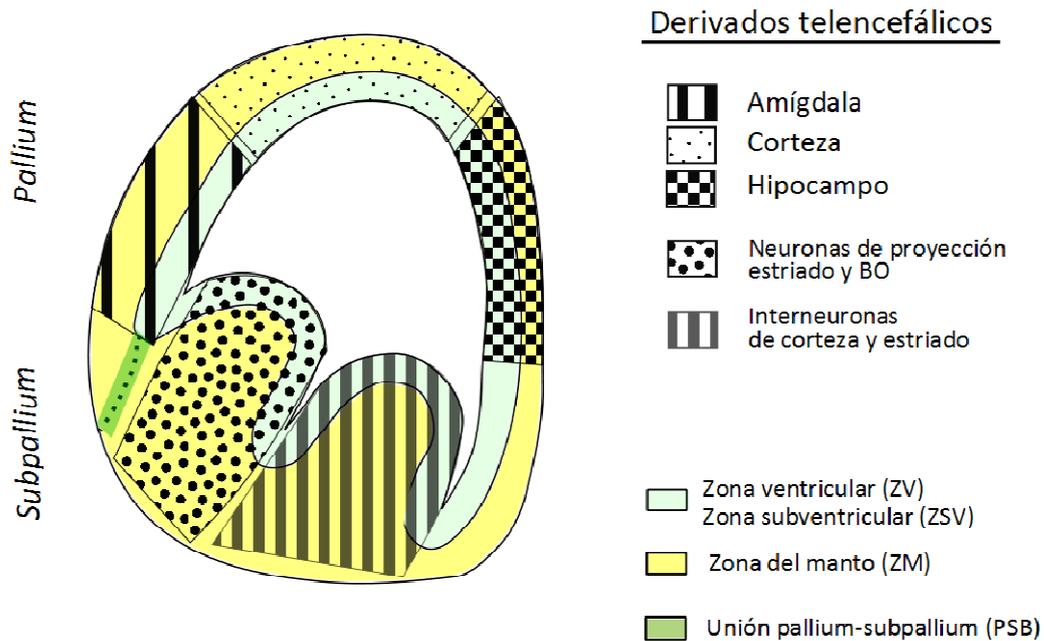


FIGURA 6: Representación de los derivados adultos originados de la vesícula telencefálica. La vesícula telencefálica se divide en tres áreas según la tasa de proliferación celular: la zona ventricular (ZV), la zona subventricular (ZSV) y la zona del manto (ZM). Las diferentes subdivisiones del *pallium* y del *subpallium* darán lugar a estructuras adultas muy diversas.

2.2 - DETERMINACIÓN ANTEROPOSTERIOR DEL TELENCEFALO

La inducción de las características rostro-caudal (eje anteroposterior, AP) del telencéfalo precede al DV durante el desarrollo embrionario. A lo largo del eje AP se formarán estructuras tan diversas como el neocortex (a partir *pallium* anterior) o la formación del hipocampo (a partir del *pallium* posterior). Deben existir unos mecanismos de regulación exhaustivos para regionalizar las vesículas telencefálicas. En la porción medial del *pallium* se ha descrito la presencia de un centro organizador llamado pliegue cortical (del inglés cortical hem) caracterizado por la expresión de determinados factores extrínsecos e intrínsecos (Subramanian y Tole., 2009). Los factores de transcripción Foxg1 y Lhx2 se expresan en el *pallium* anterior y desaparece la expresión a partir del pliegue cortical. Esta inhibición de la expresión es la que confiere el carácter caudal del *pallium*. Animales deficientes en la proteína Foxg1 presentan una expansión de estructuras caudales caracterizadas por la presencia de marcadores hipocampales en regiones neocorticales (Muzio y Mallamaci; 2005; Hoch y col., 2009). De la misma manera, animales quimeras con regiones de ausencia de expresión de Lhx2, presentan islotes con marcadores hipocampales en las regiones

correspondientes a la abolición de la proteína (Mangale y col., 2008). A parte de la expresión de diversos factores de transcripción, morfógenos o factores extrínsecos activan vías de señalización específicas para la correcta formación del eje AP. La vía Wnt se activa por la unión específica del ligando extracelular determinado al receptor de membrana llamado Frizzled. A nivel intracelular se propicia la entrada del factor β -catenina al núcleo celular donde activará genes específicos. Animales con una expresión constitutiva de β -catenina inducen a las células corticales a adoptar características hipocampales (Machon y col., 2007), la cual cosa indica la inducción caudal que ejerce este factor durante el desarrollo. En cambio, uno de los miembros de la familia de factores de crecimiento fibroblástico (Fgf, del inglés fibroblastic growth factor), el Fgf8, induce características rostrales en los territorios donde actúa (Shimogori y col., 2004).

A pesar de la implicación de estos factores en la regionalización rostro-caudal del telencéfalo, nuevas aproximaciones científicas serán necesarias para establecer con exactitud los mecanismos implicados en la determinación de los ejes y la correcta diferenciación de las vesículas telencefálicas. Además, se ha observado que durante el avance del desarrollo varían las señales que confieren las propiedades espaciales. En las etapas tempranas, la presencia de centros de señalización, como las hendiduras corticales, es imprescindible para la correcta regionalización. En cambio, en etapas posteriores la identidad regional y la tasa de crecimiento viene delimitado por mecanismos celulares autónomos, sin tener en cuenta el ambiente externo.

2.3 - DETERMINACIÓN DORSOVENTRAL DEL TELENCEFALO

Los factores que intervienen en la regionalización DV se pueden englobar en factores extrínsecos y factores intrínsecos igual como ocurre durante la determinación AP. Tras la separación de las estructuras del telencéfalo anterior, las diferentes zonas se diferenciarán durante la embriogénesis para dar lugar a estructuras tan diferentes en el adulto como la corteza, el bulbo olfatorio o el estriado. A continuación se resumirán los factores más estudiados y la función que ejercen durante el desarrollo del telencéfalo.

2.3.1 - Factores extrínsecos

La implicación de morfógenos, en el desarrollo embrionario del SNC ha sido estudiada principalmente en médula espinal. Los estudios realizados en esta región demuestran que tanto la determinación de los ejes AP y DV está establecida por gradientes de concentración de los morfógenos secretados. Estos factores modifican los diversos factores de transcripción que serán los responsables de la determinación final. En el desarrollo del telencéfalo se ha descrito que no son tan importantes los gradientes establecidos como la temporalidad de la expresión (Jessell, 2000).

2.3.1.1 - Sonic hedgehog

Sonic hedgehog (Shh) es un potente factor que induce carácter ventral a las estructuras del sistema nervioso durante el desarrollo embrionario (Echelard y col., 1993). Durante la neurulación, Shh se libera en regiones específicas de tubo neural para ejercer el efecto ventralizante. En la etapa de formación de las vesículas telencefálicas, la síntesis de Shh está restringida al *subpallium* y más concretamente a la zona medial de la EGM (Takahashi y Liu; 2006). El uso de anticuerpos de Shh para alterar su efecto demuestra que la función ventralizante de este morfógeno es específica en cada etapa del desarrollo embrionario (Rallu y col., 2002). La adquisición del carácter ventral del telencéfalo viene dado por el efecto de Shh ejercido durante la gastrulación, mientras que la exposición posterior confiere al telencéfalo un carácter ventrolateral. A diferencia de la dependencia de gradiente de concentración de Shh que ocurre durante el desarrollo de la médula espinal, el telencéfalo embrionario responde al efecto ventralizante según el periodo de liberación del morfógeno (Gunhaga y col., 2000). La alteración de los niveles de Shh en el desarrollo del SNC origina importantes malformaciones embrionarias. Así pues, en los animales deficientes de Shh se observa una holoprosencefalia caracterizada por la presencia de una estructura ventral rudimentaria, demostrando la importancia del morfógeno Shh en la determinación ventral del telencéfalo (Chiang y col., 1996).

Para entender la función de Shh tenemos que estudiar las proteínas que median la respuesta en las células progenitoras. Resumiendo la cascada de señalización, Shh se une a un receptor de membrana llamado Patched1 (Ptch1) revirtiendo la represión de la proteína Smoothed (Smo), y en consecuencia, activándola. Smo activa principalmente la proteína Gli que, al traslocarse al núcleo se une al ácido desoxirribonucleico (ADN) para promover la transcripción de los genes diana, entre los que se encuentra el mismo receptor Ptch1, con tal de amplificar la función de Shh

(Stranton y Peng, 2010). Así pues, las proteínas pertenecientes a la familia Gli son esenciales para la señalización del morfógeno Shh. La familia de genes Gli está formada por tres genes diferentes (Gli1, Gli2 y Gli3) actuando Gli1 y Gli2 como proteínas activadoras y ofreciendo un carácter ventral. La proteína Gli3 actúa como proteína represora y, consecuentemente, activa un patrón dorsal (Matise y Joyner, 1999). Animales con las proteínas Gli1 y Gli2 eliminadas (Gli1^{-/-} y Gli2^{-/-}) presentan un desarrollo correcto del telencéfalo debido, seguramente, a una compensación por parte del otro miembro de la familia. En cambio, los animales deficientes de Gli3 (Gli3^{-/-}) presentan una extensión de los marcadores ventrales hacia las zonas dorsales de las vesículas telencefálicas (Grove y col., 1998; Theil y col., 1999). El hecho que los animales mutantes para Shh y Gli3 presenten fenotipos opuestos sugiere que debe existir un balance entre Shh y Gli3 para la correcta regionalización mediada por Shh. Así pues, analizando los animales deficientes para los dos genes Shh y Gli3 (Shh^{-/-}; Gli3^{-/-}) se observa que la especificación ventral está visiblemente recuperada respecto a los dos mutantes simples (Wang y col., 2000; Litingtung y col., 2002).

2.3.1.2- Factores de crecimiento fibroblástico

La familia Fgf está compuesta por 22 polipéptidos que participan en diversos procesos biológicos como el control de la proliferación, diferenciación, migración y organogénesis (Eswarakumar y col., 2005; Iwata y Hevner, 2009). Dentro de toda la familia de Fgf son los Fgf8, Fgf15, y los receptores de Fgf 1 y 2 los responsables en la señalización ventral en este momento del desarrollo (Iwata y Hevner, 2009). Estos factores se unen a uno de los cuatro receptores tirosina-quinasa de alta afinidad llamados Fgfr (del inglés, Fgf receptors). Recientemente se ha observado que Fgf y Fgfr específicos están implicados en la determinación DV de las vesículas telencefálicas. Durante el proceso de neurulación estos factores han sido relacionados con la adquisición de carácter rostral del tubo (Crossley y Martin, 1995; Iwata y Hevner, 2009), y como veremos a continuación, en la determinación ventral de las vesículas telencefálicas.

El compuesto Fgf8 promueve propiedades ventrales induciendo genes que se expresan en esta región y reprimiendo otros genes dorsales (Kuschel y col., 2003; Iwata y Hevner, 2009). Este compuesto se expresa durante el desarrollo embrionario del encéfalo desde E8,5 (edad embrionaria 8,5 días) hasta E12,5 (Echevarria y col., 2005). Se ha descrito que este factor está regulado por la señalización de Shh y Gli3. El análisis de Fgf8 en los animales deficientes Shh^{-/-}, Gli3^{-/-} y Shh^{-/-}; Gli3^{-/-} demuestra que el factor Fgf8 no está presente en el primer de los animales y existe una

sobreexpresión en los dos últimos animales. Estas observaciones nos permiten concluir que Fgf8 está inhibido por Gli3: en ausencia de Shh la proteína Gli3 no se encuentra inhibida y, por tanto, se traduce en una inhibición de Fgf8 en el caso de los animales *Shh^{-/-}* (Aoto y col., 2002). Otro miembro de la familia de los Fgf, el Fgf15, también está inducido por la vía de señalización de Shh y, por consiguiente, implicado en la determinación DV (Rash y Grove, 2007; Borello y col., 2008). La importancia de la familia Fgf ha sido confirmada por el estudio realizado en animales que no expresan alguna combinación de los miembros de la familia Fgfr. Animales que pierden la expresión de Fgfr1 y Fgfr3 presentan una correcta especificación ventral del telencéfalo aunque pierden el surco existente entre las EGM y EGL debido a errores en la diferenciación. En el caso de eliminar los receptores Fgfr1 y Fgfr2 se produce una drástica reducción de marcadores ventrales. Y, por último, en el caso que se delecten los tres receptores, Fgfr1, Fgfr2 y Fgfr3, se produce una abolición total de los dominios dorsales y ventrales (Gutin y col., 2006; Hebert y Fishell 2008). La señalización intracelular de los receptores de Fgf está mediada por la vía de señalización fosfatidilinositol y la vía Ras-Erk. La unión de factores como Fgf8 a sus receptores activan la expresión de moléculas como Mkp3/Sef y la familia Sprouty para crear el gradiente necesario y asegurar la correcta formación del eje DV (Echevarria y col., 2005). Estas evidencias *in vivo* demuestran que la señalización por Fgf está controlado por la vía de Shh y Gli3 y que la integridad de las dos vías son imprescindibles para la correcta especificación ventral del telencéfalo.

2.3.1.3 – Proteínas morfogenéticas óseas

Las proteínas morfogenéticas óseas (BMP; del inglés bone morphogenetic proteins) ejercen un importante papel durante la organogénesis del SNC. En la médula espinal, las BMPs activan la especificación dorsal (Rallu y col., 2002). En el desarrollo del telencéfalo, estudios en peces zebra mutantes de uno de los miembros de BMPs pierden la expresión de genes que atorgan la propiedad dorsal, como el gen *Emx1*, de las vesículas telencefálicas (Shanmugalingam y col., 2000). Además, estudios posteriores han demostrado que en la parte ventral del tubo neural se expresan inhibidores de las BMPs tales como Noggin, Chordin y Follistatin para antagonizar el efecto dorsalizante de las BMPs (Wilson y Maden, 2005). A pesar de los efectos observados, la implicación exacta de las BMPs en la regionalización DV continua siendo controvertida. El hecho que los mutantes de BMPs tengan afectadas otras vías de señalización necesarias para la determinación inicial del tubo neural dificulta la interpretación de los efectos observados.

2.3.1.4 - Ácido retinoico

El ácido retinoico (AR) está implicado en la neurogénesis en diferentes etapas del desarrollo del estriado confiriendo carácter ventral a estas estructuras. En las primeras etapas de neurulación, la ausencia del enzima de síntesis de AR Raldh2 (del inglés retinaldehyde dehydrogenase type 2) provoca una reducción de la tasa de proliferación y una consecuente malformación del tubo neural (Ribes y col., 2006). La especificidad de expresión de las moléculas implicadas en la síntesis y respuesta del AR revela una acción selectiva de este factor durante el desarrollo del estriado. Los enzimas involucrados en la síntesis de Raldh1 y Raldh3 (del inglés retinaldehyde dehydrogenase type 1 y 3) se expresan selectivamente en los terminales axonales aferentes que inervan la EGL y en la ZM de la EGL, respectivamente (McCaffery y Drager, 1994; Li y col., 2000). El hecho que en el estriado se encuentren gran densidad de enzimas participantes en la síntesis de AR, se correlaciona con una alta concentración del morfógeno en la EGL (Toresson y col., 1999). No sólo la síntesis del AR es selectiva en esta eminencia, también se encuentra una regionalización en la expresión de los receptores del morfógeno. Los receptores que forman heterodímeros para la correcta señalización, RAR α , RAR β , RXR β y RXR γ (del inglés retinoic acid receptor y retinoico X receptor), se expresan selectivamente en la EGL y en el estriado adulto (Krezel y col., 1999; Liao y col., 2005). Y por último, la síntesis de proteínas de unión a AR, como retinol, que facilitan su síntesis, y los enzimas encargados de su degradación también se expresan selectivamente en la EGL (Ruberte y col., 1993; Zetterstrom y col., 1994). El enriquecimiento de las moléculas involucradas en la señalización del AR en la EGL confiere la especificidad del sistema en esta región (Takahashi y Liu, 2006).

En cuanto a la acción del AR durante el desarrollo de la EGL se ha observado que está implicado en la regionalización de las vesículas telencefálicas. Más concretamente, se ha descrito que contribuye a la separación de las EGM y EGL mediante la activación de factores de transcripción como Meis2 (Toresson y col., 2000; Marklund, 2004; Takashashi y Liu, 2006). Además, el AR también induce la expresión de proteínas específicas de células estriatales como DARPP-32 y receptores de dopamina estriatales D1 y D2 (Liao y col., 2005). La importancia de la correcta señalización del AR durante el desarrollo embrionario se corrobora cuando estudiamos animales que presentan alteraciones en la expresión de algunos de los componentes de la vía. Animales deficientes en el receptor RAR β o en combinaciones de alguno de los receptores RAR o RXR presentan un defecto en la formación del compartimento

estriatal acompañado por una reducción de marcadores estriatales (Kreezel y col., 1999; Liao y col., 2008).

Los factores descritos anteriormente no actúan de manera independiente durante la regionalización del telencéfalo. Se ha observado, por ejemplo, que las BMPs regulan positivamente la expresión de Gli3 (Meyer y Roelink, 2003). También se ha descrito una conexión entre las vías de señalización de Shh, Fgf y AR (Ribes y col., 2006). Por tanto, la correcta adquisición del fenotipo celular dorsal o ventral vendrá dado por un balance óptimo de los morfógenos anteriormente citados. Estos factores convergen induciendo un conjunto de factores de transcripción que directamente establecerán la identidad regional dentro del telencéfalo.

2.3.2 - Factores intrínsecos

La expresión específica de determinados factores de transcripción que contienen algún homeodominio bHLH (del inglés Basic helix loop helix) en su estructura induce la regionalización DV del telencéfalo embrionario. Los diferentes factores de transcripción ejercen funciones de activación y de represión entre ellos con la finalidad de determinar los límites del *pallium* y *subpallium*.

Durante las etapas tempranas del proceso de establecimiento del *pallium* y *subpallium*, el telencéfalo dorsal se caracteriza por la expresión del factor de transcripción Pax6. Animales que presentan la proteína Pax6 no funcional presentan un elongación del *pallium* ventral (Kroll y O'Leary, 2005; O'Leary y col., 2007). En regiones ventrales se observa la expresión del factor de transcripción Gsh2 (también llamado Gsx2). Existe una represión mutua entre los factores Pax6 y Gsh2 de manera que se genera un área intermedia donde no hay expresión de Pax6 pero sí de Gsh2 a partir de la cual se delimita el *subpallium* (Toresson y col., 2000; Carney y col., 2009). Animales que presentan deficiencias en la expresión de uno de los dos factores de transcripción presentan una expansión del territorio de dominio opuesto (Yun y col., 2001). La región más ventral del *subpallium* se caracteriza por la expresión del factor de transcripción Nkx2.1. Sin conocer demasiado el mecanismo de acción de este factor de transcripción, la presencia de Nkx2.1 induce propiedades de la EGM inhibiendo el carácter de EGL del territorio vecino (Sussel y col., 1999; Corbin y col., 2003). Así pues, encontramos que los territorios del *pallium* se caracterizan por la expresión de Pax6 y el *subpallium* por la expresión de Gsh2. Dentro del *subpallium*, se diferencia la EGL y EGM por la expresión de NKx2.1 en la última región.

A medida que el desarrollo avanza, estos factores quedan limitados en las zonas germinales de del telencéfalo, es decir, en la ZV. En la ZM se activaran otros factores de transcripción con el fin de diferenciar los progenitores a las células derivadas. Las neuronas de proyección glutamatérgicas derivadas del *pallium*, tras la expresión de Pax6 expresan genes como Emx1, Neurogenina1/2 (Ngn 1/2), NeuroD1 y Tbr1/2 para su diferenciación terminal (Guillemot 2007; Mattar y col., 2008; Sansom y col., 2009). En el *subpallium*, los progenitores que se diferenciaron a las neuronas estriatales (provenientes de la EGL) y las interneuronas corticales y del bulbo olfatorio (provenientes de la EGM) comparten varios factores de transcripción. Tras la expresión de Gsh2, se activarán los factores Dlx1/2 (Anderson y col., 1997) y Mash1 (también llamado Ascl1) (Casarosa y col., 1999; Wang y col., 2009) que determinaran la diferenciación terminal de estos precursores. Así pues, la determinación inicial de las estructuras telencefálicas permiten activar diferentes vías de señalización con el objetivo de generar la diversidad neuronal necesaria.

Tras hacer un breve resumen de los factores implicados en la determinación de los ejes DV y AP, a continuación se muestra un esquema en que se representa el papel de cada morfógeno durante el desarrollo (figura 7).

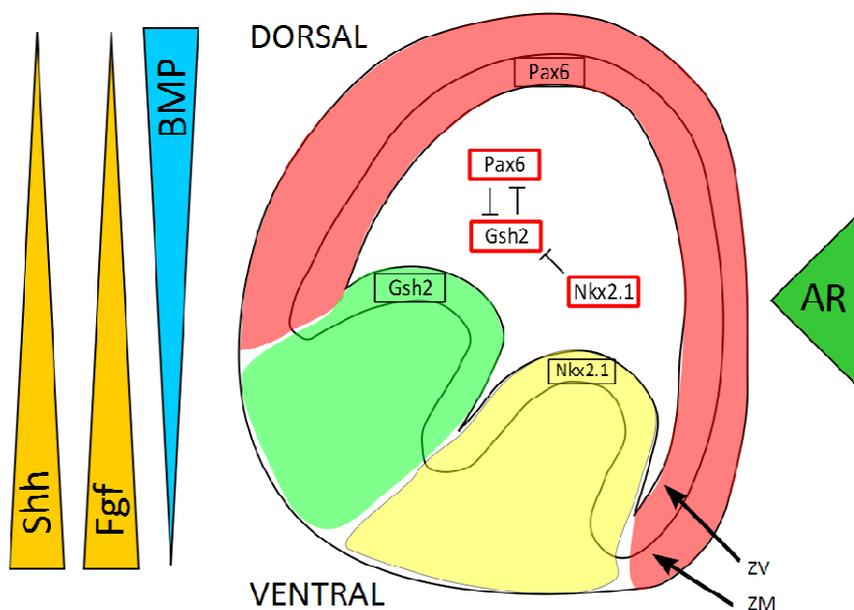


FIGURA 7: Esquema representativo de la regionalización DV del telencéfalo. Las vesículas telencefálicas se someten a diferentes factores con tal de adoptar las propiedades dorsoventrales. Los morfógenos ventralizantes están expresados de color amarillo, los dorsalizantes en azul y el AR en verde. Dentro de los factores intrínsecos, los factores de transcripción ventrales Gsh2 (en la EGL, verde) y Nkx2.1 (en la EGM, amarillo) se expresan en la ZV. En el *pallium*, la proteína Pax6 ejerce el efecto dorsalizante para conseguir la correcta formación de las estructuras derivadas. Dentro de los factores intrínsecos, existe un sistema de inhibición lateral que asegura un mayor control.

2.4 - DESARROLLO DE ESTRUCTURAS DERIVADAS DEL TELENCEFALO

Como se ha comentado a los apartados anteriores, a partir de cada una de las áreas delimitadas en las vesículas telencefálicas se generarán diferentes tipos celulares que poblarán las estructuras maduras del SNC. En este apartado, se intentará resumir la diversidad celular que generan tanto el *pallium* como el *subpallium*.

2.4.1 - La corteza

La región dorsal del telencéfalo origina la corteza cerebral que está formada por la neocorteza, la paleocorteza o corteza piriforme y la archicorteza o hipocampo según su disposición rostro-caudal. Las neuronas corticales se generan a partir de la ZV del *pallium* donde se localizan los precursores neurales (que son capaces de producir tanto células gliales como neuronales). Las primeras divisiones de estos progenitores originan glía radial que emite sus prolongaciones de manera perpendicular a la superficie de la ZV del *pallium*. Tras la generación de estas células, se da paso a un proceso de amplificación de los precursores mediante divisiones simétricas. Posteriormente, algunos de estos progenitores se someten a divisiones asimétricas para producir una célula descendiente post-mitótica que generará la neurona madura. Éstas migrarán radialmente utilizando el andamiaje formado por las ramificaciones de la glía radial con tal de ocupar la destinación final y generar la estructura laminar de la corteza cerebral adulta (Wonders y Anderson, 2006; Marin y Rubenstein, 2003). Las neuronas provenientes del *pallium* darán lugar a las neuronas de proyección piramidales que ejercerán diferentes funciones dependiendo en la capa cerebral donde se localicen.

La función principal de las interneuronas de la corteza adulta es modular la información transmitida por las neuronas de proyección piramidales. Las interneuronas constituyen un 25% de la población neuronal cortical y se caracterizan por la ausencia o la presencia disminuida de espinas en las terminaciones nerviosas (Whittington y Traub., 2003; Wonders y Anderson, 2006). Estas interneuronas provienen de la EGM y la EGC del telencéfalo ventral y, mediante procesos de migración tangencial, ocuparán la localización final. Tanto en el caso de la diferenciación de las neuronas de proyección como en el caso de las interneuronas, los progenitores se encuentran en la ZV de las eminencias ganglionares y son los indispensables para generar la diversidad neuronal. Tras la especificación neuronal los progenitores salen de ciclo celular y se someten a los procesos de migración que facilitará la maduración de la neurona (Wonders y Anderson, 2006).

Las señales implicadas en los diferentes procesos de generación, tanto de las neuronas de proyección como de las interneuronas, continúan siendo el objetivo de estudio en muchos laboratorios.

2.4.2 – El estriado

Durante el desarrollo embrionario, a partir de la EGL se formarán las neuronas de proyección del estriado, mientras las interneuronas provendrán de la EGM. El proceso de diferenciación neuronal, igual que ocurre en la diferenciación de la corteza, comienza en la ZV donde residen los precursores neurales. Tras amplificar los progenitores y activar el proceso de diferenciación, las neuronas migrarán para ocupar la ZM donde adoptarán la localización final. A diferencia de los estudios de diferenciación de las neuronas de proyección en la corteza, el estriado no está organizado en columnas dificultando la comprensión del proceso de génesis. La diferenciación de las interneuronas comparte grandes similitudes con el proceso descrito en el apartado anterior. La diferencia entre unas y otras será el proceso de migración para alcanzar el destino final.

Durante el desarrollo del estriado de los roedores, se han descrito dos picos de generación de neuronas de proyección. Las neuronas generadas en cada una de las oleadas, aunque no presentan ninguna diferencia bioquímica, generarán los dos compartimentos característicos de este núcleo: los estriosomas y la matriz. Así pues, las neuronas generadas en el primer pico de neurogénesis conformarán los futuros estriosomas, en cambio, las neuronas del segundo pico conformarán la matriz del estriado. El establecimiento de este patrón de diferenciación se remonta al primer estudio de desarrollo que se realizó en la década de 1980. En este estudio, se marcaron radiactivamente las neuronas postmitóticas durante el desarrollo del estriado de ratas con la finalidad de seguir *in vivo* estos precursores. Se observó que las primeras neuronas nacidas, alrededor de E12 y E15, formarían el compartimento estriosomal, mientras las nacidas en la segunda oleada, entre E17 y E20, generaban la matriz (van der Kooy y Fishell, 1987). En ratones, la primera oleada de neurogénesis se sitúa alrededor de E12-E13 a partir de los precursores situados en la región ventral-lateral de la EGL y las neuronas originadas de la segunda alrededor de E14-E15 (Mason y col., 2005). Las señales que controlan las oleadas de neurogénesis no se conocen con precisión, aunque la vía de señalización de Notch o factores de transcripción como Gsh2 o Mash1 parecen tener una implicación en dichas oleadas (Casarosa y col., 1999; Yun y col., 2003; Mason y col., 2005). Durante la primera oleada de neurogénesis, las neuronas generadas se distribuyen de manera dispersa en

el manto de la EGL. Al diferenciarse las neuronas de la segunda oleada, éstas ocuparán también la ZM desplazando a las neuronas nacidas en la primera etapa agruparse en pequeños cúmulos celulares (van der Kooy y Fishell, 1987). La llegada continua de nuevas neuronas de la matriz induce un aislamiento de estas agrupaciones hasta el punto de generar estructuras estables y definidas, los estriosomas (Krushel y col., 1989; Song y Harlan, 1994). La reorganización espacial de las neuronas generadas viene acompañada por la expresión de las proteínas características de cada uno de los compartimentos. En los últimos días embrionarios, se generan unos gradientes regionales de manera que la proteína sustancia P empieza a expresarse en porciones rostrales y la encefalina en regiones más caudales. De esta manera, hacia E16, las neuronas estriosomales preferentemente empezarán a expresar sustancia P mientras que las neuronas de la matriz, de manera preferente, expresarán encefalina. La expresión específica de cada uno de las proteínas permite el establecimiento de conexiones diferentes, como se explicó en la primera parte de la introducción (Cuello y Paxinos, 1978; Correa y col., 1981; Song y Harlan, 1994). Tras las etapas de expresión desigual existe una homogenización de la distribución de manera que tanto encefalina como sustancia P se extenderá a lo largo de todo el eje rostro-caudal del estriado (Penny y col., 1986; Harlan y col., 1989). La expresión de otra proteína presente en la mayoría de neuronas de proyección, DARPP-32, también presenta un patrón de expresión específico durante el desarrollo embrionario. Durante etapas embrionarias esta proteína únicamente se expresa en neuronas nacidas en la primera oleada de neurogénesis. Mientras, las neuronas nacidas en la segunda oleada y que ocuparán la matriz empiezan a expresar DARPP-32 durante la edad postnatal, cuando completan el proceso de maduración neuronal (Ouimet y col., 1992). Todos estos procesos de diferenciación están controlados por una gran cantidad de factores extrínsecos o intrínsecos. Es necesario un exhaustivo control con tal de asegurar una correcta formación del estriado adulto.

3 – CONTROL DEL DESARROLLO DE LOS DERIVADOS TELENCEFÁLICOS

Actualmente, el telencéfalo dorsal de los mamíferos ha sido un modelo óptimo para investigar los mecanismos involucrados en la generación de neuronas y glía durante la edad embrionaria. El proceso de generación de la gran diversidad de células neurales a partir de unos progenitores concretos viene especificado por una combinación de factores de transcripción que actúan de manera similar tanto en el desarrollo del telencéfalo como en el de la médula espinal (Corbin y col., 2008). A

pesar de esta gran similitud, se debe tener presente que el desarrollo telencefálico genera una gran complejidad neuronal. Esto dificulta más el estudio del desarrollo debido a la gran cantidad de factores están implicados en esta especificación.

Como ya se ha comentado anteriormente, las células madre neurales (NSC, del inglés neural stem cells) se localizan en la ZV del telencéfalo. Estas células madre tienen la capacidad de amplificar la progenie generando gran número de precursores que ocuparán la ZSV. Tras la generación de estos precursores, diversas vías de diferenciación actuarán para conseguir células de cada una de las estirpes neurales: neuronas, glía u oligodendrocitos. Junto al proceso de diferenciación, las células post-mitóticas sufren procesos de migración con tal de ocupar el destino final. A continuación, se detallarán los factores descritos que participan en el control de cada una de las etapas: proliferación, determinación de estirpe neural y diferenciación.

3.1 – PROLIFERACIÓN CELULAR

La gran diversidad de células generadas en el telencéfalo durante el desarrollo embrionario proviene de una única capa de neuroepitelio de la ZV, donde residen las NSC. La composición celular de esta capa y cómo se genera la gran progenie a partir de esta única capa han sido y continúan siendo la pregunta central de la biología del desarrollo hoy en día.

Los neuroepitelios, tanto del *pallium* como del *subpallium*, están formados inicialmente por células madre que se dividen rápidamente con el fin de expandir la población de células progenitoras. Durante el proceso de neurogénesis, una parte de las células madre neuroepiteliales se convierten en células especializadas llamadas células de la glía radial (CGR). Los somas de las CGR se localizan en la ZV, mientras sus ramificaciones salen de la ZV para ocupar la ZSV y la ZM. Las neuronas post-mitóticas en diferenciación o neuroblastos, utilizan estas ramificaciones como guía para migrar radialmente y ocupar así la ZM (Rakic, 1971; Hatten y Mason, 1990). En una primera etapa, sobre E11 en ratón, las CGR se dividirán simétricamente con tal de aumentar el número de células. Posteriormente, éstas se dividen asimétricamente con tal de producir una nueva CGR (idéntica a sus progenitores) con capacidad autorrenovadora y una célula progenitora que ocupará la ZSV (Gotz y Huttner, 2005). Las mismas CGR generan un tipo celular especializado llamado células progenitoras intermedia (CPI) o células progenitoras basales (Haubensak y col., 2004; Miyata y col., 2004; Noctor y col., 2004). Estas células ocuparán la ZSV dónde se dividirán simétricamente con la finalidad de producir dos células hijas idénticas e ir así aumentando el número de progenitores neuronales (Corbin y col., 2008). Así pues,

mediante divisiones asimétricas y simétricas se pueden generar diferentes progenies celulares: astrocitos, neuronas y oligodendrocitos (Temple, 2001) (figura 8).

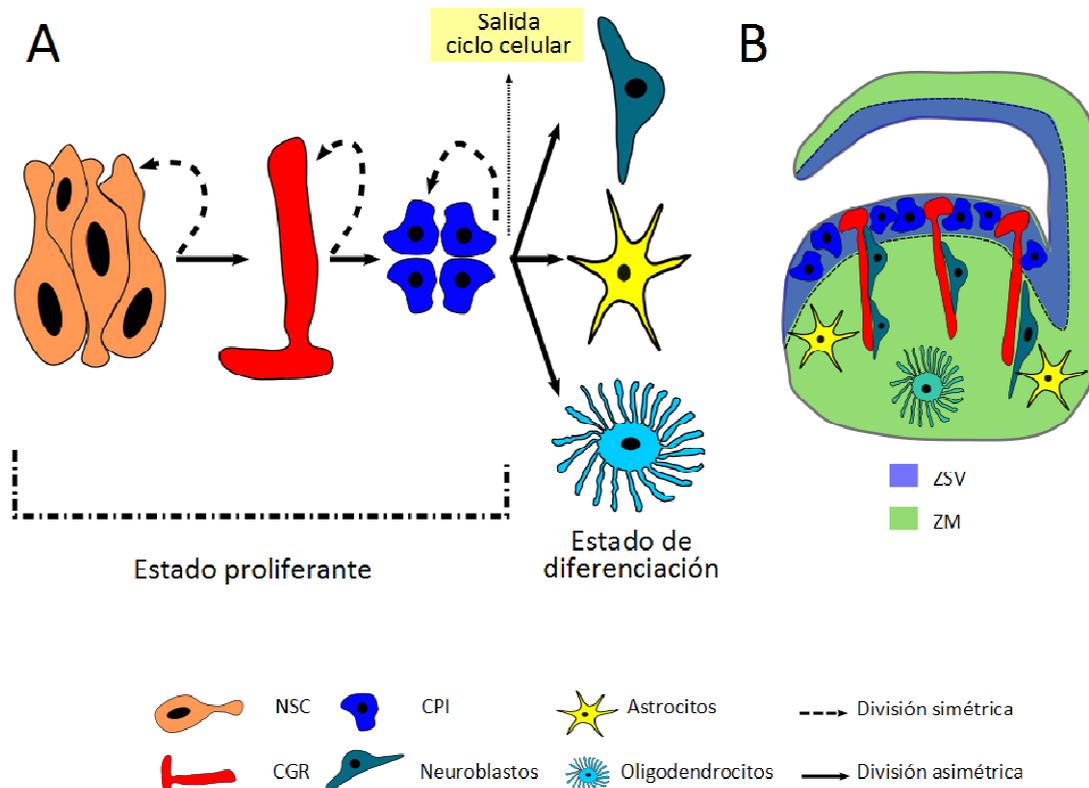


FIGURA 8: Proceso de diferenciación a partir de los progenitores neurales en la EGL. (A) Las células madre neurales (NSC) pueden dividirse por división simétrica (flecha discontinua) para dar más NSC o por asimétrica (flecha continua) para dar lugar a las células de la glía radial (CGR). A su vez, éstas se dividen para dar lugar a más células CGR o dar lugar a células progenitoras intermedias (CPI). A partir de este momento, los precursores salen del ciclo celular generando las diferentes estirpes neurales (neuronas, astrocitos y oligodendrocitos). (B) Localización en la EGL de las células progenitoras en los diferentes estados de diferenciación. Las células que se encuentran en ciclo celular (CGR y CPI) se localizan en la ZSV mientras que los neuroblastos, astrocitos y oligodendrocitos ocupan la ZM.

Durante el proceso de diferenciación, los progenitores basales cambiarán su estado proliferante a un estado postmitótico para generar el fenotipo definido. La salida de ciclo celular de estas CPI está íntimamente relacionada con la especificación de la estirpe neural. Este proceso está altamente regulado con tal de poder generar el número exacto de neuronas, astrocitos y oligodendrocitos que formarán el sistema nervioso adulto. Las proteínas reguladoras del ciclo celular, es decir, que regulan esta transición las podemos englobar en dos grupos según su actividad: proteínas que actúan a nivel del ciclo celular (ciclinas e inhibidores de ciclinas) y proteínas involucradas en la vía de señalización de Notch.

3.1.1 – Ciclinas e inhibidores de ciclinas

El ciclo celular se caracteriza por presentar cuatro fases: G1, S o fase de síntesis, G2 y M o fase de mitosis. Las primeras tres etapas constituyen la interfase mientras que la fase de mitosis se considera como división celular propiamente dicha. Durante la interfase, en la fase G1 las células se engrandecen con tal de facilitar la síntesis de ADN. En la fase S se produce la replicación del ADN y posteriormente, durante la fase G2, se engrandecerá la célula con tal de facilitar la división. Por último, en la etapa definitiva de división, la fase M, la célula detiene su crecimiento y toda la energía celular está focalizada en la citocinesis y posterior generación de las dos células hijas. En este momento, las células pueden elegir entre continuar divisiones sucesivas o, en cambio, dejar de dividirse. Las células que abandonan el ciclo celular, fase G₀, pueden realizarlo de manera temporal o definitiva. La regulación del ciclo celular incluye varios puntos de control (checkpoints en inglés) con tal de asegurar la correcta división, controlar y evitar el daño genético.

El ciclo celular está altamente regulado por la actuación de dos clases de moléculas: las ciclinas y las quinasas (del tipo serina-treonina) dependientes de ciclinas (CDKs, de inglés cyclin-dependent kinases) (Morgan, 1997; Satyanarayana y Kaldis, 2009). Para una correcta función, las ciclinas y las CDKs deben formar un complejo en el cual las primeras actúan como elementos reguladores y las CDKs como unidades catalíticas. En animales roedores, las células presentan gran número de CDKs que, a su vez, están reguladas por múltiples ciclinas. En el momento que es necesario pasar de etapa del ciclo celular, una ciclina se une a su CDK específica de manera que esta última fosforila unas dianas específicas que permiten el paso a la siguiente etapa. Existen diversos mecanismos que contribuyen a la especificidad de actuación de las ciclinas y CDKs: diferencias en la actividad transcripcional de las ciclinas, control de degradación de las mismas y actuación de inhibidores tanto a nivel de la unión de los complejos como la inhibición de la fosforilación de las CDKs (Bloom y Cross, 2007). Además, aunque las CDKs se expresan de manera ubicua en todas las células, las ciclinas se expresan de forma diferencial en células y momentos del desarrollo específicos. Todos estos mecanismos reguladores ayudan a entender la presencia del control celular en los progenitores.

Con tal de ofrecer una mayor precisión en el control de la proliferación, existen unas proteínas inhibitorias de ciclo. Todos estos inhibidores actúan controlando el pase de G1 a S y se engloban dentro de dos familias dependiendo del mecanismo de acción empleado: la familia *Cip/Kip* y la *INK4/ARF*. Las proteínas *Cip/Kip*, cuyos miembros son p21^{Cip/Waf1}, p27^{Kip1} y p57, impiden la unión de las ciclinas con las CDKs de la fase G1.

La activación específica de los inhibidores de esta familia viene dado por la síntesis de moléculas como p53 que inducirá la expresión de p21^{Cip/Waf1} o factores extrínsecos como el factor de crecimiento TGF- β (del inglés, transforming growth factor β) que regula la expresión de todos los miembros de la familia. En cambio, la familia INK4/ARF está compuesta por dos miembros, p16^{INK4} y p14^{ARF}, que se unen directamente a la CDK4 arrojando así el ciclo en la fase G1 y evitan la degradación de p53. La duración de la fase G1 es de vital importancia para la correcta neurogénesis. Mediante estudios de incorporación de Bromodeoxiuridina (BrdU) durante la diferenciación de la corteza en formación se ha demostrado que las células de la ZV incrementan gradualmente el ciclo celular de 8 a 18 horas debido a un aumento de la fase G1 de 4 a 12 horas a medida que los progenitores avanzan en la neurogénesis (Takahashi y col., 1995; Mitsuhashi y Takahashi, 2009).

La correcta regulación del ciclo celular durante el proceso de neurogénesis es importante tanto para mantener el número de progenitores como para establecer el momento en la conversión de progenitor a célula post-mitótica. Así pues, animales deficientes de la ciclina D2 (encargada del control de la fase G1 y altamente expresada en las CPIs) causa un alargamiento de la etapa G1, una depleción de las CPI acompañada por una neurogénesis temprana alterando el número de neuronas en el cerebro adulto (Glickstein, 2009; Lange y Calegari, 2010). En el caso de los animales deficientes del inhibidor p27^{Kip1}, se observa que el encéfalo de estos animales es mayor en cuanto a tamaño (Fero y col., 1996; Nakayama y col., 1996). Esta ausencia del inhibidor origina una disminución de las células quiescentes en la corteza durante el desarrollo y, consecuentemente, un aumento de las CPIs. El aumento de progenitores provoca una gran producción de neuronas generadas en las últimas etapas de neurogénesis (neuronas de proyección no GABAérgicas) y un aumento de tamaño de las capas cerebrales superficiales II-IV (Goto y col., 2004). La afectación exclusiva de un tipo de neuronas determinadas permite pensar que las señales a que está expuesta la célula en la última división determinan su fenotipo (McConnell, 1995; Qian y col., 2000; Temple, 2001). Diversos estudios de trasplantes celulares durante el desarrollo de la corteza demuestran la relación de salida de ciclo y la especificación celular. En el caso del desarrollo del *pallium*, la disposición laminar de las neuronas en la corteza viene dada por el momento en que los progenitores abandonan el ciclo celular. Así pues, cuando trasplantamos CPIs de las primeras etapas neurogénicas (que darán lugar a neuronas de capas profundas) en la ZV de edades posteriores se observa que únicamente se diferencian en neuronas de las capas internas siempre que las CPIs se encuentren en la última división celular. En cambio, si estas CPI se vuelven a dividir tras el trasplante, los progenitores se diferencian en consonancia con el resto de

células presentes en la ZV en el momento del injerto (McConnell y Kaznowski, 1991; Bohner y col. 1997). Para asegurar el control exhaustivo del ciclo durante el avance de la neurogénesis, los niveles de CDKs y ciclinas disminuyen durante el proceso de diferenciación. En cambio, se observa un aumento de niveles de proteínas inhibidoras de ciclo en cada ronda de división para favorecer la salida de ciclo y determinación fenotípica. Con todo, se ha establecido una importante relación de proteínas reguladoras de ciclo con la determinación fenotípica aunque futuros estudios permitirán conocer la funcionalidad y control exacto.

3.1.2 – Vía de Notch

El control del estado de proliferación también viene regulado por otras vías de señalización como la vía de Notch. Estudios en *Drosophila melanogaster* han demostrado que esta vía está involucrada tanto en el control de la proliferación como en la especificación de los progenitores neurales (Gaiano y Fishell, 2002; Corbin y col., 2008).

En roedores, la vía de señalización de Notch está compuesto por cuatro receptores de membrana (Notch 1-4) y cinco ligandos clásicos (Delta-like 1,3,4 y Jagged 1,2). Tanto los receptores como los ligandos son proteínas transmembrana que permiten la señalización entre células adyacentes mediante contacto directo. La unión del ligando con el receptor provocan el procesamiento de la porción intracelular del receptor por parte de complejos de γ -secretasas y la liberación del dominio intracelular de Notch (ICD-Notch, del inglés intracelullar domain of Notch). Esta molécula tiene capacidad para entrar en el núcleo donde es capaz de regular la actividad transcripcional. La unión de ICD-Notch con complejos de unión al DNA como CBF-1 activa la expresión de genes diana como Hes, uno de los miembros de los factores de transcripción bHLH que posteriormente inhibirá la transcripción de los otros factores de transcripción bHLH proneurales (Iso y col., 2003; Selkoe y Kopan, 2003; Yoon y Gaiano, 2005). En el SNC se expresan los miembros de la familia Hes, (Hes1, Hes3 y Hes5) específicamente durante el desarrollo embrionario. La activación de la síntesis de los genes Hes permite la inhibición de otras proteínas proneurales bHLH como Mash1 o Ngn. Alteraciones en esta vía de señalización afectan negativamente al mantenimiento de los progenitores ya que animales deficientes de las tres proteínas Hes1/Hes3/Hes5 presentan una diferenciación prematura debido a una sobreexpresión de proteínas proneurales (Ishibashi y col., 1994; Hirata y col., 2000; Ohtsuka y col., 2001; Kageyama y col., 2008). La señalización por la vía de Notch juega un papel crítico en la regulación del número de progenitores neurales durante el desarrollo

embrionario (Hitoshi y col., 2002; Yoon y col., 2004; Yoon y Gaiano, 2005). Así pues, dentro de la ZV, la activación de los receptores de Notch en las células vecinas inhibe la diferenciación neuronal mediante la represión de genes proneurales manteniendo así el estado progenitor de las células.

Durante la neurogénesis en el telencéfalo, los ligandos de Notch se heredan de forma asimétrica en las células hijas resultantes de la mitosis de los precursores neurales de manera que se crea una gran heterogeneidad de precursores dentro de la misma ZV (Chenn y McConnell, 1995). Además, la interrupción de la señalización de Notch provoca una alteración en la neurogénesis estriatal. La eliminación de Notch 1 en las primeras etapas neurogénicas causa una alteración en las neuronas de los estriosomas. En cambio, las neuronas de la matriz se diferencian correctamente debido a una compensación del otro miembro de la familia, Notch3 (Mason y col., 2005). Las dos observaciones anteriores nos permiten postular que en la ZV de la EGL existen dos tipos de progenitores: un grupo de precursores con señalización Notch dependiente que se dividen asimétricamente para generar neuronas estriosomales y un grupo celular con señalización Notch independiente que se dividen asimétricamente para generar neuronas de la matriz (Corbin y col, 2008). En estos progenitores, la vía de Notch actúa mediante una inactivación de ICD-Notch y su posterior unión a Deltex (DTX) que tras traslocarse al núcleo regulan genes diferentes a los regulados por el complejo CBF-1 (Martinez-Arias y col., 2002). Resumiendo, la respuesta selectiva de los progenitores a la vía de Notch explicaría la activación diferencial de factores de transcripción que están implicados en la determinación terminal de los progenitores.

3.2 – CONTROL DE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR

Los progenitores neurales darán lugar, mediante procesos de determinación y posterior diferenciación, a las diferentes estirpes que constituyen el cerebro adulto: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Diferentes mecanismos intrínsecos (factores de transcripción y modificaciones epigenéticas del ADN) y mecanismos extrínsecos (factores extracelulares con su correspondiente activación de la maquinaria intracelular) actúan en los progenitores para orquestar el proceso de diferenciación neural (Guillemot, 2007). Los procesos de proliferación permiten el aumento de los precursores de las vesículas telencefálicas. El mantenimiento y la diferenciación de los precursores depende de las combinaciones de factores de transcripción que tienen capacidad de actuar a dos niveles: primero inhibir los factores proliferantes citados anteriormente y segundo activar genes específicos de neuro o gliogénesis (Dang y col., 2006).

Durante el desarrollo embrionario de los animales vertebrados, los diferentes tipos celulares se generan en un momento determinado durante el desarrollo embrionario: primero se generarán las neuronas durante las etapas embrionarias y posteriormente, y ya en edades postnatales, se diferenciarán los astrocitos y los oligodendrocitos (Bayer y Altman, 1991) (figura 9).

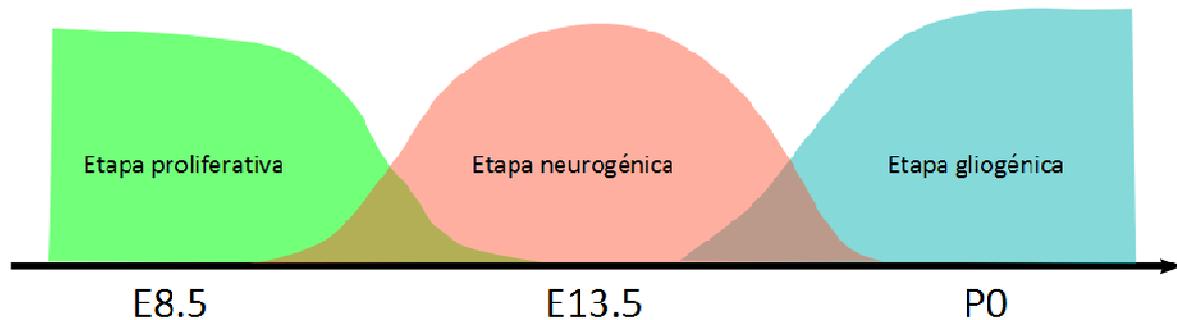


FIGURA 9: Secuencia temporal en la generación de los astrocitos y neuronas. Las células de las diferentes estirpes se generan a partir mismos progenitores que se amplifican durante las etapas tempranas de la embriogénesis. A medida que avanza el desarrollo sobre los días de gestación E13,5 hasta E16,5 se generan las neuronas. Y ya en etapas más tardías de la embriogénesis, desde E17,5 hasta edades postnatales, tiene lugar el nacimiento de las estirpes gliogénicas, tanto glía como oligodendrocitos. Imagen modificada de Hirabayashi y Gotoh, 2005.

El hecho que las tres estirpes neurales se generen separadas en el tiempo permite postular la presencia de distintas poblaciones de precursores en la ZSV que controlarían la generación de los diferentes fenotipos. En cambio, mediante estudios clásicos de cultivos celulares clonales y la observación microscópica a largo tiempo, se describió que los progenitores, en estado proliferante, ya se determinaban para ser neuroblastos o glioblastos. Esta especificación viene determinada, principalmente, por la distribución asimétrica de receptores de Egf (del inglés epidermal growth factor) y su capacidad de respuesta a este mitógeno. Por lo tanto, las células madre multipotenciales alteran sus propiedades a lo largo del desarrollo especificando así las estirpes celulares antes de la actuación de determinados factores de transcripción (Qian y col., 2000). Tras esta especificación de los progenitores, se facilitará la diferenciación terminal para generar las células neurales adultas.

3.2.1 - Neurogénesis

El telencéfalo originará diferentes tipos de neuronas dependiendo de la localización de los precursores. Como ya se ha descrito anteriormente, en el *pallium* se generan mayoritariamente neuronas de proyección excitatorias glutamatérgicas que poblarán las diferentes capas de la corteza cerebral. En cambio, a partir del *subpallium* se generarán neuronas GABAérgicas inhibitorias que formarán las poblaciones de neuronas de proyección de los ganglios basales y las interneuronas que migrarán hacia otras áreas del telencéfalo (Parras y col., 2002). Con tal de conseguir esta especificidad de diferenciación, es necesario establecer mecanismos correctos para asegurar una supervisión exhaustiva.

Durante el proceso de especificación neurogénica, la familia de factores de transcripción proneurales bHLH ejerce un control en el proceso de especificación/determinación de la estirpe neural a la que se diferenciarán los progenitores. Muchas proteínas reguladoras de la neurogénesis presentan estos dominios caracterizados por poseer un motivo estructural en forma de dos hélices α conectadas por un *loop* que permite su dimerización y posterior unión al ADN. Las proteínas proneurales que contienen los motivos bHLH son Mash1, Ngn1 y 2, NeuroD entre otras. En las primeras etapas de neurogénesis, estas tres proteínas proneurales se expresan a bajos niveles debido a represión ejercida por las proteínas Hes. A medida que avanza la diferenciación neuronal, los niveles de proteínas bHLH aumentan debido a una inhibición de la vía de Notch por parte de la proteína Mash1 originando una disminución de la familia de proteínas Hes (Casarosa y col., 1999). La expresión espacial de estos factores de transcripción se restringe a los progenitores de la ZV y ZSV. Una vez se les induce la salida de ciclo a estas células, abandonan estas zonas dejando de expresar las proteínas bHLH en la ZM. Se postula que la expresión de estas proteínas en los precursores induciría la diferenciación en dos etapas: induciendo la salida de ciclo celular de los progenitores y activando proteínas diferenciación neuronal. Así pues, estas células que abandonan el ciclo celular pueden ser tanto progenitores de glía como neuronales; será la activación de diferentes proteínas pro-neuronales las que facilitarán la diferenciación terminal. La expresión de las proteínas de la familia bHLH es específica de las regiones telencefálicas. Mientras Ngn1 y 2 se expresan en la ZV del telencéfalo dorsal, donde se generan las neuronas glutamatérgicas, la proteína Mash1 predomina en el telencéfalo ventral. Esta especificidad proteica nos permite concluir que cada tipo celular está controlado por una cascada de factores de transcripción específica. (Wilson y Rubenstein, 2000; Ross y col., 2003; Osório y col., 2010). En el caso del desarrollo del *subpallium*, se ha

observado que los animales deficientes en Mash1 presentan una reducción en el número de las interneuronas GABAérgicas de la corteza mientras que los progenitores presentan ciclos celulares más largos (Casarosa y col., 1999; Nieto y col., 2001). A pesar de estas observaciones, aún no se ha determinado qué factores reguladores de ciclo podrían estar controlados por Mash1 para inducir esta salida de ciclo. En cuanto a la inducción neurogénica por parte de Mash1, se ha descrito que activa directamente la transcripción de genes neurogénicos tales como la familia NeuroD/Nex (Farah y col. 2000; Poitras y col, 2007; Long y col., 2009) o la familia Dlx, del inglés distal less genes, los cuales están altamente implicados en la diferenciación estriatal (Anderson y col., 1997; Eisenstat y col., 1999). El factor de transcripción Mash1 puede unirse a la región intergénica de Dlx1 y Dlx2 para activar la transcripción génica de estas proteínas (Poitras y col., 2007). A pesar de esta relación directa de regulación génica, el animal deficiente de Mash1 presenta un aumento de niveles de las proteínas de la familia Dlx (Fode y col., 2000; Yun y col., 2002). Este sorprendente resultado viene explicado por un efecto no autónomo que la proteína Mash1 ejerce durante el desarrollo. La ausencia de Mash1 durante el desarrollo provoca una alteración de la vía de Notch originando la salida de ciclo prematura y posterior activación de las proteínas de diferenciación neuronal (Casarosa y col., 1999; Yun y col., 2002). La alteración de una proteína puede producir una alteración de la neurogénesis debido a la activación de las múltiples vías colaterales de tal manera que se observen resultados diferentes a los esperados.

Tras la especificación neuronal de los progenitores es imprescindible la expresión de otros factores neurogénicos que permitan la diferenciación terminal. En el desarrollo de la EGL, encontramos un grupo de proteínas englobados en la familia **Dlx** que presentan la capacidad de activar el promotor del gen que codifica la enzima responsable de la síntesis de GABA (Panganiban y Rubenstein, 2002). Sin embargo, esta activación de promotor no es exclusiva e imprescindible ya que animales deficientes en los dos miembros de la familia, Dlx1/2, presentan neuronas GABAérgicas (Anderson y col., 1997). Los otros miembros de la familia, Dlx5/6, incluso las proteínas bHLH, como Mash1, puedan estar regulando directamente el promotor de este enzima (Poitras y col., 2007). Así pues, queda demostrado que durante la diferenciación neuronal del *subpallium*, son necesarias múltiples vías de señalización para conseguir una correcta neurogénesis. Además de la regulación sobre el promotor del enzima sintetizador de GABA, los miembros de la familia Dlx regulan su expresión entre ellos. Es decir, una vez iniciada la expresión de Dlx1/2 es capaz de controlar sus propios niveles de expresión y activar la expresión de los miembros Dlx5/6 que están implicados en etapas de diferenciación más tardías (Zerucha y col., 2000; Poitras y col., 2007). Estudios posteriores, demuestran que estas proteínas también están implicadas

en la especificación de otros tipos neuronales como oligodendrocitos (Ghanem y col., 2007; Petryniak y col., 2007) e, incluso, en la migración de los neuroblastos con la finalidad de conseguir la localización final (Cobos y col., 2007; Le y col., 2007).

La diferenciación terminal de los neuroblastos viene determinada por la acción de nuevos factores de transcripción. En el caso de las neuronas sustancia P, las proteínas de la familia Dlx activan otros genes como el que codifica para la proteína Ebf-1 (Lobo y col., 2008) con la finalidad de conseguir la neurona madura deseada. En cambio, los factores de transcripción involucrados en la diferenciación de las neuronas de proyección encefalina positivas son diferentes. En sistemas *in vitro* se ha descrito que un factor de transcripción llamado Ikaros se une directamente al promotor de la encefalina (Dobi y col., 1997). Aunque el mecanismo de acción de Ikaros y su funcionalidad en el SNC no se conocen, en la presente tesis se describe el papel neurogénico que presenta esta proteína. Así mismo, también se estudia la acción de otro miembro de la familia, Helios, en el desarrollo del SNC. Al observar la complejidad del sistema de diferenciación queda patente que el estudio de las vías implicadas se complica al existir un entramado de vías que todas ellas están interconectadas.

Los factores de transcripción anteriormente citados, a parte de potenciar la diferenciación neurogénica, actúan alterando los procesos de diferenciación del resto de estirpes neurales. Por poner un ejemplo, Ngn1 inhibe la diferenciación astrocitaria por mecanismos colaterales facilitando la diferenciación neuronal (Sun y col., 2001).

Con la finalidad de esquematizar todo el proceso de diferenciación neuronal, en la figura 10 se representa el entramado de algunas de las proteínas que participan en la diferenciación de las neuronas tanto del *pallium* como del *subpallium*.

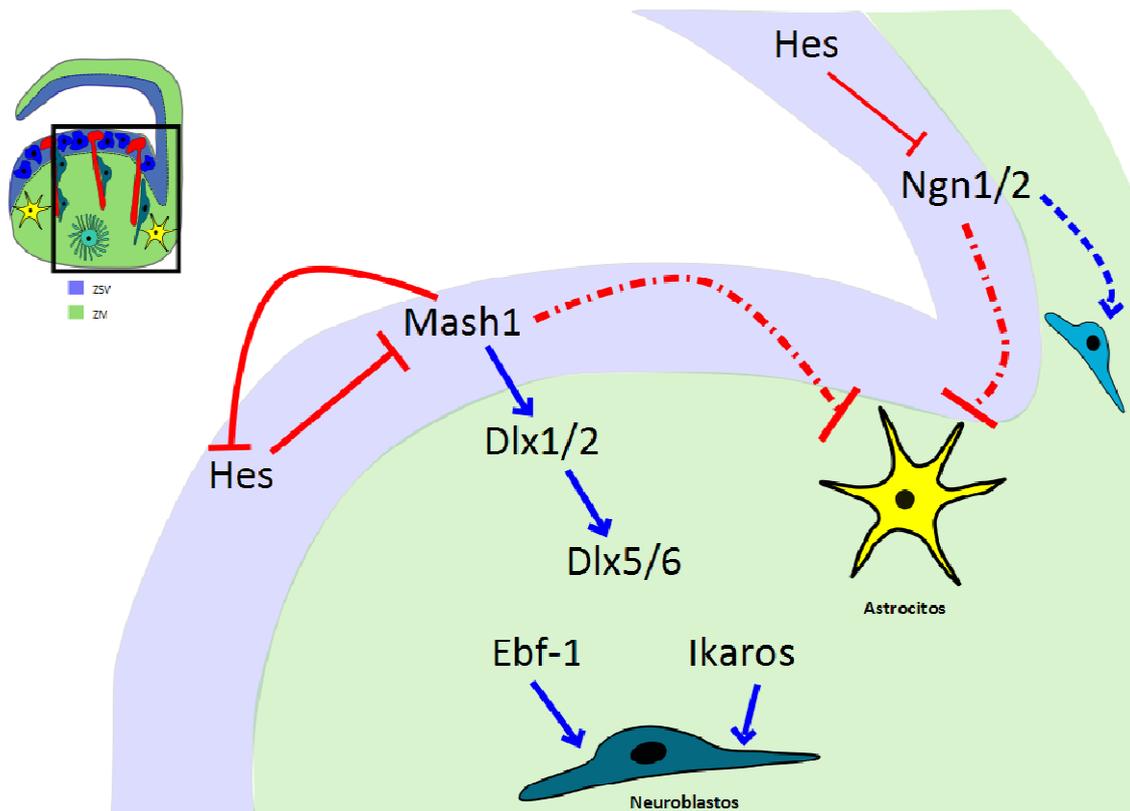


FIGURA 10: Vías de señalización implicadas en la neurogénesis del telencéfalo. Los factores de transcripción bHLH como Mash1 activan directamente los factores de transcripción de la familia Dlx que inducen la diferenciación neuronal (flecha azul). En la ZM, otros factores como Ebf-1 e Ikaros participan en la diferenciación neuronal terminal. De manera paralela, estos factores inhiben la diferenciación astrocitaria sin conocerse bien el mecanismo de acción (flecha roja discontinua).

3.2.2 – Astrogénesis

La diferenciación astrocitaria tiene lugar en etapas más tardías del desarrollo embrionario, principalmente, en edades peri o postnatales en animales roedores (Bayer y Altman, 1991). Los estudios de los mecanismos de diferenciación de los astrocitos se han llevado a cabo principalmente en la corteza debido a su facilidad de cultivo experimental y la diferenciación neurogénica secuencial. La falta de marcadores específicos para astrocitos inmaduros dificulta, en gran medida, el estudio de la astrogénesis. Se han descrito diversas señales que inducen una especificación del fenotipo glial y pueden actuar tanto a nivel de cascadas de señalización como activando directamente el promotor de GFAP (del inglés, glial fibrillary acidic protein) (Guillemot y col., 2007).

Los progenitores de la ZV deben encontrar señales diferentes con tal de formar un tipo celular u otro. El cambio de competencia de los progenitores, junto con el

cambio de señales extracelulares, facilita la diferenciación astrocitaria. (Miller y Gauthier, 2007). Entre las señales que inducen la especificación glial encontramos señales como las BMPs o factores de crecimiento como Fgf, Egf, CNTF (del inglés ciliary neurotrophic factor) o la vía de Notch. La unión de los dos primeros morfógenos a sus receptores activan la vía de Smad que, finalmente, actuará junto a la vía JAK/STAT para activar la transcripción del gen GFAP (Dore y col., 2009). En cambio, Egf y CNTF al unirse a sus receptores activan la vía JAK/STAT, la vía primordial para la activación de la diferenciación astrocitaria y la inhibición de la neuronal (Guillemot, 2007). Tras la unión de las diferentes señales al receptor, se activa la transcripción del gen GFAP y se induce la diferenciación de los precursores hacia astrocitos (Bonni y col., 1997; Nakashima y col., 1999) (figura 11).

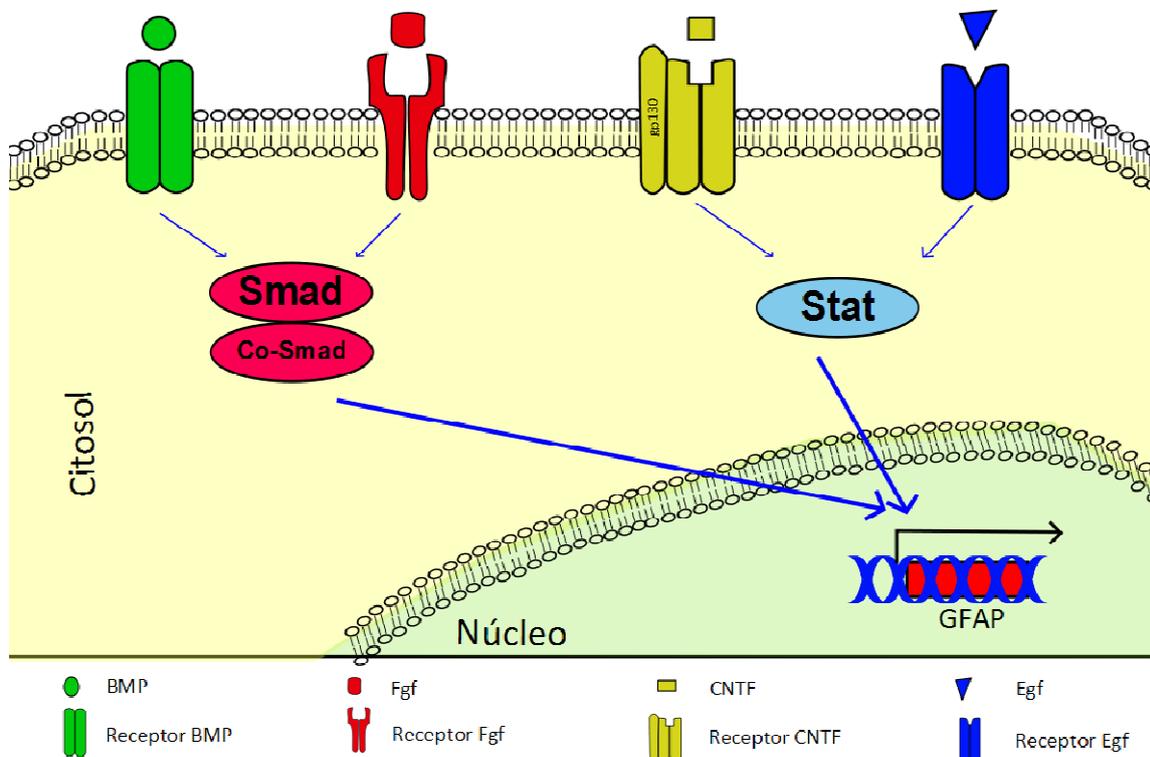


FIGURA 11: Esquema representativo de las vías de señalización implicadas en la diferenciación astrocitaria. Los factores extrínsecos BMP o Fgf, en etapas perinatales del desarrollo, activan la vía Smad para activar la transcripción del gen GFAP. Otra vía de activación de la transcripción de este gen, la vía STAT, se activa tras la unión de CNTF y Egf a sus receptores.

En primer lugar, cabe destacar el hecho que las mismas señales pueden activar diferentes vías de señalización dependiendo de la edad embrionaria a la que actúan. Así pues, las BMPs durante etapas tempranas activan la diferenciación neuronal, en

cambio, en edades perinatales las mismas señales activan la vía de Smad y JAK/STAT (Nakashima y col., 1999). También puede ocurrir que los niveles de determinados factores tróficos varíen dependiendo de la etapa embrionaria como ocurre con la señalización por Fgf. Tras las etapas de neurogénesis, aumentan los niveles de este morfógeno con tal de activar la vía Smad y actuar a nivel de JAK/STAT facilitando la activación astrocitaria (Qian y col., 1997). O, en el caso de la señalización por Egf, no varían los niveles del factor sino que hay una distribución asimétrica del receptor en los progenitores. De esta manera, sólo las CPI que presenten niveles altos del receptor tendrán capacidad de responder a Egf y CNTF y activar consecuentemente la vía de señalización JAK/STAT (He y col., 2005). Por último, una activación constante de la vía de Notch, altamente involucrada en el control de la especificación neuronal, permite que los precursores se mantengan durante más tiempo en proliferación y lleguen a etapas perinatales, favoreciendo la diferenciación astrocitaria (Tanigaki y col., 2001).

3.2.3 – Oligodendrogénesis

Los oligodendrocitos, células gliales responsables de la síntesis de mielina en el cerebro adulto, también provienen de los precursores neurales localizados en la VZ y SVZ del *subpallium*. A diferencia de las neuronas y los astrocitos, los precursores de los oligodendrocitos están localizados en la zona ventrolateral y dorsal del telencéfalo (Kessaris y col., 2006). Entre los factores implicados en la generación de las células oligodendrogliales, encontramos el factor Shh, y los factores de crecimiento Fgf y PDGF (del inglés platelet-derived growth factor). La unión de Shh al correspondiente receptor de las CPI en la región ventrolateral activa la transcripción de Olig1 y Olig2, genes de la familia bHLH, que permiten la especificación oligodendroglial (Alberta y col., 2001; Nery y col., 2001). Una vía independiente de generar oligodendrocitos es la señalización mediante Fgf2. Aunque no se conoce bien el mecanismo de acción, estudios con animales deficientes en la señalización de Shh demuestran que una aplicación de Fgf promueve la oligodendrogénesis (Chandran y col., 2003). Y, por último, se ha estudiado ampliamente la acción de PDGF en la proliferación y la supervivencia de los progenitores oligodendrogliales aunque sin conocerse sin exactitud el mecanismo de acción (Barres y Raff, 1994).

Tras esta breve descripción de las vías de señalización involucradas en la génesis de las diferentes estirpes neurales, podemos intuir la alta complejidad de la génesis del cerebro adulto. Muchas de las vías de señalización que actúan controlando

estos procesos se encuentran interconectadas formando cada una de ellas una ficha del complejo puzzle que es el desarrollo del cerebro.

3.3 – MIGRACIÓN CELULAR

El último paso del proceso de la formación del cerebro es que las células consigan su localización final. En el *subpallium*, las neuronas de proyección originadas en la EGL migran radialmente a través de la ZM para ocupar la zona de diferenciación terminal y finalizar su proceso de diferenciación. En cambio, las interneuronas de la EGM y de la EGC migran tangencial y dorsalmente con el objetivo de llegar a su posición final: estriado, corteza y bulbo olfatorio (Chédotal y Rijli, 2009) (figura 12).

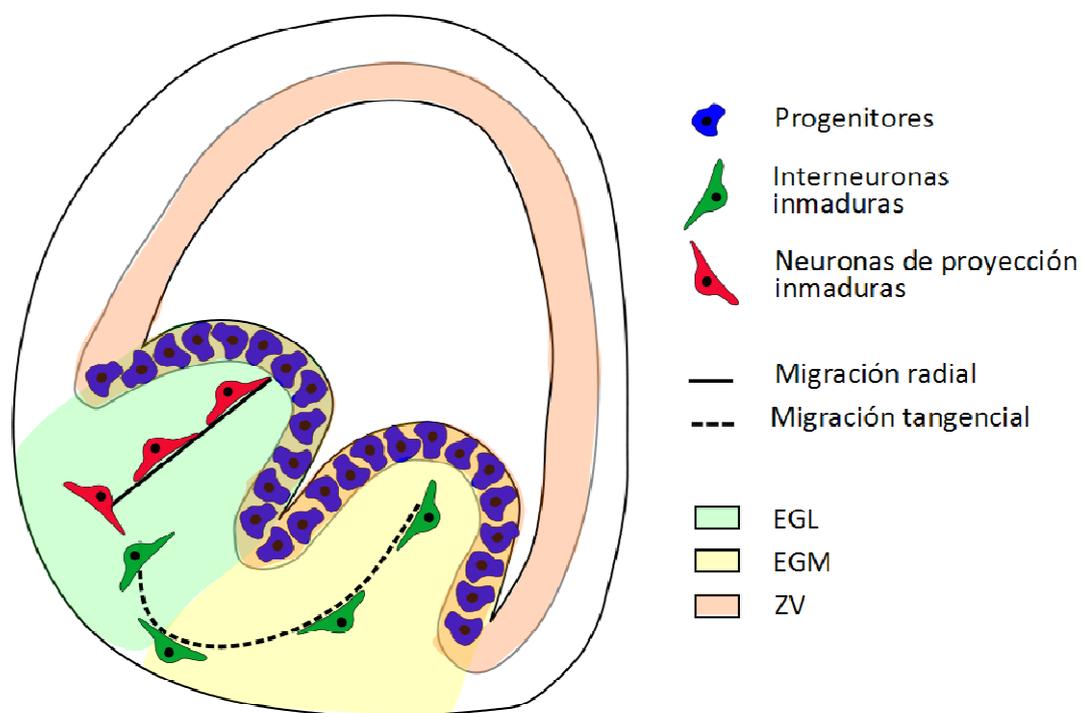


FIGURA 12: Esquema de migración de los precursores neuronales. Las interneuronas generadas desde la EGM migrarán tangencialmente para ocupar la ZM de la EGL. En cambio, las neuronas de proyección originadas de la EGL migrarán radialmente con tal de formar el estriado adulto.

Existen muchas evidencias que indican que el proceso de migración de las células diferenciadas está guiado por numerosas moléculas con capacidad de difusión y proteínas que pertenecen a diferentes familias como las semaforinas, neuregulinas y quimoquinas (Marin y col., 2001). Hay numerosos trabajos que se centran en la migración de los componentes celulares de la corteza debido a su fácil organización. En cambio, la migración en el *subpallium* está menos descrita aunque se postula que

mecanismos similares estarían involucrados en el control de la migración intrínseca en esta área.

Las neuronas de proyección de la corteza migran radialmente para conformar la corteza adulta. Se han descrito dos mecanismos de migración según la edad de nacimiento de las neuronas. Durante las primeras etapas de migración, los precursores neuronales avanzan a lo largo de la corteza en formación mediante una translocación del soma que permite el desplazamiento. En este tipo de migración es de vital importancia la maquinaria de los filamentos intermedios. Éstos facilitan que los precursores neuronales se sometan a un proceso de torcimiento y estrechamiento para facilitar el avance (Miyata y Ogawa, 2007). En etapas más tardías de la diferenciación, los precursores neuronales abandonan esta alteración somática y utilizan las guías que la glía radial ha formado durante el proceso del desarrollo (Rakic, 2007). Los requerimientos para controlar este tipo de migración son sustancialmente diferentes. El hecho que los precursores necesiten estar en contacto directo con las prolongaciones de la glía radial hace que la expresión de proteínas como integrinas tomen gran importancia (Schmid y col., 2004). Así pues, el mecanismo de regulación de cada uno de los tipos de migraciones variará según las características de migración.

El control de la migración tangencial de las interneuronas a partir de las eminencias ganglionares presenta una regulación diferente. A nivel celular, las interneuronas desarrollan unas prolongaciones ramificadas que guían la migración y facilitarán cambios morfológicos celulares (Marin y Rubenstein, 2003; Bellion y col., 2005). Estudios recientes han demostrado que el control de la migración tangencial de estas neuronas viene dado por la correcta selección de los procesos de ramificación y así seleccionar la dirección adecuada (Martini y col, 2009).

A pesar que se han descrito algunas vías de señalización, el mayor problema que afronta el estudio de la migración es discernir si los factores implicados están actuando a nivel de la migración o a nivel de la especificación y diferenciación celular. Además, también se postula si el proceso de migración está debido a la actuación de factores de transcripción de manera autónoma o, en cambio, es el nicho celular el que guía y controla todo el proceso de migración (Chédotal y Rijli, 2009).

Los procesos de diferenciación neuronal que ocurren durante el desarrollo embrionario deben constituir la base para poder realizar la terapia sustitutiva que se

utiliza con el objetivo de curar enfermedades neurodegenerativas como la corea de Huntington. Con la finalidad de aportar un mayor conocimiento en este campo del desarrollo embrionario, en la presente tesis nos hemos centrado en el estudio de los factores de transcripción de la familia Ikaros durante la embriogénesis del núcleo estriado en animales roedores.

II. OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis ha sido el estudio de los factores de transcripción de la familia Ikaros durante el desarrollo embrionario del núcleo estriado en animales roedores. Como objetivos específicos nos planteamos:

1 - Estudiar la implicación del factor de transcripción Helios durante el desarrollo de la EGL:

1.1 Estudios del patrón de expresión durante el desarrollo del estriado.

1.2 Estudio del papel de Helios durante la proliferación y la diferenciación neural *in vitro*.

2 - Estudio de la implicación del factor de transcripción Ikaros durante el desarrollo de la EGL:

2.1 Estudio del patrón de expresión durante el desarrollo del estriado.

2.2 Estudio del papel de Ikaros durante la proliferación y la diferenciación neural *in vitro*.

2.3 Estudio del mecanismo de acción implicado en la regulación de proliferación y diferenciación.

2.4 Caracterizar el papel de Ikaros durante el desarrollo estriatal mediante la caracterización de animales deficientes para diversos factores de transcripción.

3 - Estudiar la relación de los factores de transcripción de la familia Ikaros, entre ellos y con el resto de vías de señalización descritas que participan durante el desarrollo embrionario de la EGL.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1 – ANIMALES

Los ratones de diferentes cepas utilizados en la presente tesis han sido estabulados con acceso a comida y agua *ad libitum*. Las condiciones de la habitación donde residen mantiene a temperatura (19-22 °C) y humedad (40-50%) constantes siguiendo un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. La estabulación, el procedimiento de manipulación y los tratamientos a los animales fueron debidamente aprobados por el comité ético de experimentación con animales (CEEA) local (99/1 de la Universitat de Barcelona) siguiendo las directrices de la Generalitat de Catalunya (1094/99) de acuerdo con la Directiva de la Comunidad Europea (86/609/EU).

Para el estudio del estriado en animales salvajes se utilizaron los ratones de la cepa B6CBA (obtenidos del Laboratorio Charles River, Les Oncins, Francia). También se utilizaron los ratones transgénicos Dlx5/6-Cre-IRES-GFP (Stenman y col., 2003) que fueron cedidos por el Dr. Campbell de la Universidad de Medicina de Cincinnati (USA). Los animales deficientes de Ikaros ($Ik^{-/-}$) (Wang y col., 1996) fueron cedidos por la Dra. Georgopoulus del Hospital General de Massachusetts. Los animales deficientes de Dlx1/2 (Qiu y col., 1997) fueron utilizados tras establecer una colaboración con el Dr. Rubenstein de la Universidad de California de San Francisco. Los animales deficientes de Ebf-1 (Lin y Grosschedl, 1995) fueron amablemente cedidos por el Dr. Grosschedl del Instituto Max Planck de Alemania. Y, por último, la cepa de animales deficientes de $p21^{Cip/Waf1}$ fue descrita por Brugarolas y col., 1995. De todas las cepas usadas, los ratones deficientes para Ebf-1 e Ikaros se estabulan en una habitación especial libre de patógenos debido a la inmunosupresión generada por la ausencia de estas proteínas.

Las cepas fueron mantenidas realizando cruces con la cepa de animales salvajes C57BL/6 con tal de generar cepas congénitas. Las muestras de los animales fueron extraídos según las necesidades del experimento tanto a nivel embrionario como en etapas postnatales. Las edades embrionarias se contabilizan considerando el día que se observa el tapón vaginal post coital como E0,5. En las etapas postnatales, el día de nacimiento se considera como P0 (día postnatal 0) y así se calcula la edad de obtención de las muestras de los ratones. Los genotipos de cada animal se estudian a partir del ADN extraído de cada animal realizando PCR según el protocolo descrito en la descripción de cada cepa de ratón.

En la siguiente tabla se enumeran las características de cada cepa de ratón utilizada y la referencia de la descripción de la cepa.

Gen diana	Mutación realizada	Referencias
Dlx1/2	Animal knockout con la delección específica del locus de unión de los genes Dlx1 y Dlx2 situados en el cromosoma 2.	Qiu y col., 1997
Dlx5/6	Animal transgénico que expresa el constructo bicistrónico Cre-recombinasa-EGFP regulado por el elemento potenciador id6/id5 del gen Dlx5/6.	Stenman y col., 2003
Ebf-1	Animal transgénico en el cual los exones 1-3 del gen Ebf han sido sustituidos por una porción del casete PGK incapacitando la expresión del gen.	Lin y Grosschedl, 1995
lkaros	Animal knockout que presenta una delección del fragmento de 59 pares de base codificantes del exón 7 del gen lkaros.	Wang y col., 1996
p21	Animal knockout generado al reemplazar la secuencia codificantes del gen p21 por un casete de resistencia a neomicina.	Brugarolas y col., 1995

Tabla I: Características de las cepas de animales utilizadas.

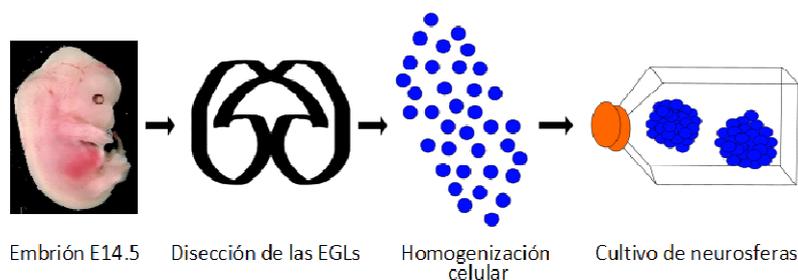
2 - CULTIVOS CELULARES

Los cultivos celulares que se realizan en esta tesis son cultivos de embriones de edad E14,5. Ratonas embarazadas en el día de gestación E14,5 fueron sacrificadas por dislocación cervical y, a continuación, se realizó una incisión abdominal con material de cirugía estéril con tal de extraer los úteros con sus respectivos embriones. Las crías se conservaron en tampón fosfato salino estéril (PBS, del inglés phosphate buffer saline) de pH=7,4 a 4°C para disminuir el metabolismo y mejorar la viabilidad celular. A continuación, se decapitaron los embriones y, mediante el uso de la lupa y de las herramientas de disección, se separaron las EGL de los dos hemisferios y se depositaron el PBS a 4°C hasta realizar el cultivo propiamente dicho. Dependiendo si el cultivo se realiza en cepas salvajes (Wt) o de cepas transgénicas, las EGL se juntaban con tal de realizar el cultivo en el primer caso, o bien, se cultivaba por animales separados hasta conocer el genotipo en el caso de las cepas transgénicas. El procesamiento posterior dependerá del tipo celular que queramos obtener tras la el cultivo celular. Así pues, en nuestro caso hemos cultivado las EGL con dos objetivos diferentes. Uno de los objetivos era obtener progenitores neurales, NSC, y cultivarlos en forma de neurosfers. También hemos realizado cultivos primarios donde hemos cultivado las EGL con el objetivo de conseguir células estriatales diferenciadas y poder estudiar el efecto de nuestros factores de transcripción en un sistema *in vitro* más maduro. A continuación se describirá la metodología de los dos tipos de cultivos.

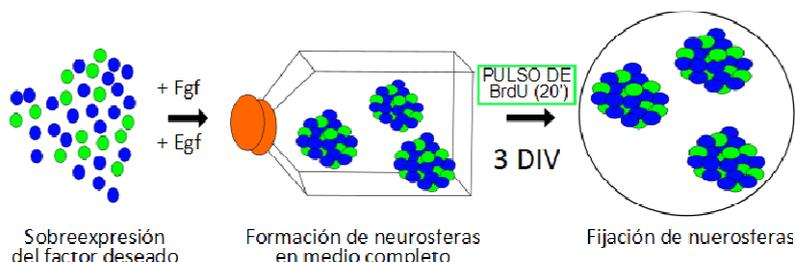
2.1 – Cultivos de neurosféricas

Las EGLs se disociaron mecánicamente con una pipeta Pasteur y se sembraron en flascos a una densidad de 50.000 células/cm² en un medio estándar compuesto por: DMEM (Sigma) y F12 (Invitrogen) en una dilución 1:1 y suplementado con 0,3% glucosa (Sigma), 0,3 mg/ml glutamina (Invitrogen), 5 mM HEPES (Invitrogen), 100 U/ml penicilina, 100 mg/ml estreptomina (Invitrogen), 4 mg/ml de albúmina de suero vacuno (BSA, Sigma), 4 µg/ml heparina (Sigma), 1X de suplemento N2 (GIBCO), 10 ng/ml de Egf (Invitrogen) y 20 ng/ml de Fgf (Sigma). En estas condiciones las células de la EGL crecen en forma de neurosféricas (figura 12). Las células se mantenían en cultivo a 37°C y en una atmósfera de 5% CO₂ y se realizaban pasajes celulares cada 5 días (5DIV; del inglés *days in vitro*) para evitar que los flascos llegaran a la máxima confluencia. En cada pase se realizaba una disgregación mecánica con una pipeta P100 y las células resultantes de la disgregación de las neurosféricas se contaban con la cámara de Neubauer y se cultivaban de nuevo a una concentración de 10.000 células/cm² en nuevos flascos con medio estándar con tal de mantener el cultivo celular. Con estos cultivos podemos realizar diferentes tipos de experimentos según el objetivo de estudio. Tanto se puede estudiar la tasa de proliferación característica de las células madre como la multipotencialidad característica de estos precursores.

A) CULTIVO DE NEUROSFÉRICAS



B) MEDIO DE PROLIFERACIÓN



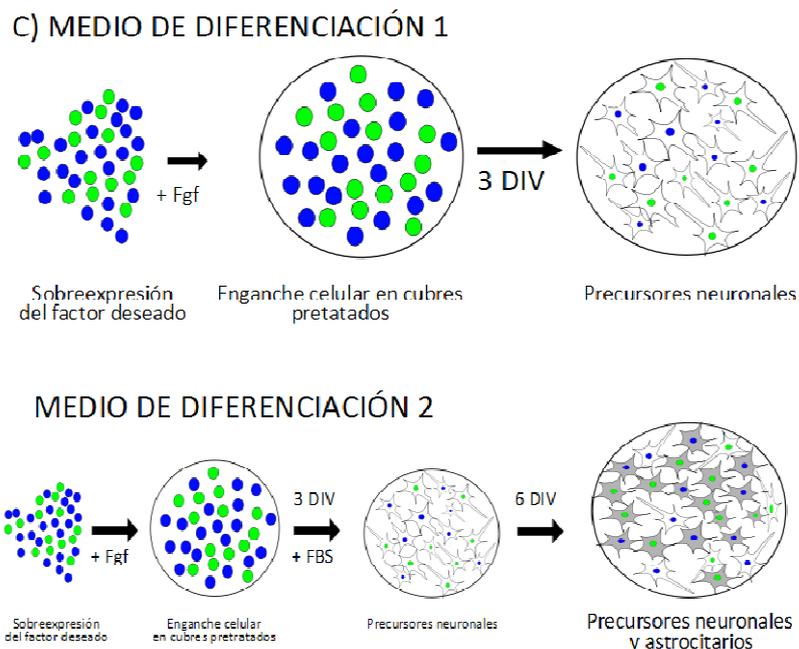


FIGURA 12: Protocolos para estudiar la tasa de proliferación y la multipotencialidad de diferenciación de las neurosféricas derivadas de la EGL. (A) Las EGLs de los animales de E14.5 se cultivan en un medio con mitógenos para permitir la formación de neurosféricas que se mantiene en cultivo durante un tiempo indefinido. (B) Tras la transfección del factor deseado, las neurosféricas se cultivan durante 3DIV y, antes de fijarlas, se les aplica un pulso corto de BrdU.(C) Los experimentos de diferenciación nos permiten conseguir precursores neuronales o astrocitarios dependiendo de los factores exógenos que añadimos al medio de cultivo.

Los estudios de proliferación nos permiten esclarecer cómo afecta la presencia de un factor de transcripción transfectado en el comportamiento de generación de nuevos precursores. En este protocolo, las células se cultivaban con medio estándar en pocillos de placas P24 en diferente densidad según si se transfectaba o se infectaba el cultivo para producir la sobreexpresión (ver apartado siguiente de Materiales y Métodos). Tras tres días de cultivo, se añadía 1nM de BrdU (Sigma) durante 20 minutos para facilitar que este análogo de la Timidina se intercalara en el ADN de nueva síntesis que se realiza en la fase S. Tras este tratamiento, las células se adherían en cubreobjetos pretratados con Matrigel (BD Bioscience) durante 10 minutos con tal de facilitar que las neurosféricas se adhirieran a una superficie. Tras esta adhesión, se fijaban los cubres con paraformaldehído 4% (PFA, Merck) durante 15 minutos y se realizaban lavados posteriores con PBS con tal de proceder la inmunocitoquímica correspondiente. Posteriormente, y antes de realizar la inmunocitoquímica, las células fueron tratadas durante 20 minutos con HCl 2N con la

finalidad de desnaturalizar el ADN y se neutralizó la reacción incubando las células con Borato Sódico 0,1M a pH= 8,5. Tras este tratamiento, las células ya estaban preparadas para someterse al proceso de inmunocitoquímica (figura 12B).

En el caso de las neurosféricas procedentes de animales $Ik^{-/-}$, se realizó una aproximación para calcular la tasa de proliferación de estos precursores. Las neurosféricas provenientes de estos animales fueron cultivadas y se dejaron formar las neurosféricas durante 5 *in vitro*. La relación del número de neurosféricas formadas respecto el número de células totales tras la disgregación de las neurosféricas dará una estimación de la tasa de proliferación de estos cultivos.

En cuanto a los estudios de diferenciación, las células disgregadas se sembraban en cubreobjetos pretratados con Matrigel tras la transfección o la infección (mirar en cada caso el apartado correspondiente). Tras engancharse las células, se añadía el medio de diferenciación 1 (MD1) cuya composición era idéntica al medio estándar eliminando el mitógeno Egf. Tras 3 días de cultivo, el medio se cambió por el medio de diferenciación 2 (MD2) que está compuesto por los mismos componentes del medio estándar sin mitógenos pero con un 2% de suero fetal bovino (FBS, del inglés fetal bovine serum; GIBCO). De esta manera, tras 6 días de cultivo, se facilitaba que los precursores se diferencien a neuronas, astrocitos y a oligodendrocitos. Las células se fijaban con PFA 4% en cada uno de los cambios de medio (3 y 6 días *in vitro*) según el objetivo de estudio de cada experimento (figura 12C).

2.2 – Cultivos estriatales primarios

Las EGLs se disociaron mecánicamente con una pipeta Pasteur y se sembraron en placas de 24 pocillos con cubreobjetos pretratados con 0,1 mg/ml de Poli-D-lisina (Sigma) a una densidad de 150.000 células/cm². Las células se cultivaron con el medio mínimo esencial Eagle (MEM, GIBCO-BRL) suplementado con 7,5% FBS (GIBCO), 0,6% D-(+)-glucosa (Sigma), 100 U/ml penicilina y 100mg/ml estreptomina (Invitrogen) con el objetivo de conseguir un cultivo mixto de neuronas y astrocitos. Los cultivos se mantenían en incubadores a 37°C en una atmósfera que contiene un 5% CO₂. Las células se mantuvieron en cultivo durante 3 días si se realizaban experimentos de transfecciones o durante 5 días si se utilizaban las células para estudiar la colocalización de diversos marcadores neurales. Tras estos días, las células se fijaron con PFA 4% preparado con PBS para su posterior procesamiento para realizar las correspondientes inmunocitoquímicas.

3 – TRANSFECCIONES E INFECCIONES VÍRICAS

La sobreexpresión de las proteínas de interés tanto en los cultivos de neuroesferas como en los cultivos primarios los realizamos mediante la transfección de los plásmidos deseados o, bien, por la infección de partículas lentivíricas.

La transfección de los plásmidos en el cultivo de neuroesferas se realizó mediante la técnica de electroporación. Se usó el protocolo comercial de transfección de NSC de ratón de Amaxa Biosystems (Colonia, Alemania). Las neuroesferas en cultivo se disgregaron mecánicamente y, 5×10^6 células se transfectaron con 12 μg del plásmido correspondiente según indica las instrucciones del fabricante. En los estudios de sobreexpresión de Ikaros se utilizó el plásmido pMX-Ik1-IRES-GFP que codifica para la expresión de la isoforma 1 de Ikaros (Gomez del Arco y col., 2004). Como plásmido control se utilizaron 4 μg del plásmido comercial pmax-eGFP (Amaxa) que codifica para la proteína verde, GFP. Para realizar los estudios de proliferación, se cultivaron 25000 células/ cm^2 con el medio estándar con mitógenos para facilitar la formación de neuroesferas. Tras la siembra de células, el procedimiento de pulso de BrdU y de fijación se realizó tal y como ya ha sido comentado anteriormente. Con estas células transfectadas también se podían realizar experimentos de expresión génica y de cuantificación proteica. En este caso, tras la transfección de las células se cultivaban 55000 células/ cm^2 y se dejaban proliferar durante 3 días. Tras este periodo, se recogían y se centrifugaban las células con el fin de conseguir un precipitado celular que posteriormente se congelaría a -80°C y se procesaría para realizar una PCR a tiempo real (RT-PCR, del inglés real time polymerase chain reaction) tal y como se especifica en el apartado correspondiente.

Los estudios de nucleofección para sobreexpresar la proteína Helios en neuroesferas se realizaron usando el plásmido MSCVneoB-eGFP y MSCVneoB-HeliosFullLength-eGFP (Kelley y col., 1998). Para estudiar la diferenciación de estos precursores, se sembraron 1500000 células/ cm^2 debido a los efectos de la sobreexpresión en estas células. En todos los estudios de nucleofección se conseguían unos porcentajes alrededor de 50-60% de sobreexpresión.

La sobreexpresión de los plásmidos en los cultivos primarios se realizó tanto por lipofección como por infección lentivírica dependiendo de los estudios que se realizaron. Para el estudio de la diferenciación tras la expresión de Ikaros, se utilizaron 0.5 μg de los plásmidos anteriormente citados. Se siguió el protocolo de transfección de la Lipofectamina LTX (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La eficiencia de la transfección era alrededor de 0.5 – 1% de las células del cultivo.

Al observar la baja eficiencia de transducción que presentaban los métodos de transfección, probamos a realizar los experimentos de sobreexpresión mediante la infección lentivírica. Así pues, en los experimentos de sobreexpresión de Helios infectamos tanto los cultivos primarios como las neuroesferas con lentivirus que contiene el plásmido Helios. El sistema de infección vírica está basado en la transducción vírica descrita por el laboratorio del Dr. Trono en Salk Institute (Naldini y col., 1996). A partir del plásmido PRV-IRES-eGFP (Genetrix, Tres Cantos, Madrid) se extrajo el MCS-IRES-eGFP con la finalidad de introducirlo en el plásmido pRRLsinPPT, vector necesario para la transducción lentivírica y formar así el plásmido pLV-IRES-eGFP. Para sobreexpresar Helios, el gen Helios humano se extrajo del plásmido SPORT6-Helios (Invitrogen) y se clonó en el pLV-IRES-eGFP para obtener el plásmido que se usaría para la infección. Con tal de producir los virus, las células embrionarias de riñón HEK293T fueron transfectadas por el método de coprecipitación cálcica con un sistema de tres plásmidos para facilitar la producción vírica: pLV-IRES-eGFP / pLV-Helios-IRES-eGFP, el plásmido que expresa los genes *gag* y *pol* y el plásmido que expresa el virus G somatitis vesicular. De esta manera, se facilita la formación de la cápsula lentivírica que permitirá transportar el plásmido al interior de la célula que infectará. Durante 3 días tras la transfección, el sobrenadante producido por las células 293T se recogió, se pasó por filtros de 0.45 μm de poro y se centrifugó a 22.000 x G durante 90 minutos para precipitar los virus. Este precipitado celular obtenido se disolvía con una solución de 1% BSA y el resultado ya estaba preparado para el uso posterior. La titulación vírica (MOI, del inglés multiplicity of infection) se realizaba infectando las células 293T con estos virus y analizando el título de eGFP mediante scanner de las células que presentan la fluorescencia activada (FACS).

Para el estudio de proliferación de las neuroesferas con Helios sobreexpresado, se sembraban 13500 células/cm² y se infectaron con los virus pLV-IRES-eGFP o pLV-Helios-IRES-eGFP con un MOI=5. Tras 3 días de cultivo, las células se trataban con BrdU y se seguía el protocolo anteriormente descrito.

4 – RECOGIDA DE MUESTRAS

Las muestras recogidas durante toda esta tesis se realizaron de dos maneras diferentes según el experimento que se llevaría a cabo. Los cerebros se extrajeron a las edades deseadas tras un sacrificio del animal mediante dislocación cervical. En el caso de las edades prenatales, los embrionarios se extrajeron mediante una incisión abdominal con material de cirugía estéril. En el caso de edades postnatales, el cerebro

se extrajo y se manipuló siguiendo diferentes protocolos según el experimento a realizar. En el caso de diseccionar el encéfalo, en este momento se diseccionaban las áreas deseadas de estudio con una lupa con luz fría (Leica) y con material de disección.

Aquel material, tanto prenatal como adulto, destinado para estudiar la expresión génica por RT-PCR, la expresión proteica por Western Blot, estudio de TUNEL, realizar hibridaciones *in situ* o realizar inmunohistoquímicas contra Helios se congeló en isopentano enfriado a -80°C durante 1 minuto. Posteriormente el material se guardó a -80°C en el caso de la expresión génica y proteica y a -20°C en el último caso del estudio de TUNEL, la hibridación *in situ* y la inmunohistoquímica.

Aquel material destinado para realizar inmunohistoquímicas generales se profundía con PFA 4% con tal de evitar que en las muestras hubiera restos de sangre y evitar así la alta inmunoreactividad. En el caso de los animales prenatales, los cerebros se extraían los cerebros y se incubaban a 4°C con PFA 4% durante una noche. Posteriormente, se mantenían con solución PBS con sucrosa 10% y azida 0,02% hasta su posterior procesamiento. En el caso de los animales postnatales, la perfusión se realizaba a través del ventrículo cardíaco izquierdo. Tras la perfusión, se extrajeron los cerebros y se incubaron durante toda la noche en PFA 4% a 4°C y se mantuvieron en sucrosa 10% en PBS en azida 0,02% hasta su final procesamiento.

Aquel material destinado para las hibridaciones *in situ*, TUNEL e inmunohistoquímicas se utilizó para realizar cortes histológicos coronales con el criostato (Leica). Tras congelar los cerebros con isopentano enfriado a -80°C , se montaron los cerebros con OCT (Tissue-Tek) con tal de montar la muestra para ser cortada en el criostato. Los cerebros de los animales prenatales y postnatales hasta P15 se cortaron a $14\ \mu\text{m}$ y los cortes se enganchaban en portas tratados con *-3-aminopropil-trimetoxi-Silane* (Sigma). De esta manera se evitaba la presencia de grasas y facilitar la adherencia y posteriormente se conservaban a -20°C hasta la realización de los experimentos. Los cortes de los cerebros de los animales adultos se realizaron a $30\ \mu\text{m}$ y los cortes se guardaron en placas con 96 pocillos con PBS-0,02% azida a 4°C hasta realizar el experimento.

5 – EXPERIMENTOS DE EXPRESIÓN GÉNICA

La expresión génica se analizó en muestras de: EGL de animales a diferentes estados embrionarios y NSC provenientes de los ensayos de neuroferas tanto en estado proliferante como en estado de diferenciación. Tras la obtención de la materia

prima, ésta se congelaba a -80°C para evitar la degradación del RNA hasta el momento de realizar el experimento. Primeramente, se extrajo el RNA de las muestras tal como indica las instrucciones del kit comercial Nucleospin II Kit (Macherey-Nagel). A continuación, se sintetizó el ADN complementario (ADNc) necesario para el análisis por RT-PCR a partir de 500 ng del RNA total obtenido. El kit utilizado para tal efecto era el kit comercial StrataScript® First strand cDNA Synthesis System (Stratagene). La síntesis de ADNc se realiza siguiendo las instrucciones del fabricante a 42°C durante 60 minutos en un volumen final de 20 μl . Una vez sintetizado se analiza la expresión génica realizando una PCR utilizando los ensayos de expresión génica comerciales TaqMan (Applied Biosystems) que se detallan en la tabla II. La RT-PCR se realiza en placas de 96 pocillos utilizando un volumen final de 25 μl . La solución utilizada contiene 12,5 μl de Brilliant Q-PCR Master Mix (Stratagene), 1,25 μl de TaqMan Gene Expression Assays y 0,4 μl de ADNc. Con tal de facilitar la reacción se siguieron los siguientes ciclos: una inicial desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, seguida de 45 ciclos de una PCR de dos pasos: 95°C durante 30 segundos y 60°C durante 1 minuto. Para el análisis de la expresión génica, se realizaron utilizando la versión 3.0 del software de análisis MxPro™ Q-PCR (Stratagene). La cuantificación se realiza mediante un análisis cuantitativo comparativo expresado como n veces la diferencia de expresión relativa respecto al control, el caso de las células, o respecto a la edad más temprana en el caso del análisis de las muestras de cerebro. En este caso, todos los resultados se analizan respecto al gen normalizador, la subunidad 18S del ácido ribonucleico (ARN) ribosómico, con tal de relativizar la cantidad de ARN de cada muestra con un gen control.

Todos los ensayos de PCR se plantean utilizando replicados de cada muestra y analizando un mínimo de 3 experimentos independientes. Así pues, los datos utilizados para el posterior análisis estadístico serán aquellos que muestren resultados consistentes tanto en las sondas de los genes estudiados como los resultados del normalizador. Los controles negativos utilizados con el fin de excluir la contaminación por ADN genómico se obtienen omitiendo la transcriptasa reversa en el paso de la síntesis del ADNc. De esta manera, las muestras se someten al proceso de síntesis de ADNc sin el enzima responsable de tal síntesis.

Gen	Sonda Taqman®
18S RNA	Hs99999901_s1 +
Delta1 (DII1)	Mm00432841_m1 +
Deltex1 (Dtx1)	Mm00492297_m1 +
Dlx2	Mm0043827_m1
GFAP	Mm00546086_m1 +
Helios	Mm00496108_m1
Hes1	Mm00468601_m1 +
Hes5	Mm01266490_g1 +
Ikaros1 (Zfpn1a1)	Mm01187878_m1
Jagged (Jag1)	Mm00496902_m1
Mash1 (o Ascl1)	Mm01228155_g1 -
Notch1	Mm00435245_m1 +
Notch3	Mm00435270_m1 +
RBP-J-k (Rbpsuh)	Mm00770450_m1 +

Tabla II: Sondas Taqman® utilizadas en los experimentos de RTPCR, indicando la referencia comercial.

6 – ANÁLISIS DE EXPRESIÓN PROTEICA (WESTERN BLOT)

La expresión proteica se analizó en dos tipos de muestras: EGL a diferentes edades embrionarias y neuroferas en proliferación tras la sobreexpresión del plásmido deseado. Para la detección de la proteína Ikaros durante el desarrollo embrionario del estriado, muestras de EGL y estriado de E18,5 y P15, respectivamente, fueron diseccionados y lisados con el tampón RIPA (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 1% Tritón X-100, 0,1% Dodecil sulfato sódico, 0,5% deoxicolatode sodio, 1mM PMSF, 10 µg/ml aprotinina, y 1µg/ml leupeptina). Las muestras fueron homogenizadas pasándolas entre 5-6 veces por una aguja de insulina en el tampón para facilitar la lisis celular. Posteriormente, la solución se centrifugó y las proteínas que se localizaban en el sobrenadante se cuantificaron con tal de realizar la inmunoelectrotransferencia o Western Blot. 30 µg de proteína se cargaron en el gel de de electroforesis de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 7.5% y se separaron a una resistencia de 30 mA durante aproximadamente 1 hora y media. Las proteínas separadas en el gel se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa Immobilon-P (Whatman, PROTMAN) a 100 V durante 1 hora y a 4°C para evitar el excesivo

calentamiento de la muestra. Una vez terminada la transferencia, se comenzó a realizar la inmunotinción incubando durante 1 hora, y en agitación, con una solución de bloqueo compuesta por TBS-T (150 mM NaCl, 20 mM Tris.HCl pH=7.5 y 0,05% Tween.20) con un 3% de leche en polvo libre de grasas. A continuación, la membrana se incubó durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario de Ikaros tal y como se describe en la tabla 3 de anticuerpos. Al día siguiente se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS-T para eliminar el anticuerpo primario sobrante. Posteriormente, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario contra ratón IgG HRP-conjugado (Promega) en una dilución 1:1000 en TBS-T durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Tras tres lavados más con TBS-T, la membrana se incubó con la solución reveladora ECL (Bioscience Europe GMBH) durante 1 minuto a temperatura ambiente y posteriormente se expuso a una película con tal de proceder al revelado de la membrana.

Para la detección de las proteínas reguladoras de ciclo celular p21^{CIP/Waf1}, p27^{Kip1} Kip1 y Notch1 procesado (IC-Notch) el precipitado celular de neurosféricas proliferantes transfectadas con Ikaros se homogenizó con el tampón de lisis compuesto por 0,2% SDS en 80 mM Tris-HCl pH=6,8. Tras la cuantificación proteica, 20 µg de proteínas se cargaron en un gel de electroforesis SDS-PAGE al 12% y se separaron a una resistencia de 30 mA durante 2 horas aproximadamente. Tras la migración, las proteínas se transfirieron a una membrana Immobilon P y a continuación, la membrana de bloqueó y se incubó con los anticuerpos tal y como se describe en la tabla 3. El revelado de la misma se realizó tal y como se describe anteriormente.

Cada experimento cuantificación proteica de repitió, al menos, en 3 experimentos independientes. El control de carga de cada una de las membranas se realizaba incubando la membrana analizando los niveles de tubulina y su correspondiente anticuerpo secundario. Para realizar una estimación relativa de los niveles de las proteínas, se realizó una lectura densiométrica de las bandas de la película. Para esto, se escanearon las películas fotográficas y se analizaron utilizando el programa GelPro Analyzer versión 4.0.

7 – ENSAYOS DE MUERTE CELULAR (TUNEL)

El estudio de detección de células en proceso de muerte celular lo realizamos utilizando la técnica de TUNEL (Tdt-mediated dUTP nick end labelling, PROMEGA). Esta técnica está basada en la acción de la enzima transferasa terminal, TdT, la cual cataliza la adición de nucleótidos (dUTPs) marcados con una molécula fluorescente, la

fluoresceína, en los extremos 3' libres del ADN, hecho que permite detectar la fragmentación del ADN producida por la muerte por apoptosis.

Las muestras donde se estudió la muerte celular eran cerebros de animales Wt y animales $Ik^{-/-}$ y neuroesferas transfectadas en estado de diferenciación tras 3 días de protocolo. Los cerebros fueron extraídos y congelados como se comentó en el apartado anterior dentro de esta misma sección. En el caso de las neuroesferas, tras 3 días de diferenciación, se fijaron con PFA 4% para su posterior procesamiento. En ambos casos, el procesamiento se realizó tal y como indican las instrucciones del fabricante. Tras la reacción se podrá observar fluorescencia en aquellas células que han iniciado el programa de muerte celular.

8 – HIBRIDACIONES *IN SITU*

Durante la presente tesis se han realizado diversas hibridaciones *in situ* con el objetivo de analizar la expresión de diferentes ARN mensajero (ARNm): Ikaros, encefalina, sustancia P, Dlx2, Dlx5 y Ebf-1. A continuación se describe el protocolo seguido para llevar a cabo cada experimento.

1. Hibridación *in situ* para detectar Ikaros durante el desarrollo embrionario:

La distribución de Ikaros se estudió en animales a las edades E12,5, E14,5, E16,5 y E18,5. Las secciones coronales de 14 μm se procesaron para realizar una hibridación *in situ* radioactiva tal y como se describe en Marco y col., 2002. La sonda utilizada se describe en la tabla III y se referencia como Ikaros1.

2. Hibridación *in situ* para detectar Ikaros y Helios en animales deficientes para Dlx1/2:

La distribución de Ikaros en los animales deficientes para Dlx1/2 se analizó en embriones de E18,5. Se realizaron secciones coronales de 20 μm y se realizó la hibridación *in situ* utilizando ribosondas de digoxigenina tal y como se describe en Schaeren-Wiemers y Gerfin-Moser, 1993. Las sondas utilizadas se describen en la tabla III.

3. Hibridación *in situ* para la detección de encefalina y sustancia P:

Las secciones coronales de animales Wt y $Ik^{-/-}$ de las edades P3 y P7 fueron procesados por hibridación *in situ* radioactiva tal y como se describe en Marco y col., 2004. Las sondas de oligodesoxirribonucleótidos utilizadas se describen en la tabla III. La cuantificación de la expresión de encefalina y sustancia P se realizó según describe Pineda y col., 2005. Secciones consecutivas (23-29 secciones por animal) se

escanearon y los niveles de ARNm se analizaron utilizando el programa ImageJ (National Institute of Mental Health, Bethesda). La intensidad se cuantifica en un área cuadrada de $152,4 \mu\text{m}^2$ y la señal de fondo del área adyacente fuera del encéfalo fue sustraída. Los resultados son expresados como media de diferentes animales y las barras de error representan el error estándar de la media.

4. Hibridación in situ para la detección de la expresión de Dlx2, Dlx5 y Ebf-1:

Para analizar la expresión de Dlx2, Dlx5 y Ebf-1 se utilizaron animales $Ik^{-/-}$ y animales Wt a la edad de E15,5. Tras la obtención y procesamiento del material, se realizaron cortes coronales de $20 \mu\text{m}$ y se realizó la hibridación in situ tal y como se describe en Flames y col., 2004.

Plásmido	Tamaño de la sonda	Distancia desde extremo 3'	Fuente
Ikaros1	44	93-137	OPERON
Encefalina	29	513-542	Applied Biosystem
Sustancia P	47	223-270	Isogen Bioscience
Dlx2	29	513-542	OPERON
Dlx5	44	93-137	OPERON
Ebf-1	47	223-270	OPERON

Tabla III: Secuencia nucleotídica de las sondas utilizadas en las hibridaciones *in situ*.

9 – ESTUDIOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR *IN VIVO*

Con tal de estudiar si la ausencia del factor de transcripción Ikaros afectaba la el proceso de neurogénesis, realizamos dos aproximaciones experimentales. En la primera, queríamos estudiar si la ausencia de Ikaros afectaba de alguna manera a la proliferación de los precursores neurales localizados en la ZSV de la EGL. A ratonas gestantes en el 14 día de embarazo se le inyectó intraperitonealmente BrdU a 50 mg/Kg en una solución isotónica de NaCl 0,9% durante 30 minutos. Tras este periodo, se extrajeron los cerebros de los embriones y se procesaron para inmunohistoquímica tal y como se ha descrito anteriormente. De esta manera, podíamos observar las células que habían incorporado BrdU indicándonos células que estaban en la fase S del ciclo celular. La segunda aproximación era observar si la ausencia de Ikaros afectaba a los progenitores que abandonan el ciclo celular. Para tal objetivo, a diferentes ratonas gestantes a E12,5, E14,5 y E16,5 se les inyectó BrdU

intraperitonealmente y se extrajeron y procesaron los embriones a E18,5. Sólo las células que hayan salido de ciclo en el momento de la inyección podrán retener el BrdU y ser positivas. Todos los progenitores que sigan proliferando terminarán diluyendo el BrdU resultando presentar una tinción negativa. A continuación, se presenta un esquema representativo del proceso de inyección de BrdU en los denominados experimentos de pulso largo de BrdU.

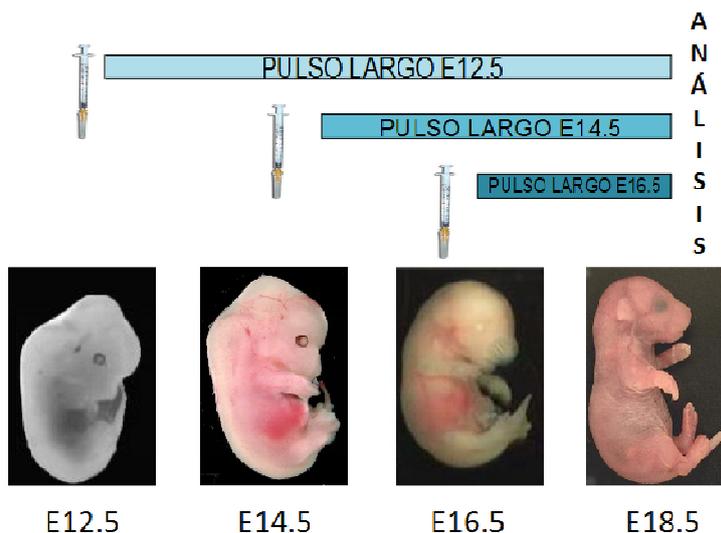


FIGURA 13: Esquema de los tratamientos con BrdU diseñado para detectar la neurogénesis en los diferentes estadios del desarrollo del estriado. Se administra BrdU intraperitoneal a las hembras gestantes en las diferentes etapas del desarrollo y los embriones se analizan a E18, 5.

Tras la obtención de los cerebros, su posterior fijación y cortes al criostato, las secciones se incubaron en HCl 2N durante 20 minutos a 37°C para desnaturalizar el ADN. Posteriormente se neutralizó el efecto del ácido incubando los cortes con una solución de borato sódico 0,1 M a pH=8,5 durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se procesó según el protocolo descrito a continuación dentro de esta misma sección.

10 – INMUNOCITOQUÍMICA E INMUNOHISTOQUÍMICA

Las inmunocitoquímicas realizadas en la presente tesis seguían un protocolo estándar que ya se implementaba en el laboratorio. Tras los tratamientos específicos, como el ya explicado en el caso de la detección del BrdU incorporado, se procedía a la permeabilización y bloqueo de los epítomos inespecíficos de las células. Para tal efecto, las células se incubaban con PBS - 0,3% tritón-X-100 y BSA 10% durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente se realizaban 3 lavados con PBS y ya se pasaba a incubar toda la noche con el anticuerpo deseado (mirar tabla IV) preparado en la misma solución. Al día siguiente, se realizaban 3 lavados con PBS y se incubaba con el anticuerpo secundario conjugado con Cy2 o Cy3 correspondiente diluido en PBS - 0,3% tritón-X-100 pero con BSA al 5% durante 2 horas en temperatura ambiente y en agitación. Tras varios lavados con PBS, los núcleos de las células se tiñeron durante 10 minutos con DAPI (4,6'-diamidino-2-phenylindole; Sigma; 1:1000) preparado en PBS y se realizaron lavados consecutivos para eliminar el exceso de solución y poder así montar los cubreobjetos con Mowiol (Merch Chemicals Ltd.). Tras el proceso de secado del Mowiol, la inmunocitoquímica se podía observar en un microscopio con fuente de fluorescencia para detectar la señal.

Las inmunohistoquímicas de fluorescencia realizadas en los animales tanto pre como postnatales seguían un protocolo semejante al realizado en las células. Tras disponer de los tejidos cortados coronalmente, el tejido se incubó con PFA 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente excepto en la detección de Helios que el anticuerpo no permitía ningún tipo de fijación. Tras la incubación, se realizaban 3 lavados con PBS y se procedió al paso de permeabilización y bloqueo con PBS - 0,3% tritón X - 100 y BSA 10% a temperatura ambiente durante 1 hora. La incubación con el anticuerpo se realizó diluida en la misma solución de permeabilización según la tabla IV, durante toda la noche y a 4 °C en una cámara húmeda. Después de dos lavados con PBS, se incubaron las secciones con los anticuerpos secundarios conjugados a moléculas fluorescentes según la tabla de los anticuerpos. Tras los lavados para eliminar el exceso de secundario se incubó con DAPI 1:1000 preparado en PBS durante 10 minutos y se montó con Mowiol para su posterior observación al microscopio. En el caso de la detección de antígenos como DARPP-32, NeuN y calbindina se realizaron inmunohistoquímicas utilizando anticuerpos secundarios conjugados con biotina, de tal manera que se realiza un revelado químico siguiendo el protocolo de incubación con ABC (Pierce) y revelando con DAB. Con tal de poder comparar las diferentes inmunohistoquímicas, el tiempo de revelado para todas las secciones era el mismo en

todos los animales. A continuación se muestra una tabla con la información de cada uno de los anticuerpos usados durante la presente tesis.

Antígeno	Hecho en:	Dilución	Casa comercial
BrdU	Ratón	1:50	DAKO
CB	Ratón	1:1000	Sigma-Aldrich
ChaT	Conejo	1:4000	Millipore
DARPP-32	Ratón	1:500	Millipore
GFAP	Conejo	1:500	Dako
GFAP-Cy3	Ratón	1:200	Sigma-Aldrich
GFP-FITC	Cabra	1:200	Abcam
Helios	Conejo	1:1000	Dr. Smale
Ikaros	Ratón	1:2000	Dr. Georgopoulos
MAP2	Ratón	1:500	Sigma-Aldrich
MAP2	Ratón	1:200	Stemberger
Nestina	Conejo	1:200	Covance
Nestina (401)	Ratón	1:50	Hibrydoma Bank
NeuN	Ratón	1:100	Millipore
IC-Nocth	Conejo	1:100	Cell Signalling
O4	Ratón	1:75	Chemicon
p21 ^{Cip/waf1}	Conejo	1:200	Santa Cruz
P27 ^{Kip1}	Ratón	1:500	BD bioscience
PV	Conejo	1:1000	SWANT
β-III-Tubulina (Tuj-III)	Conejo	1:200	Sigma-Aldrich
β-III-Tubulina (Tuj-III)	Ratón	1:200	Sigma-Aldrich
Cy2 anti-conejo	Burro	1:100	Jackson-Inmunoresearch
Cy3 anti-conejo	Burro	1:500	Jackson-Inmunoresearch
Cy2 anti-ratón	Burro	1:100	Jackson-Inmunoresearch
Cy3 anti-ratón	Burro	1:500	Jackson-Inmunoresearch
HRP anti-ratón	Cabra	1:1000	Promega
HRP anti-conejo	Cabra	1:1000	Promega

Tabla IV: Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en inmunocitoquímicas, inmunohistoquímicas y Western Blot.

Todas las detecciones de antígeno fueron realizadas en al menos 3 experimentos diferentes, en el caso de las inumocitoquímicas, y en tres animales de diferentes camadas diferentes, en el caso de las inmunohistoquímicas

11 – RECIENTOS CELULARES

Los recuentos celulares realizados en esta tesis diferían según el objetivo del experimento a realizar. Así pues, en este apartado se resume la metodología de recuento en cada uno de ellos.

En los experimentos de proliferación, podemos distinguir dos tipos de recuentos celulares. En los experimentos de transfección de los plásmidos donde se realizaba pulso corto de BrdU, se realizaron recuentos de las células BrdU positivas (en fase S) respecto al total de núcleos que había por neurosfera. Así pues, de cada neurosfera podíamos estimar el porcentaje de células proliferantes dentro de una misma neurosfera. Un total de 30-50 neurosféricas se contaban por cada condición. El resultado final representaba el porcentaje de cada condición respecto la transfección control para así evitar las variaciones intrínsecas de proliferación que mostraba cada cultivo.

En los estudios de proliferación de los animales $Ik^{-/-}$, la estimación de la proliferación se realizó contando el número total de células que tenían las neurosféricas en cultivo. Es decir, después de 5 días del cultivo se contaban las neurosféricas que se habían formado y tras disgregarlas se contaban las células totales del cultivo. Tras estos recuentos se relativizaba el número total de células al número total de neurosféricas para tener así una estimación de la tasa de proliferación. Posteriormente el resultado final se expresaba como el porcentaje medio de cada genotipo respecto al control que sería el genotipo Wt. Estos recuentos se realizaron en un mínimo de tres experimentos independientes.

Las diferentes poblaciones de Nestina en el ensayo de neurosféricas se recontaron según Fukuda y col., 2003. Tras la transfección de las neurosféricas con Helios y el plásmido control, las células se dejaban diferenciar durante 3DIV en MD1. Las células que presentaban la distribución de Nestina en largas prolongaciones se consideraban Nestina tipo I. En cambio, las células que presentaban la Nestina localizada alrededor del núcleo conformaban la población de Nestina tipo II (figura 14). Los recuentos se relativizaron a la población de Nestina tipo I de la transfección con el plásmido control. Estos recuentos se realizaron en al menos tres cultivos transfectados independientes con una eficiencia de transfección de entre 50-60%.

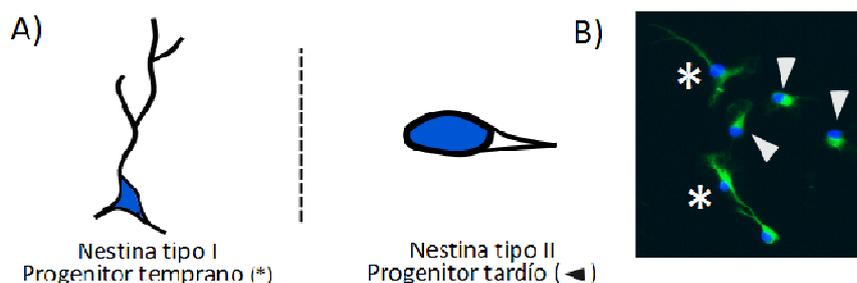


FIGURA 14: Representación esquemática del tipo de progenitores neuronales según su distribución de Nestina. (A) Esquema de la morfología del filamento Nestina (negro) alrededor del núcleo celular (azul) según las dos clases de progenitores. Imagen adaptada de Fukuda y col., 2003. (B) Imagen representativa de la inmunocitoquímica de Nestina (verde) de neuroesferas diferenciadas. Se representan células pertenecientes a cada una de las subpoblaciones.

En los experimentos de recuentos de poblaciones neurales en diferenciación, se recontaban el total de las células positivas para el marcador deseado respecto al total de núcleos celulares que presentaba el cultivo. De esta manera se podía obtener un porcentaje que indicaba qué cantidad de células pertenecen a las diferentes poblaciones neurales. A la hora de realizar los recuentos, nos asegurábamos que la transfección fuera aproximadamente del 50-60%. Finalmente, este porcentaje se refería al control de cada cultivo para así evitar las diferencias intrínsecas de los cultivos de neuroesferas. Los resultados mostrados representan los recuentos de al menos 3 experimentos realizados en cultivos independientes. El resultado obtenido en estos experimentos nos indica el efecto global que podría tener una sobreexpresión extrínseca en un cultivo determinado.

En la sobreexpresión de los cultivos primarios se recontaban las células positivas para cada marcador respecto a las células que habían sido transfectadas con el plásmido de estudio, es decir, que presentaban un marcaje GFP positivo. Los resultados graficaban como porcentajes de células positivas respecto al control de la transfección, el plásmido vacío.

También se realizaron recuentos estereológicos con tal de cuantificar el volumen y células en los animales $Ik^{-/-}$ respecto a los controles. Para contar los volúmenes se utilizó una herramienta informática estereológica asistida por ordenador (CAST) que se encuentra acoplado a un microscopio Olympus (Ballerup, Dinamarca). Para recontar el volumen del cerebro, los bulbos olfatorios, la zona germinal ZSV y el núcleo estriado se utilizaron 14-16 secciones consecutivas de 30 μm por animal. Tras

visualizarlas al microscopio, se marcaban los bordes de la estructura anatómica. Los volúmenes eran calculados multiplicando la suma de todas las áreas de las diferentes secciones (mm^2) por la distancia entre secciones sucesivas tal y como se describe en Canals y col., 2004. Los recuentos celulares se realizaron tanto para las inmunohistoquímicas contra NeuN, DARPP-32, PV y Chat como para las hibridaciones *in situ* de encefalina y sustancia P en el núcleo estriado de los animales Wt y $\text{Ik}^{-/-}$. También se realizaron recuentos estereológicos para contar las células BrdU positivas en la SVZ de la EGL de los animales $\text{Ik}^{-/-}$ respecto su control.

12 – ESTADÍSTICA

Todos los resultados se expresan como la media de diferentes experimentos independientes \pm s.e.m (del inglés, standard error of mean). Para el análisis estadístico se realizaron el test t-student.

IV. RESULTADOS

El estudio de los mecanismos de diferenciación de las neuronas de proyección estriatales es de vital importancia para entender el proceso de embriogénesis de la EGL. Gran diversidad de proteínas, con múltiples funciones están implicados en este control: desde enzimas citosólicas pasando por factores de transcripción o receptores de membrana. El grupo de los factores de transcripción es el más numeroso y actúa activando o reprimiendo la expresión génica con la finalidad de cambiar el estado de la célula.

En la presente tesis nos hemos centrado en el estudio de los factores de transcripción de la familia Ikaros. Esta familia de proteínas está altamente implicada en el desarrollo del sistema hematopoyético, siendo en este sistema donde se han estudiado principalmente sus funciones (Georgopoulos, 1997). Esta familia está compuesta por diferentes miembros como son Ikaros, Helios, Eos, Dedalus y Pegasus. Todos los miembros de la familia presentan una alta homología de secuencia entre ellos (Molnar y Georgopoulos, 1994). Los factores de transcripción Ikaros pertenecen a la familia de factores de transcripción Krüppel y se caracterizan por la presencia de motivos de dedos de zinc C_2H_2 en sus dos dominios terminales. En el extremo C-terminal de la proteína se encuentran dos dedos de zinc que permiten la dimerización con otras moléculas de la familia y así estabilizar la proteína. Es necesaria una previa dimerización para poder realizar la correcta unión del ADN y controlar la transcripción de los genes dianas. Esta dimerización puede ser tanto con miembros de la misma molécula formando homodímeros como con otros miembros de la familia formando heterodímeros (Molnar y Georgopoulos, 1994). En cambio, la presencia de los dedos de zinc en el extremo N-terminal permite la unión a secuencias específicas del ADN (Georgopoulos y col., 1997). El número de dedos de zinc en el extremo N-terminal de la proteína varía según el procesamiento transcripcional que sufre la proteína (Rebollo y Schmitt, 2003). Debido a este procesamiento se pueden generar diferentes isoformas de las proteínas de la familia Ikaros. Las isoformas con al menos tres dedos de zinc en el extremo N-terminal serán las funcionales mientras que aquellas isoformas que presenten menos de tres dedos de zinc actuarán como dominantes negativos. Estas isoformas cortas normalmente se expresan en bajos niveles actuando como moléculas reguladoras de la actividad de las isoformas activas (Rebollo y Schmitt, 2003).

La familia Ikaros realiza un control de la diferenciación de las células madre hematopoyéticas de manera secuencial. Helios se expresa en etapas tempranas de la génesis de los linfocitos B y T; en cambio, Ikaros se expresa más tardíamente en linfocitos T que han iniciado el proceso de diferenciación (Rebollo y Schmitt, 2003). Es

decir, los miembros de esta familia cooperan con la finalidad de establecer un correcto patrón de diferenciación en el sistema hematopoyético.

En el SNC poco se conoce sobre el papel que estos factores de transcripción ejercen durante el desarrollo embrionario. En la literatura se había descrito la capacidad que presenta la proteína Ikaros para unirse al promotor del gen encefalina (Dobi y col, 1997). Las neuronas encefalinérgicas son las primeras que degeneran durante la evolución de la enfermedad de Huntington, así pues, una posible terapia sustitutiva sería conseguir neuronas de este tipo en el laboratorio y poder trasplantarlas. Es por este motivo que nos hemos centrado en la caracterización detallada de la expresión de Ikaros durante el desarrollo de la EGL. El estudio de Ikaros nos permitió comprobar que Helios también se expresa en el cerebro en desarrollo. Así pues, con tal de elucidar el papel que tienen las dos proteínas durante el desarrollo embrionario de la EGL, hemos utilizado diferentes aproximaciones experimentales con el fin de mimetizar el proceso del desarrollo embrionario en el laboratorio.

1 - EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN HELIOS SE EXPRESA EN DIFERENTES ÁREAS DEL ENCÉFALO EN DESARROLLO

El gen IKZF2 codifica para la proteína Helios que está formada, en su forma activa, por 526 aminoácidos y presenta alta homología con las proteínas de la misma familia. Se engloba en los factores de transcripción de la familia de dedos de zinc C_2H_2 presentando diferentes dominios de unión dependiendo del grado de procesamiento al que esté sometida la cadena de ADN. Como todos los miembros de la familia Ikaros, Helios es un factor de transcripción que se encuentra en el núcleo y regula el proceso de transcripción de los genes diana. En el sistema hematopoyético, se ha descrito que Helios regula la diferenciación temprana de los linfocitos (Rebollo y Schmitt, 2003). En el SNC no se ha estudiado el papel de esta proteína, por ello pasamos a caracterizar su patrón de expresión y su función.

1.1 – Helios se localiza en diferentes áreas neurogénicas del encéfalo

Con tal de analizar la expresión del factor de transcripción Helios se realizaron inmunohistoquímicas para detectar esta proteína en ratones a diferentes estados de desarrollo. A la edad embrionaria de E16,5, se observa la expresión de Helios en: la capa de las células granulares del primordio del bulbo olfatorio (BO) (figura 15A), en la corteza insular y cingulada, en la EGL desde el eje anterior hasta el posterior (figura 15B) y en la zona CA3 del hipocampo en formación (figura 15C). La expresión de Helios en áreas como el BO, la corteza y la EGL es completamente ausente durante la edad postnatal. Para estudiar la implicación de este factor de transcripción en el desarrollo de otras áreas como el cerebelo, estudiamos la expresión en edades postnatales, desde P7 hasta P15. Se observa una marcada expresión de Helios en la capa de las células de Purkinje del cerebelo en desarrollo en las edades postnatales (figura 15D). En edades adultas, la expresión de Helios es totalmente ausente en el encéfalo hecho que nos permite involucrar la acción de Helios durante el desarrollo del SNC.

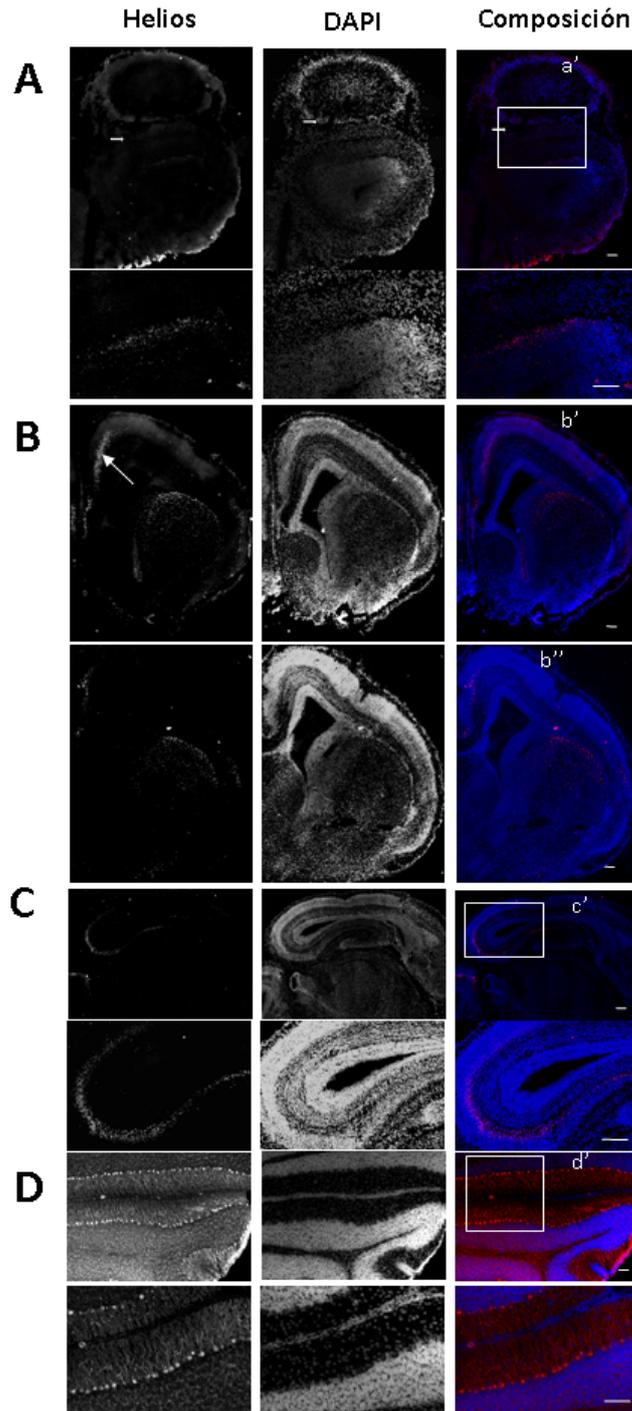


FIGURA 15: Helios se expresa en áreas determinadas durante el desarrollo del SNC. En la figura se muestran microfotografías representativas de diferentes áreas donde se expresa Helios. Inmunohistoquímicas realizadas en secciones de embriones de E16,5. (A) Helios se expresa en la capa granular de la parte anterior del BO (Aⁱ es una ampliación del área marcada). (B) Helios se expresa en la EGL desde porciones anteriores (Bⁱ) hasta secciones posteriores (Bⁱⁱ). (C) En el hipocampo se localizan células Helios positivas en la capa CA3 (Cⁱ representa una ampliación del área marcada). (D) Helios se expresa en las células de Purkinje del cerebelo a la edad de P7 (Dⁱ representa una ampliación del área delimitada). Experimento realizado al menos en 4-5 embriones. Barra de escala: (A-D) 1mm, (Aⁱ, Cⁱ, Dⁱ) 2mm.

1.2 – La expresión de Helios en la EGL se localiza tanto en la ZSV como en la ZM

A pesar de la expresión específica de Helios en diferentes áreas del encéfalo, nos centraremos únicamente en el papel que Helios realiza durante el desarrollo del estriado ya que es el objetivo principal de estudio de nuestro laboratorio. Para esclarecer este objetivo, en primer lugar quisimos estudiar la expresión de Helios en la EGL en formación durante las edades embrionarias. Tal y como muestran el análisis de la expresión génica realizado mediante RT-PCR y las inmunohistoquímicas, la expresión del ARNm de Helios en la EGL empieza a E14,5 y su expresión empieza a decrecer a E18,5, cuando las etapas neurogénicas ya están completamente acabadas y da comienzo la diferenciación astrocitaria (figura 16A). La distribución espacial de la proteína presenta un patrón ventrolateral en las primeras etapas del desarrollo de la EGL. A medida que avanza el desarrollo, Helios cambia de posición adquiriendo una posición dorsomedial en etapas más posteriores (figura 16B) y desapareciendo completamente en edades adultas. Para determinar si Helios se expresaba en la zona donde habitan los progenitores, la ZSV, o donde se localizan las neuronas diferenciadas, la ZM, realizamos una doble inmunohistoquímica con el marcador neuronal β -III-tubulina. Se puede observar como Helios se expresa tanto en la ZSV como en la ZM (figura 16C). Este resultado nos indica que, tal vez, Helios podría estar implicado en la transición de las células desde estados progenitores hasta etapas más diferenciadas.

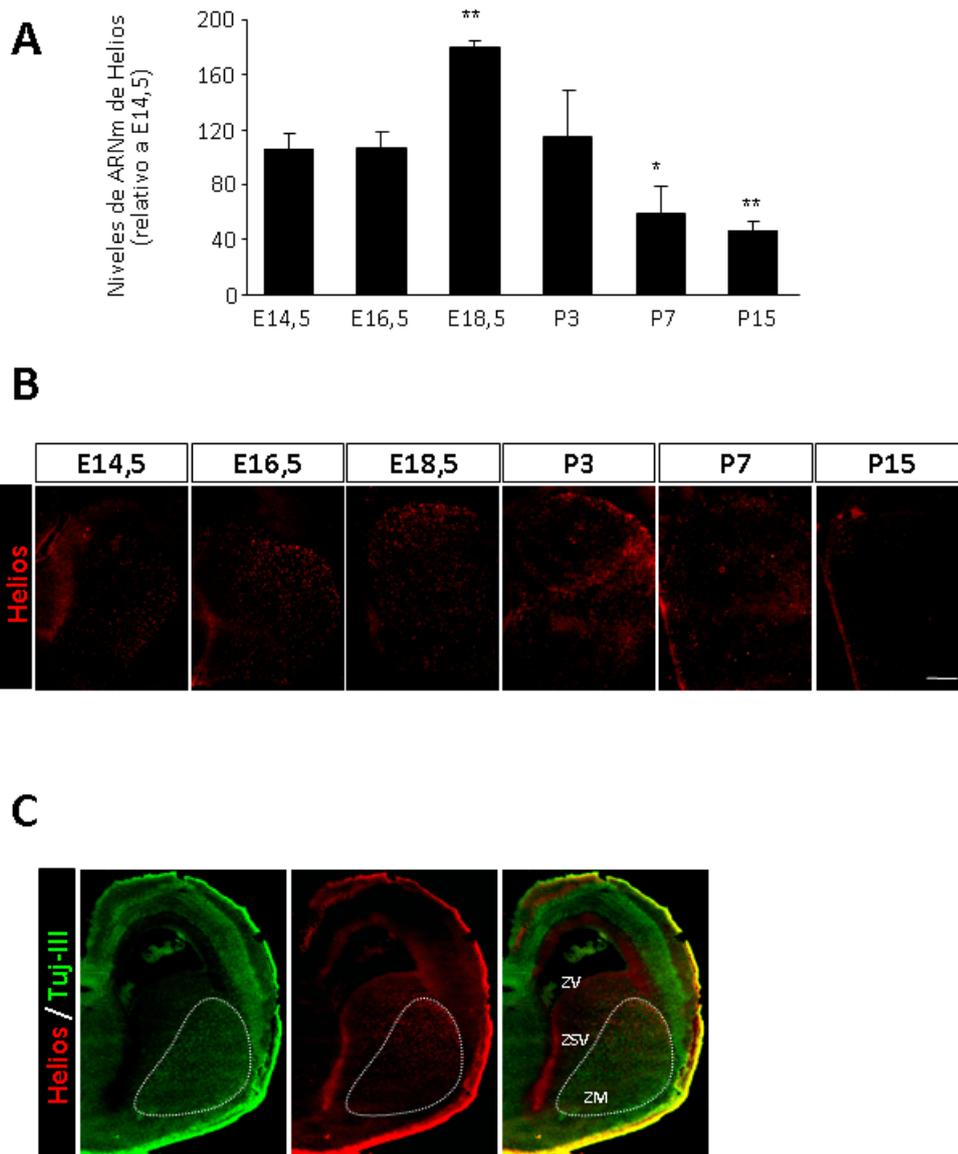
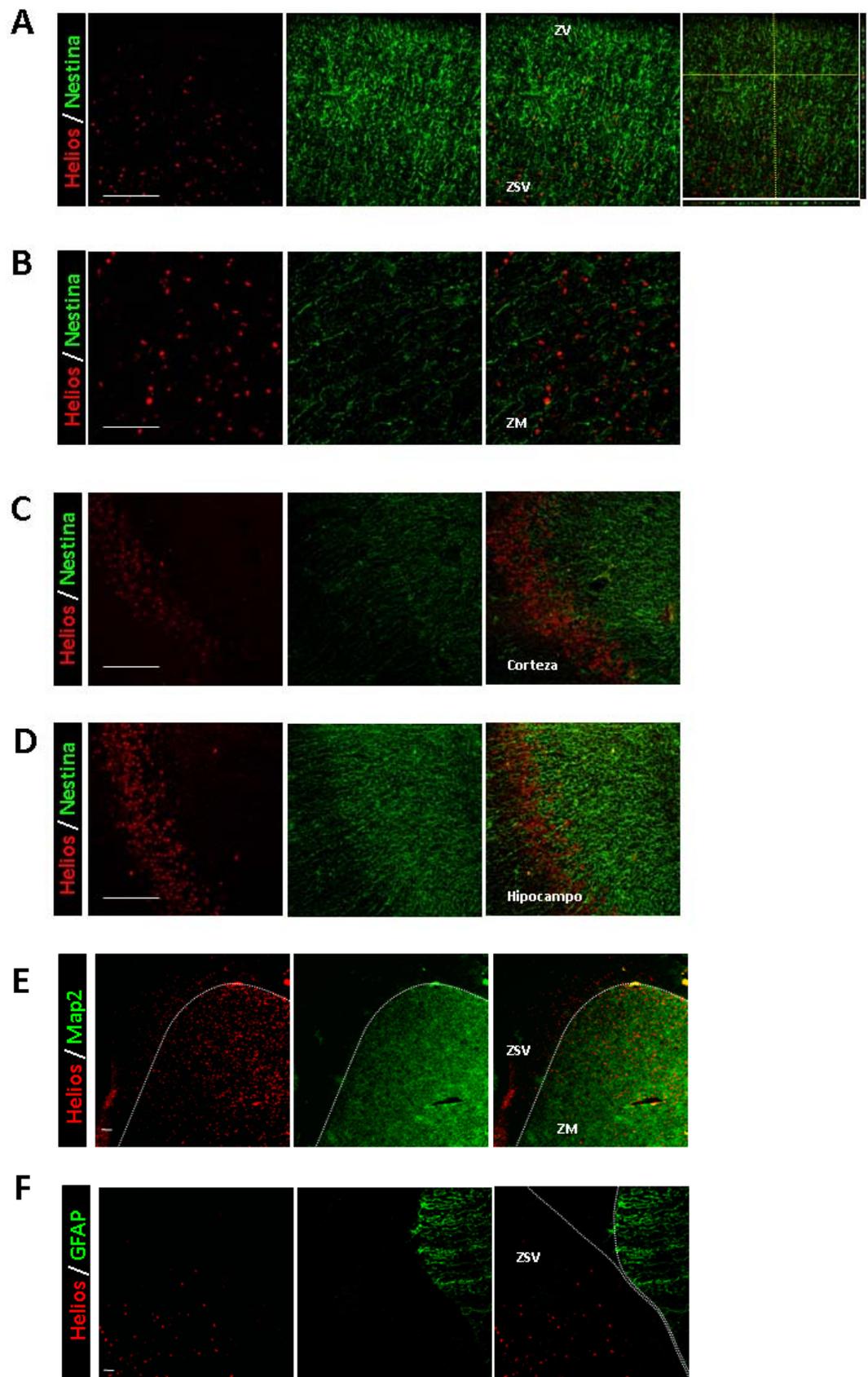


FIGURA 16: Patrón espacial y temporal de Helios durante el desarrollo de la EGL. (A) Cuantificación de los niveles de ARNm de Helios durante el desarrollo de la EGL por RT-PCR. Se observa un pico de expresión a E18,5. Los resultados están representados como los niveles de ARNm de Helios respecto a la expresión de E14,5. La gráfica representa la media de 3-5 muestras de la EGL y las barras de error representan el error standard de la media (s.e.m). El análisis estadístico fue realizado utilizando un test t-student; *p <0,05; **p< 0,005. (B) Inmunohistoquímica de Helios en secciones coronales de la EGL a diferentes edades embrionarias (E14,5, E16,5 y E18,5) y edades postnatales (P3, P7 y P15). (C) Doble inmunohistoquímica de β -III-Tubulina (Tuj-III) y Helios realizada en secciones coronales de embriones de E16,5. Barra de escala=500 μ m.

1.3 – Helios se relaciona con la expresión de marcadores neuronales durante el desarrollo

Posteriormente, analizamos la relación que presentaba Helios con las diferentes estirpes neurales a la edad concreta de E16,5 para esclarecer la relación con la génesis de neuronas. Así pues, los marcadores utilizados para tal efecto fueron: Nestina para marcar los progenitores, MAP2 para marcar las neuronas diferenciadas y el marcador GFAP para marcar los astrocitos. En cuanto a la relación de Nestina con Helios, se puede observar como en la ZSV las células Helios positivas están envueltas por filamentos de Nestina, tal y como muestra el análisis del eje Z (figura 17A). Esta relación va desapareciendo a medida que avanzamos a través de la ZM (figura 17B), donde hay menor tinción de fibras de Nestina pero continúa habiendo gran tinción de células Helios positivas. Esta relación Nestina-Helios es exclusiva de la EGL, ya que el análisis de los dos marcadores a la misma edad en la corteza y en el hipocampo demuestra que Helios y Nestina presentan patrones de expresión completamente independientes (figura 17C-D). Analizando la distribución de Helios dentro de la ZM, se puede observar que aquellas células Helios positivas que ocupan la ZM colocalizan con el marcador neuronal MAP2 (figura 17E). En cambio, cuando analizamos la relación de Helios con un marcador astrocitario, GFAP, observamos que la expresión de Helios no presenta ninguna relación con la expresión del marcador GFAP. La doble inmunotinción de Helios con GFAP muestra que los dos marcadores se expresan en áreas independientes de la EGL (figura 17F).

FIGURA 17: Helios se relaciona con marcadores de progenitores neuronales en la EGL. En la figura se muestran microfotografías de dobles inmunohistoquímicas realizadas en secciones coronales de la EGL de embriones de E16,5. (A) Doble inmunohistoquímica de Nestina y Helios en la ZSV de la EGL. El análisis del eje Z muestra que existe una colocalización de núcleos Helios positivos con los filamentos intermedios Nestina positivos. (B) Doble inmunohistoquímica de Nestina y Helios en la ZM de la EGL muestra que no existe relación entre los dos marcadores en la EGL. (C-D) Doble marcaje de corteza e hipocampo con Nestina y Helios. En estas dos áreas existe una relación de exclusión entre los marcadores Helios y Nestina. (E) La doble tinción con MAP2 y Helios muestra que Helios se expresa tanto en la ZM como en la ZSV. En la ZM las células Helios positivas colocalizan con Map2. (F) Doble inmunohistoquímica de GFAP y Helios en secciones coronales de la EGL. La expresión de GFAP se localiza en una región diferente a la que expresa Helios. Barra de escala = 150 μ m.



La caracterización espacial de la proteína junto con la relación de esta proteína con el resto de marcadores neurales, indica que el factor de transcripción Helios podría estar implicado en los procesos neurogénicos de la EGL.

2 - HELIOS ESTÁ IMPLICADO EN EL PROCESO NEUROGÉNICO AUMENTANDO LA DIFERENCIACIÓN HACIA NEURONAS EN DETRIMENTO DE LOS ASTROCITOS

Una vez analizada la distribución de la proteína Helios, tanto temporal y espacial, pasamos a estudiar cual sería la funcionalidad de este factor de transcripción en diversos sistemas *in vitro*.

2.1 – Helios se expresa en el estado proliferante del ensayo de neuroesferas

Para estudiar la relación que presenta Helios con el proceso de neurogénesis, realizamos dos aproximaciones *in vitro*: el ensayo de neuroesferas para estudiar el efecto de la proteína a nivel de los precursores neurales y los cultivos primarios con tal de estudiar la implicación de Helios durante el proceso de diferenciación neuronal terminal.

La proteína Helios está presente en las neuroesferas en condiciones proliferantes (0DIV), en cambio, su expresión decrece hasta desaparecer en condiciones de diferenciación a 3DIV y 6DIV tal y como muestran la inmunocitoquímica y el análisis de niveles de la expresión de Helios (figura 18A y 18B). Helios parece tener un papel importante en el control del paso de estado proliferante a estado diferenciado. Con tal de estudiar si existe una relación directa entre Helios y el estado proliferante celular, realizamos inmunocitoquímicas en neuroesferas fijadas tras un pulso corto de BrdU. Se observa que la distribución de Helios es independiente a la presencia de las células BrdU positivas, es decir, Helios se expresa tanto en las células de las neuroesferas que están en la fase S como en las que no lo están (figura 18C).

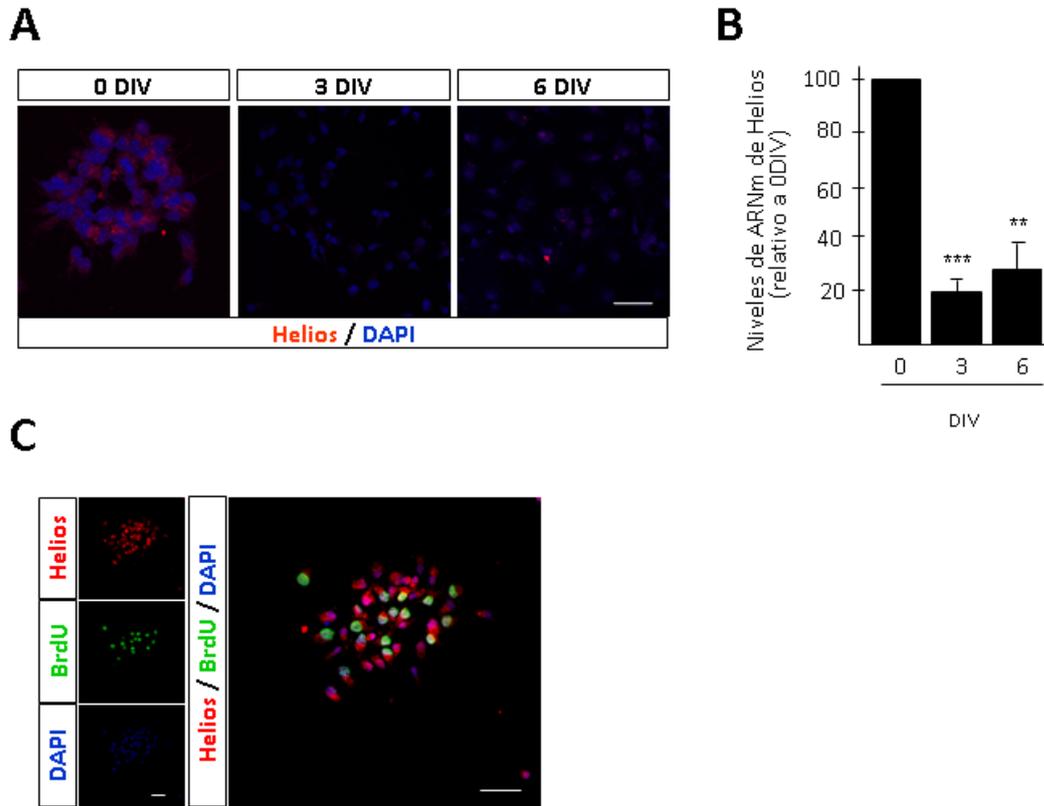


FIGURA 18: Helios se expresa en el estado proliferante de las neurosféricas. (A) Inmunocitoquímica de Helios en neurosféricas en condición de proliferación (0DIV) y diferenciación (3DIV y 6DIV). Helios se expresa de manera notoria en estado proliferante (0DIV) y disminuye durante el proceso de diferenciación (3DIV y 6DIV). Barra de escala= 30 μ m. (B) Análisis de los niveles del ARNm de Helios mediante RT-PCR. Los niveles de ARNm de Helios disminuyen durante el proceso de diferenciación. Los resultados representan la media \pm s.e.m de 4-5 cultivos de neurosféricas y se representan como el porcentaje de ARNm respecto al estado proliferante (0DIV). Para el análisis estadístico se utilizó el test t-student; **p < 0,005; ***p < 0,001. (C) Fotografía representativa de una doble inmunocitoquímica de neurosféricas de Helios y BrdU. Helios se expresa en células en estado proliferante (BrdU positivas) como en células no proliferantes (células no positivas para BrdU). Barra de escala= 30 μ m.

2.2 – La sobreexpresión de Helios induce una reducción de la tasa de proliferación en el ensayo de neurosféricas

El papel que realiza Helios se puede estudiar sobreexpresando esta proteína en el ensayo de neurosféricas y así estudiar qué ocurre tanto en el proceso de proliferación como en el de diferenciación en presencia de la proteína exógena. El estudio de la tasa de proliferación en estas neurosféricas sobreexpresadas demuestra que la presencia exógena de Helios disminuye la cantidad de células que se encuentran en fase S respecto a la transfección control (figura 19). Podemos concluir que la presencia forzada de Helios induce una disminución de la tasa de proliferación. Esta disminución de la tasa de proliferación no se debería a una actuación directa sobre la fase S del ciclo celular ya que Helios no se expresa exclusivamente en células proliferantes, BrdU positivas (figura 18C).

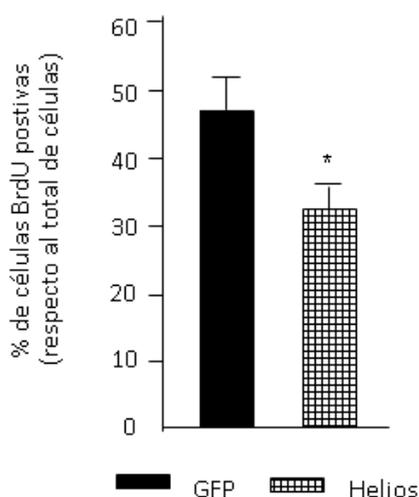


FIGURA 19: La sobreexpresión de Helios reduce la tasa de proliferación de las neurosféricas. La tasa de proliferación se representa como número de células BrdU positivas respecto el número total de células por neurosféricas. Los resultados se representan como la media \pm s.e.m. de 5 cultivos de neurosféricas. El análisis estadístico utilizado es t-student; * $p < 0,05$.

2.3 – La sobreexpresión de Helios no induce muerte celular apoptótica en el ensayo de neurosféricas

Esta reducción de la proliferación puede ser debida a un aumento de la muerte celular, o bien, que implique un aumento en la diferenciación neural de los precursores. Para estudiar el efecto sobre la muerte celular, transfectamos las neurosféricas con el plásmido de estudio y las dejamos diferenciar durante 3DIV para estudiar la presencia de procesos apoptóticos utilizando la técnica de TUNEL. Tras realizar los recuentos, observamos que no existen diferencias en el número de células apoptóticas entre la transfección con el plásmido control o con el plásmido Helios (figura 20A y 20B).

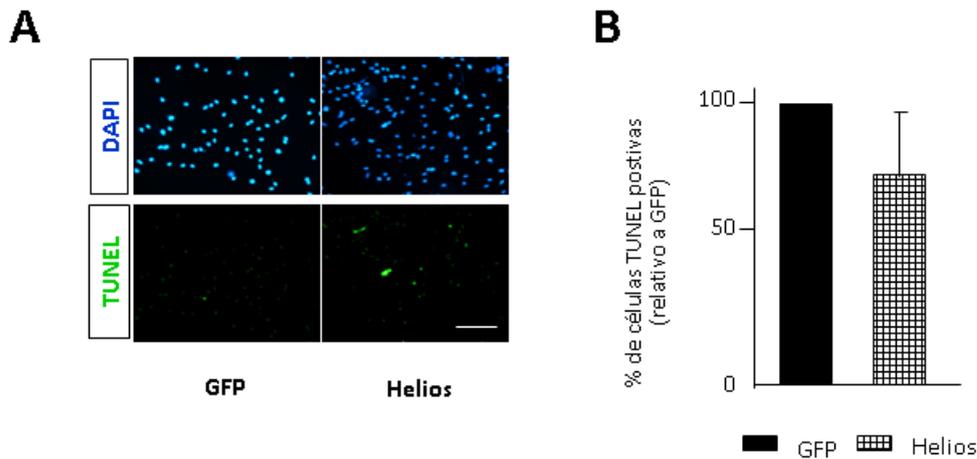


FIGURA 20: La sobreexpresión de Helios no induce muerte celular apoptótica. (A) Fotografía representativa del TUNEL realizado en neuroesferas transfectadas con Helios y el plásmido control tras 3DIV en condiciones de diferenciación. Barra de escala= 30 μ m. (B) Recuento de células TUNEL positivas en cada condición de sobreexpresión. Las gráficas representan número de células TUNEL positivas respecto la sobreexpresión del plásmido control. Los resultados se representan como media \pm s.e.m. y se realizó el análisis estadístico t-student.

2.4 – Helios induce la diferenciación neuronal de los precursores neurales de la EGL a expensas de diferenciación astrocitaria

Tras verificar que la sobreexpresión de Helios no induce muerte apoptótica en este ensayo de neuroesferas, estudiamos la relación de la bajada de proliferación con efectos en la diferenciación neural. La salida de ciclo de los progenitores está altamente asociado con la determinación de estirpe neural a la que se diferenciarán (McConnell, 1995; Qian y col., 2000; Temple, 2001). Durante el proceso de neurogénesis en el giro dentado del hipocampo se han descrito la presencia de dos poblaciones de células Nestina positivas dependiendo de su distribución intracelular de este filamento intermedio. La población de Nestina tipo I se caracteriza por presentar largas prolongaciones de estos filamentos intermedios y se relaciona con un estado más temprano durante el proceso de diferenciación (flecha figura 21A). En cambio, las células tipo II presentan una Nestina más concentrada alrededor del núcleo (triángulo, figura 21A) y se relaciona con un estado más tardío en la diferenciación neuronal (Fukuda y col., 2003). Para relacionar la presencia de Helios con el proceso de diferenciación neuronal estudiamos las poblaciones de células Nestina positivas que existían en nuestro cultivo tras 3DIV de diferenciación de las neuroesferas transfectadas.

El recuento muestra que la transfección de Helios favorece la formación de Nestina tipo II disminuyendo la población de Nestina más inmaduras, Nestina tipo I. Estos resultados nos indican que Helios podría estar favoreciendo la diferenciación neuronal durante las primeras etapas (figura 21B).

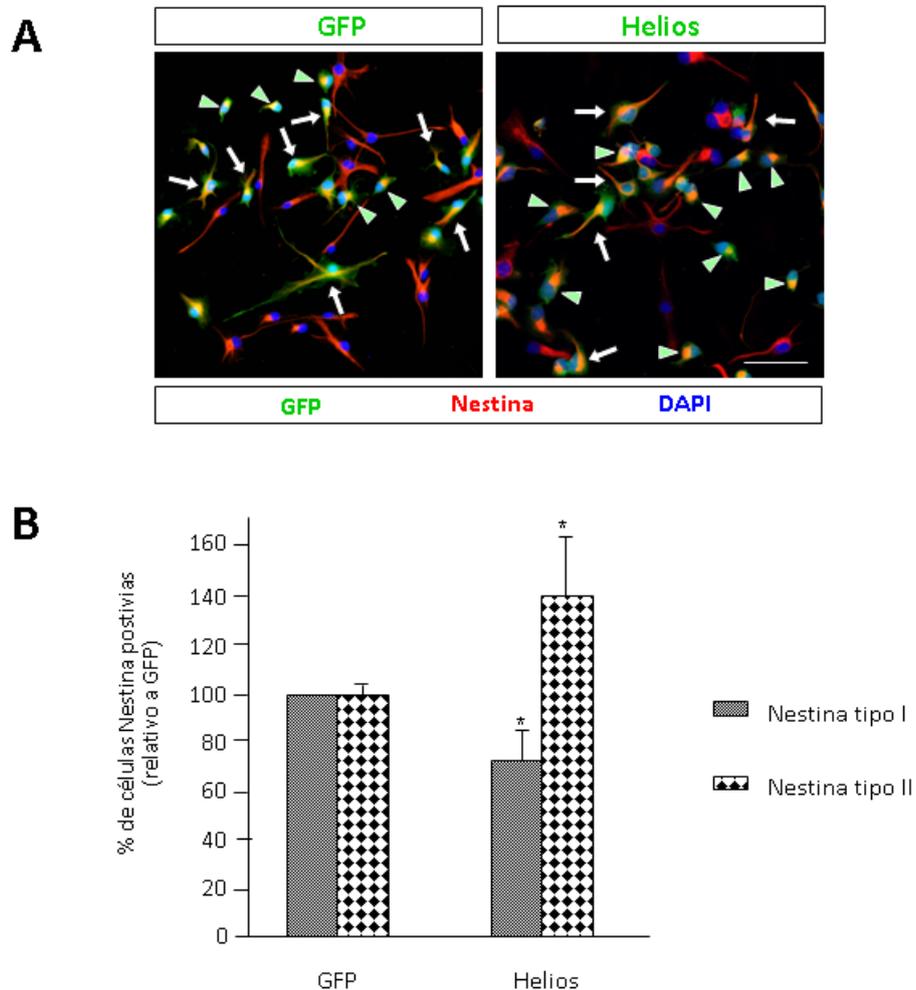


FIGURA 21: La sobreexpresión de Helios altera el patrón de distribución del filamento intermedio Nestina. (A) Fotografía representativa de la inmunocitoquímica de Nestina en neurosféricas sobreexpresadas y diferenciadas durante 3DIV. Las flechas señalan precursores Nestina tipo I y los triángulos precursores Nestina tipo II. Barra de escala = 30 μ m. (B) Cuantificación del número de precursores Nestina tipo I y tipo II en cultivos sobreexpresados con GFP o Helios. La sobreexpresión con Helios presenta un aumento de células Nestina tipo II acompañado con una disminución de las Nestina tipo I. La gráfica representa la media \pm s.e.m. de 4-5 cultivos de neurosféricas expresado como resultados relativos a la transfección control (GFP) considerada ésta como 100%. * $p < 0,05$.

Para terminar de esclarecer la implicación de Helios durante la diferenciación de precursores neurales, examinamos las tres poblaciones neurales tras dejar diferenciar las neurosféricas durante 6 días con el medio apropiado para permitir la diferenciación a

RESULTADOS

cualquier estirpe neural. Tras realizar los recuentos celulares se observa que la sobreexpresión de Helios favorece la diferenciación a la estirpe neuronal, incrementando el número de células β -III-tubulinas positivas (figura 22A y 22D). En cuanto a las poblaciones gliales, astrocitos y oligodendrocitos, se observa que Helios disminuye la población astrocitaria sin afectar la proporción oligodendrocitaria que se obtiene en la diferenciación de este tipo de cultivos (figura 22B, 22C y 22D). Además, cuando se analiza la colocación del marcador astrocitario GFAP con la expresión de Helios se observa que la expresión de ambos marcadores es excluyente. Es decir, ninguna célula sobreexpresada con Helios presenta el marcador GFAP. Con estos resultados, podemos concluir que Helios está induciendo la diferenciación neuronal a expensas de la población astrocitaria en cultivos de precursores neurales.

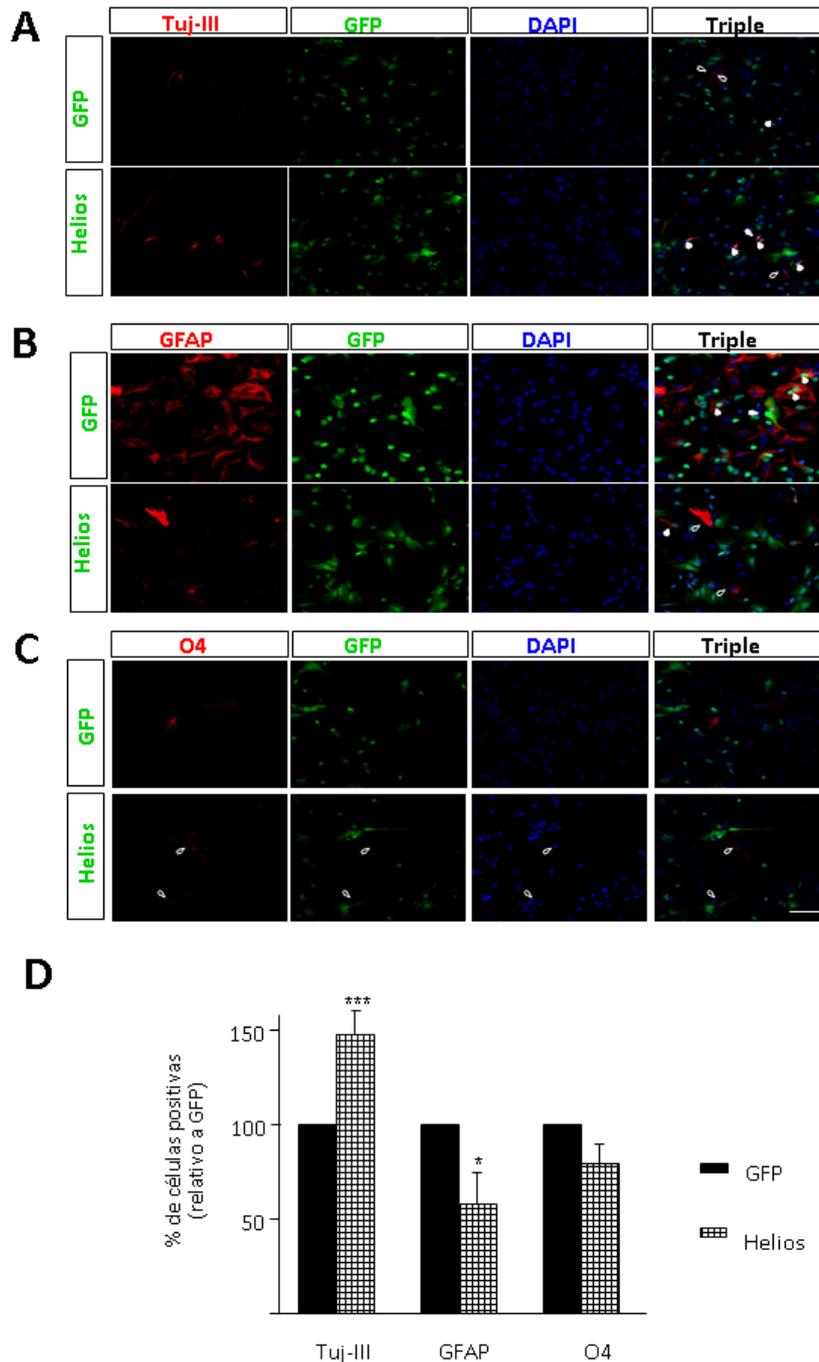


FIGURA 22: Helios induce la diferenciación neuronal de las neuroesferas. (A-C) Fotografías representativas de dobles inmunocitoquímicas de cultivos de neuroesferas sobreexpresadas utilizando GFP y Tuj-III (A), GFAP (B) y O4. (C). Helios colocaliza con el marcador Tuj-III y nunca con GFAP. Las flechas blancas señalan colocalización y las vacías señalan marcaje simple. Barra de escala = 60 μ m. (D) Cuantificación del número de células positivas para Tuj-III, GFAP y O4 en cultivos de neuroesferas transfectadas con Helios respecto al control. Los resultados se expresan como media \pm s.e.m. de 4-5 cultivos relativizado a la transfección GFP, considerando ésta como 100%. El análisis estadístico utilizado es t-student; *p < 0,05; ***p < 0,001.

2.5 – Helios incrementa la población neuronal madura en cultivos primarios estriatales

La implicación de Helios durante la diferenciación neuronal se estudió utilizando los cultivos primarios estriatales debido a la capacidad de este sistema de generar neuronas estriatales maduras. Cuando sobreexpresamos el plásmido de Helios en estos cultivos observamos que la expresión exógena induce un aumento en el número de células β -III-tubulina y una disminución de células Nestina y GFAP positivas (figura 23A). Como este tipo de cultivo nos permite conseguir neuronas que expresen marcadores maduros como calbindina, DARPP-32 y encefalina, quisimos estudiar cómo se modificaban estas tres poblaciones neuronales en presencia de Helios exógeno. Tal y como se puede observar en la representación gráfica de los recuentos celulares, la presencia de Helios provoca un aumento en el número de este tipo de neuronas de proyección (figura 23B, 23C, 23D y 23E).

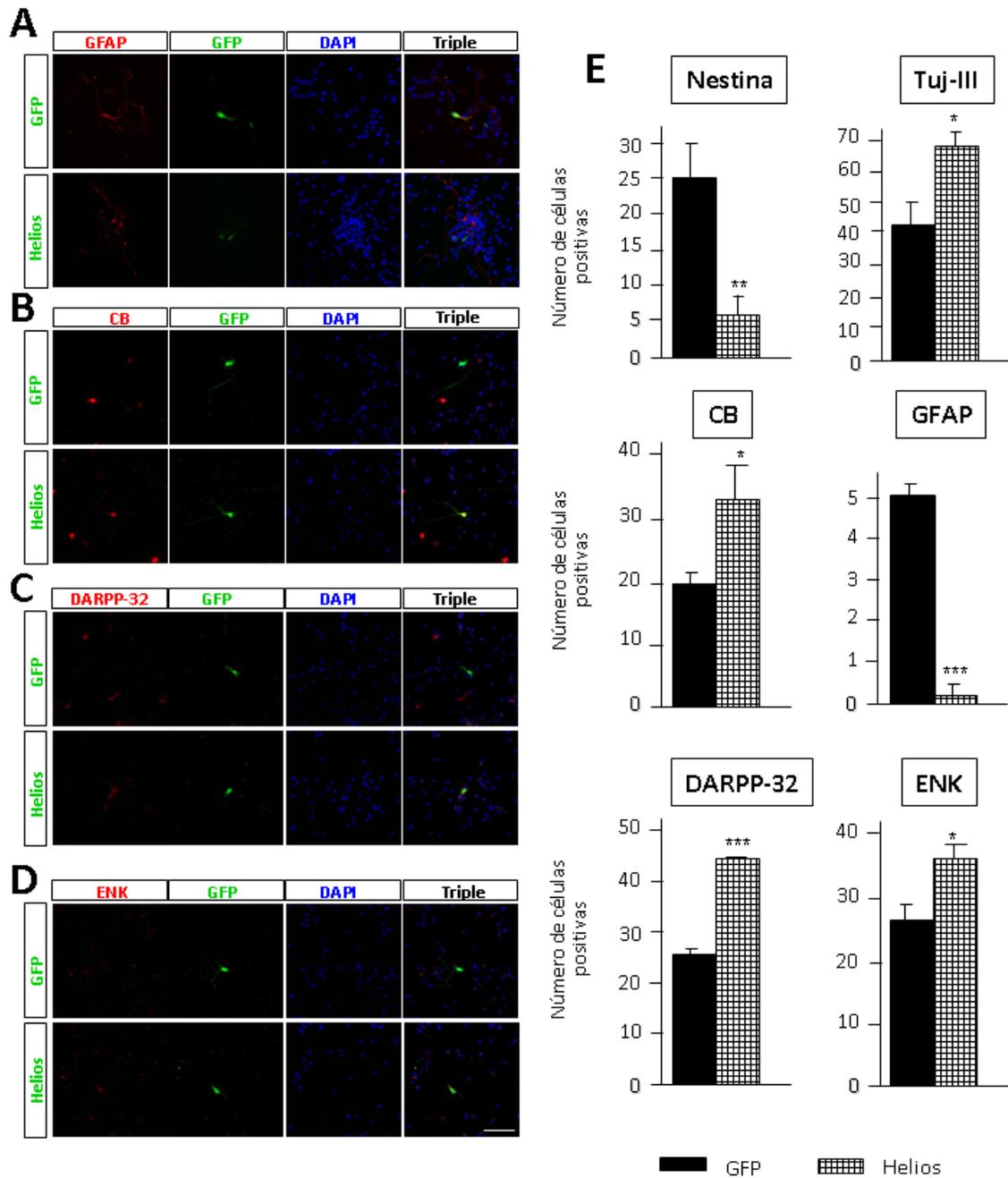


FIGURA 23: Helios induce diferenciación neuronal en cultivos primarios. Cultivos primarios sobreexpresados con Helios o el plásmido control se mantuvieron durante 3DIV y se realizaron estudios de colocalización. Se muestran fotografías representativas de inmunocitoquímicas dobles de los cultivos primarios para GFAP. (A), CB (calbindina; B), DARPP-32 (C) o ENK (encefalina; D) con el marcador GFP. Barra de escala = 60 μ m. (E) Cuantificación del número de células GFP o Helios positivas que colocalizan con los marcadores Nestina, Tuj-III, CB, GFAP, DARPP-32 y ENK. La gráfica muestra el porcentaje de células transfectadas para cada marcador respecto al número total de células transfectadas. Los resultados se representan como media \pm s.e.m. de 4-5 cultivos primarios derivados de la EGL de E14,5. El estudio estadístico realizado es el t-student; * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$.

Así pues, los resultados hasta ahora presentados muestran que la presencia exógena del factor de transcripción Helios promueve una diferenciación hacia la estirpe neuronal en estos sistemas *in vitro* que simulan la diferenciación de la EGL.

3 - EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN IKAROS SE EXPRESA EN LAS CÉLULAS POSTMITÓTICAS DE LA ZM DE LA EGL

Otro de los miembros de la familia de Ikaros, miembro fundador de esta familia, es la proteína Ikaros. Poco se conoce sobre la implicación de Ikaros durante el desarrollo del SNC. Ikaros, además de controlar el desarrollo linfocitario (Georgopoulos y col., 1997), controla el desarrollo del sistema neuroendocrino (Ezzat y Asa, 2008) y el desarrollo embrionario de la retina (Elliott y col., 2008). Como se ha comentado anteriormente, Ikaros activa directamente al promotor de la proteína encefalina (Dobi y col., 1997). Además, unos estudios publicados durante el desarrollo de la presente tesis demostraban que Ikaros estaba implicado en el desarrollo de las neuronas encefalinérgicas provenientes de la EGL (Agoston y col., 2007; Kiehl y col., 2008; Long y col., 2009). Con todo esto, quisimos estudiar más detalladamente la implicación de Ikaros en el desarrollo embrionario del estriado.

3.1 – La expresión de Ikaros se limita a la ZM de la EGL durante las etapas embrionarias

El estudio de expresión de Ikaros durante el desarrollo del estriado se estudió realizando hibridaciones *in situ* durante las diferentes etapas del desarrollo. La sonda utilizada para tal efecto fue una sonda ARNm que reconoce todas las isoformas resultado del procesamiento transcripcional del gen de Ikaros. Así pues, se observa que Ikaros está expresado exclusivamente en la ZM de la EGL desde la edad E14,5 hasta P3 presentando un pico de expresión a E18,5 (figura 24A). El ARNm de Ikaros muestra un gradiente de expresión desde la posición dorsomedial a ventrolateral, siendo la zona límite entre la ZSV y la ZM la que más expresión de Ikaros presenta (figura 24B). Para conocer si la zona de expresión de Ikaros coincidía con la zona de proliferación de la EGL, se realizó un estudio de incorporación de BrdU en animales a E14,5 y se estudió la relación entre ambos marcadores. A esta edad es cuando más células proliferantes presenta la zona germinativa de la EGL y la primera edad donde aparece la expresión de Ikaros. Como se observa en la inmunohistoquímica, la zona más marcada con BrdU corresponde a ZSV. El área más ventral que no presenta

tinción de BrdU corresponde a la ZM. Relacionando la expresión de Ikaros con la de BrdU se observa que Ikaros está presente en la ZM donde las células han salido del ciclo celular y comienzan el proceso de diferenciación. En cambio, su expresión es totalmente ausente en la zona de precursores mitóticamente activos, ZV y ZSV (figura 24C). Esta distribución proteica nos permite postular que Ikaros puede estar involucrado en la diferenciación de los precursores neurales que habitan la ZV y la ZSV.

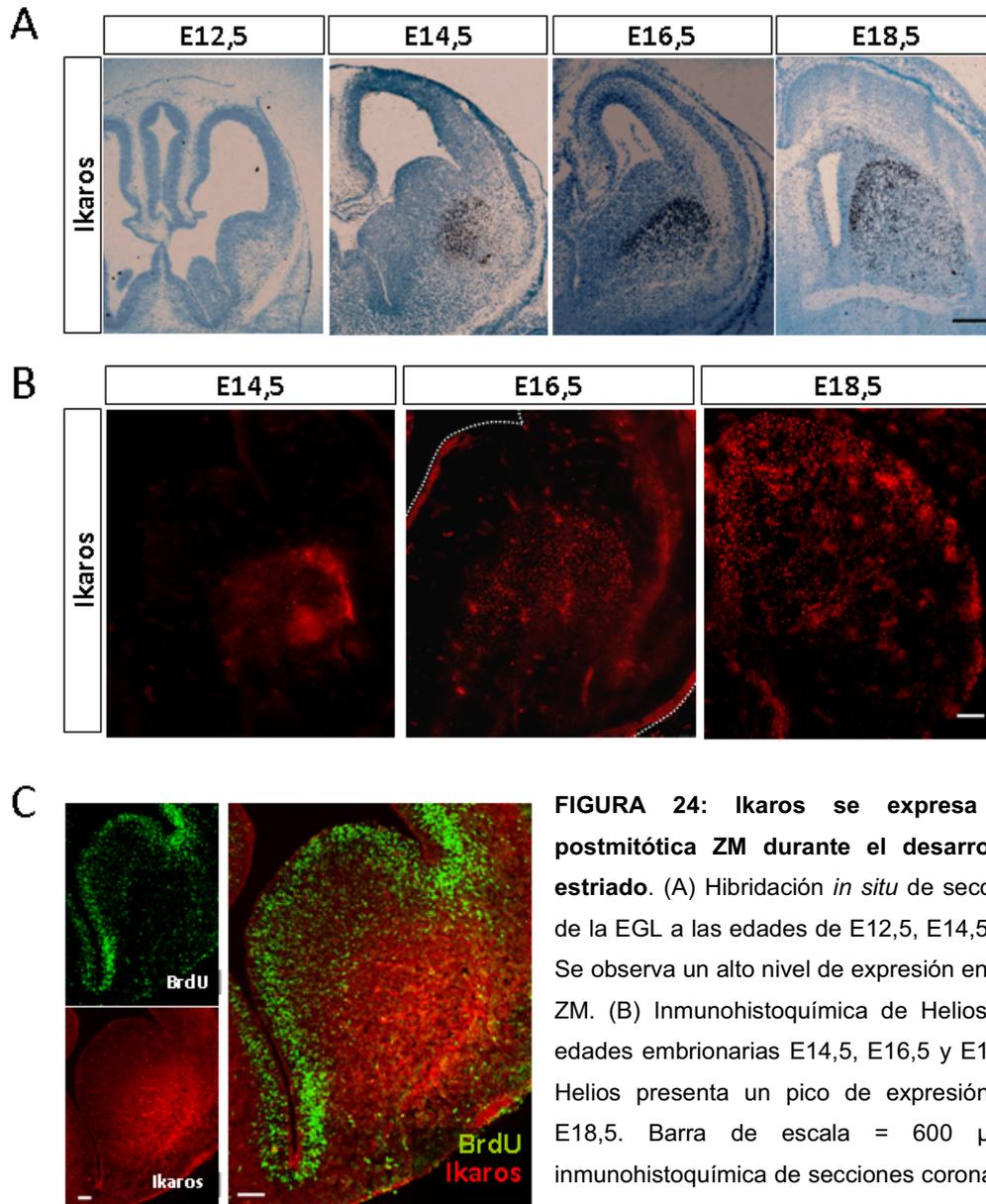


FIGURA 24: Ikaros se expresa en la zona postmitótica ZM durante el desarrollo del núcleo estriado. (A) Hibridación *in situ* de secciones coronales de la EGL a las edades de E12,5, E14,5, E16,5 y E18,5. Se observa un alto nivel de expresión entre la zona ZSV-ZM. (B) Inmunohistoquímica de Helios en animales a edades embrionarias E14,5, E16,5 y E18,5. La proteína Helios presenta un pico de expresión a la edad de E18,5. Barra de escala = 600 μ m. (C) Doble inmunohistoquímica de secciones coronales de animales a E14,5 para BrdU e Ikaros. Los animales fueron inyectados con BrdU durante 30 minutos. BrdU delimita la zona proliferante de la ZSV mientras que Helios se expresa únicamente en la ZM. Barra de escala = 150 μ m.

3.2 – Ikaros se expresa en la estirpe neuronal durante el desarrollo estriatal

La expresión delimitada de Ikaros en la ZM revela que la presencia de esta proteína se encuentra restringida a células neurales postmitóticas. Con tal de estudiar la relación de Ikaros con otros marcadores de células postmitóticas, analizamos la colocalización de Ikaros en cultivos primarios de la EGL de E14,5. Como se observa en las inmunocitoquímicas, Ikaros no se expresa en precursores Nestina positivos o astrocitos GFAP. En cambio, la expresión de Ikaros se limita a los precursores β -III-tubulina presentes en el cultivo primario (figura 25A, 25B y 25C).

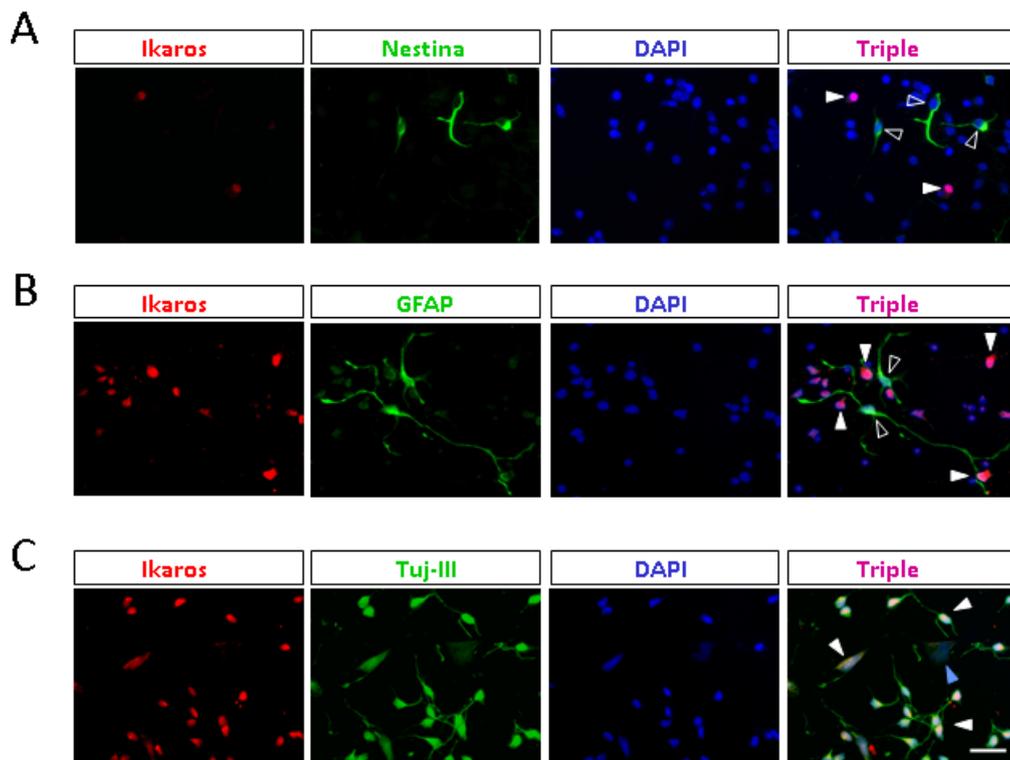


FIGURA 25: Ikaros se expresa en neuronas postmitóticas inmaduras en cultivos primarios de la EGL de E14,5. Dobles inmunocitoquímicas de cultivos primarios diferenciados durante 5DIV. Ikaros no colocaliza ni con el marcador de precursores neurales Nestina (A) ni GFAP (B). Las células Ikaros positivas expresan el marcador neuronal Tuj-III. Las flechas blancas indican células Ikaros positivas y las flechas vacías muestran células negativas para Ikaros. Barra de escala = 30 μ m.

La localización de la expresión de Ikaros, en la zona limítrofe entre la ZSV y la ZM, y el estudio de colocalización de este factor de transcripción con marcadores neuronales, nos sugiere que Ikaros podría estar ejerciendo un papel en los primeros estadios del paso de precursores proliferantes a células neuronales diferenciadas que residen en la ZM.

4 – IKAROS PROMUEVE LA SALIDA DE CICLO CELULAR DE LOS PROGENITORES NEURALES

Para estudiar la implicación de Ikaros en la salida de ciclo de los precursores neurales de la EGL utilizamos el ensayo de neuroesferas derivadas de la misma estructura. Cuando analizamos la expresión de este factor de transcripción en los diferentes estados que presentan las neuroesferas, observamos que la expresión de ARNm de Ikaros es prácticamente ausente en el estado proliferante. La expresión aumenta considerablemente cuando los precursores se los deja diferenciar durante 6DIV (figura 26). Ikaros se expresa básicamente en células de las neuroesferas diferenciadas, resultado que correlaciona con los resultados de expresión de la proteína en la EGL del ratón.

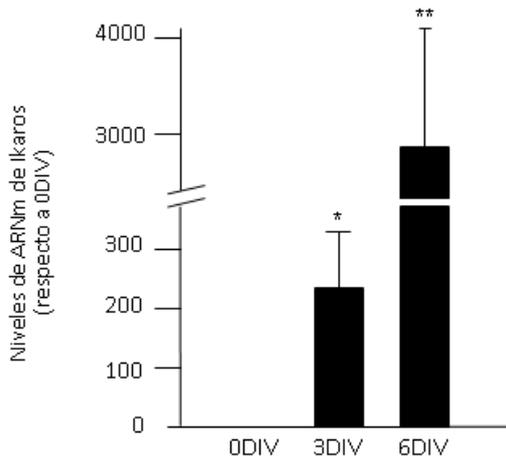


FIGURA 26: La expresión del ARNm de Ikaros aumenta en condiciones de diferenciación.

Análisis de los niveles del ARNm de Ikaros mediante RT-PCR en estado proliferante (0DIV) y de diferenciación (3DIV y 6DIV). Los resultados se representan como la media \pm s.e.m. de 4-5 cultivos de neuroesferas y se representan como el porcentaje de ARNm de Ikaros respecto al estado proliferante (0DIV). Para el análisis estadístico se ha utilizado el test t-student; *p < 0,05; **p < 0,005.

4.1 – Ikaros induce una disminución de la tasa de proliferación actuando a nivel del inhibidor de ciclinas p21^{Cip/Waf1}

La implicación de este factor de transcripción en la proliferación de los precursores neurales lo estudiamos sobreexpresando Ikaros en las neuroesferas tal y como realizamos con el estudio de Helios. Tras la sobreexpresión de Ikaros, analizamos la relación de este factor de transcripción con la presencia de células que se encontraban en la fase S del ciclo celular, es decir, que habían incorporado BrdU. La inmunocitoquímica muestra que ninguna célula transfectada con Ikaros se encuentra en la fase S (figura 27A). Tras esta observación, estudiamos cómo se modificaba la tasa de proliferación de las neuroesferas (medida por la incorporación de BrdU) tras la sobreexpresión de los plásmidos Ikaros y control. La presencia exógena de este factor

de transcripción disminuye la tasa de incorporación de BrdU en las neurosféricas (figura 27B). Para verificar estos resultados, utilizamos las neurosféricas procedente de animales $Ik^{-/-}$ y estudiamos la tasa de proliferación en estas células. En las células procedentes de animales $Ik^{-/-}$ se observó un aumento en la tasa de proliferación respecto las células derivadas de un animal Wt (figura 27C). Así pues, Ikaros está implicado en el control de la salida de ciclo celular de los precursores neurales.

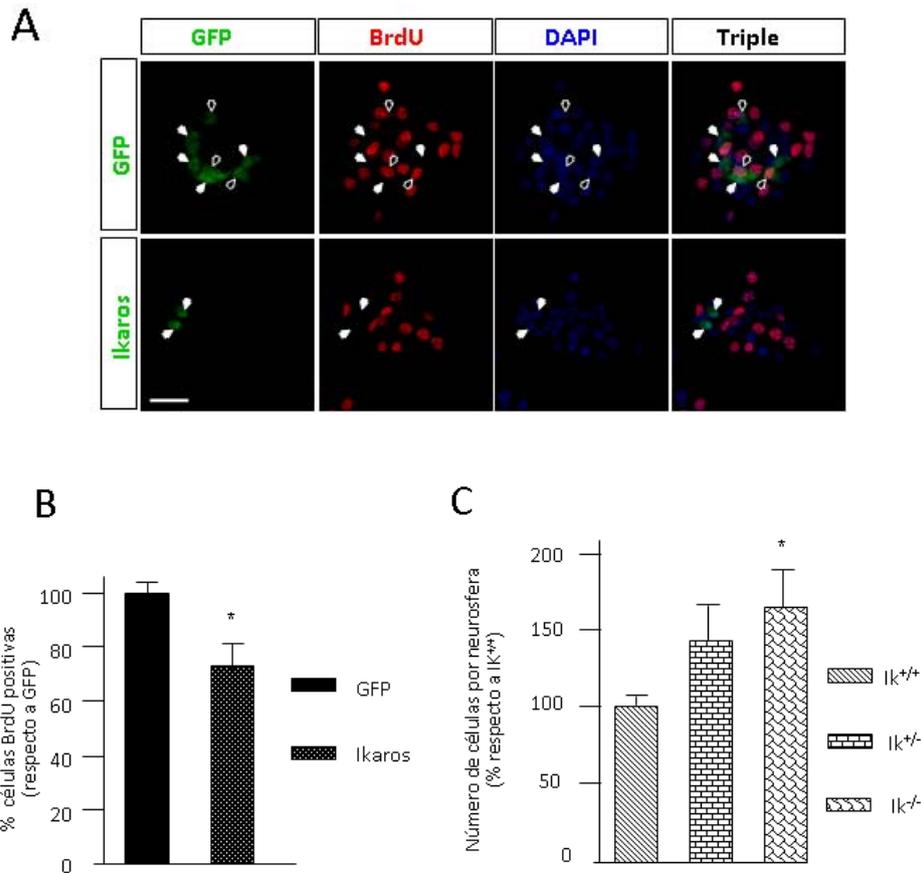


FIGURA 27: Ikaros induce la salida de ciclo de los precursores de la EGL. Estudios de proliferación en cultivos de neurosféricas. (A) Fotografía representativa de la doble inmunocitoquímica de neurosféricas transfectadas con GFP o Helios. No existe colocalización entre Ikaros y BrdU. Las flechas vacías representan células con doble tinción BrdU-GFP y las flechas blancas representan células negativas para BrdU. Barra de escala = 50 μ m. (B) Cuantificación de células BrdU positivas en cultivos de neurosféricas transfectadas con GFP o con Ikaros. Los resultados representan el porcentaje de células BrdU positivas respecto a las células totales por neurosfera y relativizados a la transfección con GFP considerando ésta como el 100%. (C) Cuantificación de la tasa de proliferación de neurosféricas obtenidas de la EGL de E14,5 de animales salvajes ($Ik^{+/+}$), heterocigotos ($Ik^{+/-}$) y deficientes de Ikaros ($Ik^{-/-}$). Las gráficas representan el número de células por neurosféricas formadas y están relativizados a los animales $Ik^{+/+}$ como 100%.

Los sistemas más importante en el control proliferativo de los precursores neurales son, por una parte la vía de Notch y, por otra, el control de proteínas inhibitoras de ciclo celular. En el sistema hematopoyético, Ikaros regula la proliferación de los precursores a nivel de ambas vías de señalización (Gómez-Arco y col., 2004; Bellavia y col., 2007). Para estudiar el mecanismo de acción de control de ciclo celular por parte de Ikaros, se estudió el estado de los niveles de los componentes de la vía de Notch y de los inhibidores de ciclinas $p21^{Cip/Waf1}$ y $p27^{Kip}$ tras la transfección de Ikaros en las neurosféricas en estado proliferante. Cuando se analiza los niveles de expresión génica de diversos miembros de la vía de Notch se observa que la sobreexpresión de Ikaros no produce variación de ningún componente (figura 28A). Así pues, a diferencia del sistema hematopoyético, en el SNC Ikaros parece no actuar regulando el ciclo celular a través de los miembros de la vía de señalización de Notch.

A continuación se estudió si el control sobre ciclo celular estaba mediado por alguna proteína inhibidora de ciclo celular. El análisis de estas proteínas en neurosféricas transfectadas con Ikaros revela que existe un aumento de los niveles de la proteína inhibidora de ciclo celular $p21^{Cip/Waf1}$. En cambio, la presencia exógena de Ikaros no varía los niveles del otro regulador de ciclo como es $p27^{Kip1}$ (figura 28B). Esto nos hizo postular que Ikaros induce la salida del ciclo celular a través de la regulación positiva de los niveles proteicos de $p21^{Cip/Waf1}$. Con la finalidad de verificar esta hipótesis, neurosféricas obtenidas de animales deficientes de $p21^{Cip/Waf1}$ se transfectaron con el plásmido Ikaros y se estudió la tasa de incorporación de BrdU. Como se puede observar, el efecto de disminución de la tasa de incorporación de BrdU que ejerce la sobreexpresión de Ikaros desaparece en las neurosféricas deficientes de $p21^{Cip/Waf1}$ (figura 28C). Este resultado nos confirma que el control de la proteína inhibidora de ciclo $p21^{Cip/Waf1}$ es uno de los mecanismos de acción de Ikaros en la inducción de la salida de ciclo celular.

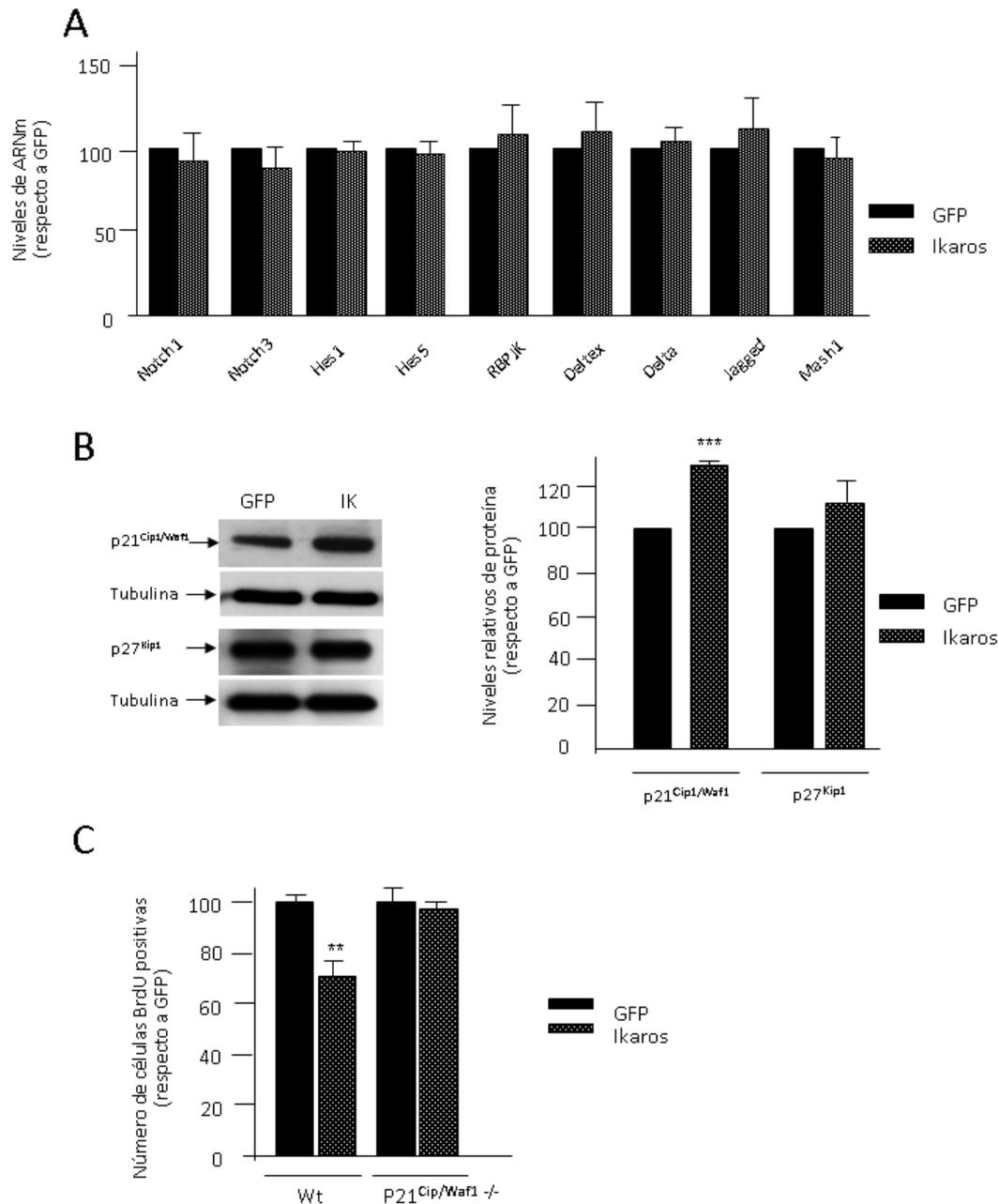


FIGURA 28: Ikaros induce la salida de ciclo de las neuroesferas a través de la proteína p21^{Cip/Waf1}. (A) Niveles de ARNm medidos por RT-PCR de las proteínas involucradas en la vía de señalización de la vía Notch tras la sobreexpresión de las neuroesferas con Ikaros o con GFP. Los resultados muestran la media \pm s.e.m. de 3-4 cultivos transfectados. (B) Western Blot para estudiar las proteínas p21^{Cip/Waf1} y p27^{Kip1} en neuroesferas transfectadas con Ikaros y con GFP. Las gráficas muestran los niveles proteicos relativos respecto a GFP, considerando éste como 100%. Se observa un aumento de p21^{Cip/Waf1} pero no de p27^{Kip1}. (C) Neuroesferas de animales deficientes para p21^{Cip/Waf1} (p21^{Cip/Waf1} -/-) se transfectaron con Ikaros o GFP. Se observa una reducción en la tasa de incorporación de BrdU en las neuroesferas de animales Wt pero no en p21^{Cip/Waf1} -/-. Los resultados muestran el porcentaje de células BrdU positivas respecto al número de células por neuroesferas. Se relativiza a GFP, considerando éste como 100%. El análisis estadístico utilizado es el t-student; **p < 0,01; ***p < 0,005.

4.2 – La disminución de la tasa de incorporación de BrdU viene acompañado por un aumento de diferenciación neuronal

Para estudiar el efecto de Ikaros durante el proceso de diferenciación, analizamos la colocalización de la proteína Ikaros expresada de manera exógena en el ensayo de neuroesferas en condiciones de diferenciación. Tal y como realizamos con el estudio de Helios, quisimos estudiar si la sobreexpresión de Ikaros afectaba el proceso de diferenciación. En primer lugar analizamos si las células sobreexpresadas con Ikaros presentaban marcadores neuronales tales como β -III-tubulina. La inmunocitoquímica muestra que todas las células transfectadas con Ikaros colocalizan con el marcador neuronal temprano β -III-tubulina. En cambio, las células que expresan GFP colocalizan mayoritariamente con el marcador neural Nestina (figura 29A) en las células de las neuroesferas diferenciadas durante 6DIV. Además, la sobreexpresión de Ikaros afecta negativamente la expresión del ARNm de GFAP, es decir, se reduce la transcripción de este marcador astrocitario (figura 29B). Con estos resultados podemos concluir que a nivel de precursores, Ikaros se expresaría en células que han abandonado el ciclo celular y empezaría a diferenciarse hacia fenotipos neuronales.

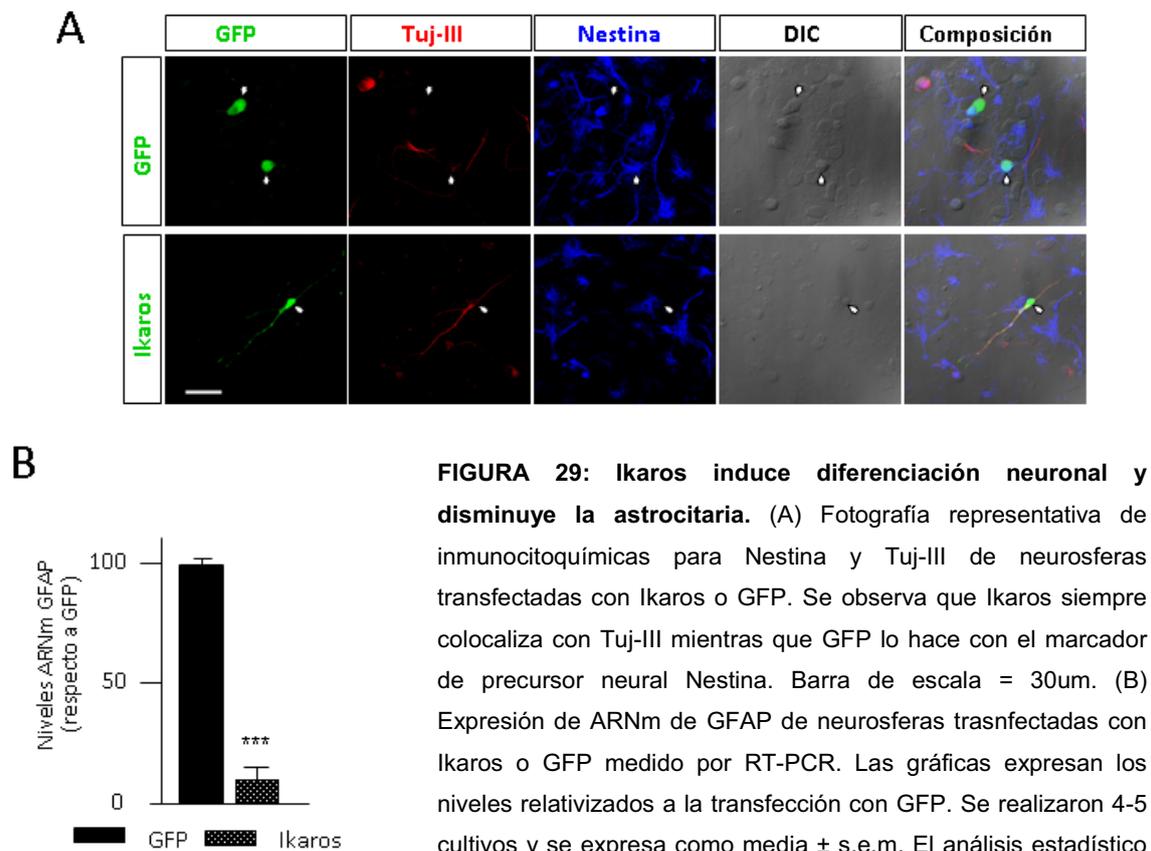


FIGURA 29: Ikaros induce diferenciación neuronal y disminuye la astrocitaria. (A) Fotografía representativa de inmunocitoquímicas para Nestina y Tuj-III de neuroesferas transfectadas con Ikaros o GFP. Se observa que Ikaros siempre colocaliza con Tuj-III mientras que GFP lo hace con el marcador de precursor neural Nestina. Barra de escala = 30um. (B) Expresión de ARNm de GFAP de neuroesferas transfectadas con Ikaros o GFP medido por RT-PCR. Las gráficas expresan los niveles relativizados a la transfección con GFP. Se realizaron 4-5 cultivos y se expresa como media \pm s.e.m. El análisis estadístico realizado es el t-student; ***p < 0,0001.

Tras observar estos resultados sobre la diferenciación de los progenitores hacia fenotipos neuronales, nos planteamos estudiar el efecto de la sobreexpresión de Ikaros en las células postmitóticas utilizando los cultivos primarios. Como ocurre en el sistema de neuroesferas, las células de los cultivos primarios transfectadas con Ikaros presentan mayor colocación con marcadores neuronales como β -III-tubulina y una menor coexpresión con marcadores de precursores neurales como Nestina, tal como demuestran los recuentos celulares (figura 30A). Además, cuando se estudia el efecto la sobreexpresión de Ikaros en las poblaciones neuronales maduras como las encefalinérgicas o las calbindinas positivas, los recuentos celulares demuestran que la presencia de Ikaros aumenta estas dos poblaciones neuronales (figura 30B).

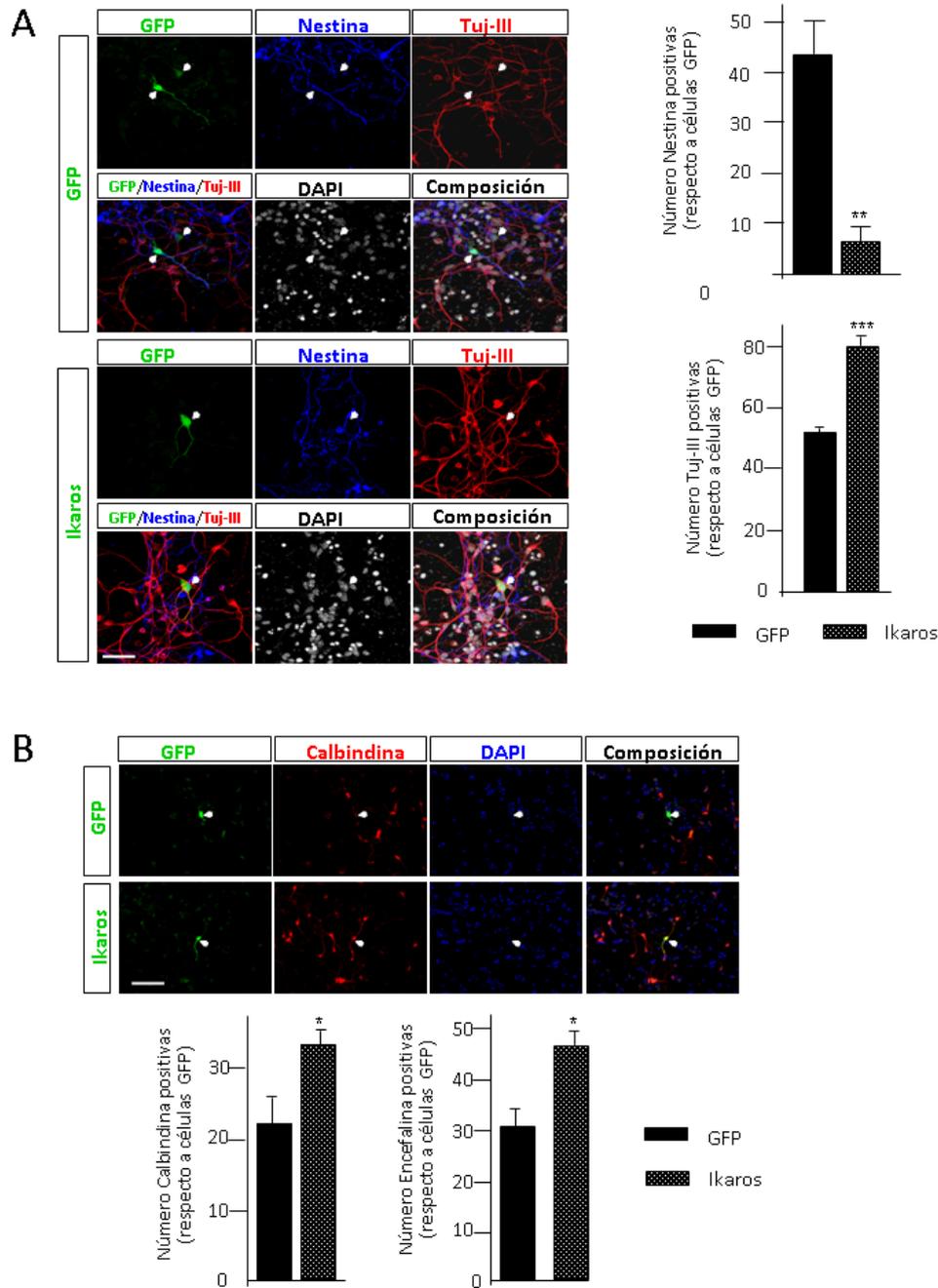


FIGURA 30: Ikaros induce una diferenciación neuronal hacia fenotipos maduros en cultivos primarios estriatales. Cultivos primarios de la EGL a E14,5 se transfectaron con Ikaros y GFP. (A) Fotografía representativa de inmunocitoquímica para GFP/Nestina/Tuj-III y recuentos celulares. Las células Ikaros colocalizan principalmente con el marcador neuronal Tuj-III y no con el marcador neural Nestina. (B) Fotografía representativa de inmunocitoquímica para calbindina–GFP. Las células Ikaros positivas colocalizan con marcadores de neuronas maduras como calbindina y encefalina. Las flechas blancas señalan células con doble tinción para GFP y para el marcador determinado. Las gráficas representan el número de células positivas para cada marcador respecto las células transfectadas. Se representa la media \pm s.e.m. de 4-5 cultivos primarios. El análisis estadístico realizado es t-student; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,005. Barra de escala = 50 μ m.

5 – IKAROS ES NECESARIO PARA LA CORRECTA DIFERENCIACIÓN NEURONAL

Los experimentos realizados *in vitro* en el ensayo de neuroesferas y cultivos primarios demuestran que Ikaros presenta un papel importante en la neurogénesis del estriado. Para corroborar estos resultados *in vivo*, caracterizamos el estriado de los animales $Ik^{-/-}$. Cabe indicar que estos animales presentan alteraciones en la hormona de crecimiento y apariciones de linfomas (Wang y col., 1996; Ezzat y col., 2006). En primer lugar analizamos los volúmenes tanto de la ZM como de la ZSV y del BO en animales $Ik^{-/-}$ a E18,5. Debido a las alteraciones que afectan a la hormona de crecimiento, y consecuentemente al crecimiento postnatal, los volúmenes se relativizaron al volumen total del cerebro para evitar variaciones debidas únicamente al cambio de tamaño. La falta de Ikaros produce una reducción significativa en el volumen de la ZM tal como se puede observar en las cuantificaciones de volúmenes. Este cambio viene acompañado por un aumento en el volumen de la zona germinal (la ZV y la ZSV) mientras que el BO, estructura derivada de la EGL dorsal, no muestra diferencias entre los dos genotipos (figura 31). Así pues, la ausencia de Ikaros durante el desarrollo embrionario de la EGL provoca una disminución del volumen de la ZM acompañado por un aumento del volumen de la zona germinal.

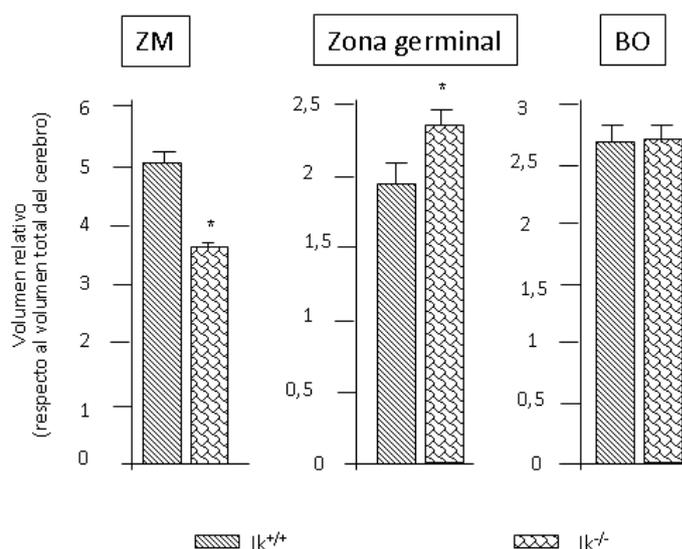


FIGURA 31: Animales deficientes de Ikaros ($Ik^{-/-}$) presentan un volumen de estriado reducido acompañado de un aumento de la ZSV. Volumen relativo de la ZM, zona germinal (ZV y ZSV) y del BO de los animales Wt y $Ik^{-/-}$ a E18,5. Los resultados están expresados como el volumen relativo de cada área respecto el volumen total del encéfalo. Las gráficas representan la media \pm s.e.m. de 4-6 animales. El análisis estadístico utilizado es t-student; * $p < 0,05$.

5.1 – La ausencia de Ikaros afecta principalmente las neuronas nacidas durante la segunda oleada de neurogénesis

Con la finalidad de estudiar a qué era debida la reducción del volumen en animales $Ik^{-/-}$, procedimos a realizar estudios de nacimiento de precursores neurales a diferentes edades embrionarias con la finalidad de estudiar el patrón de génesis de las estirpes neurales. Estos experimentos se basan en la administración del análogo de timidina, BrdU, a diferentes edades embrionarias (E12,5, E14,5 y E16,5) y posterior análisis a E18,5 (esquema en material y métodos). Los precursores que estén proliferando en el momento de la administración incorporarán el análogo en su ADN. Si continúan proliferando, el análogo se diluirá y no se podrán detectar estas células por inmunohistoquímica. En cambio, todas aquellas células que abandonen el ciclo poco tiempo después de la administración de BrdU, retendrán el análogo y podrán ser detectados por inmunohistoquímica. Así, podemos determinar el número de células postmitóticas generadas a cada edad en la que se administra el análogo de timidina. El número de células BrdU positivas resultantes de cada edad de inyección se cuantificaron delimitando las dos áreas de la EGL: la zona germinativa y la ZM. El análisis del número de células que abandonan el ciclo celular a E12,5 y E16,5 no muestra ninguna diferencia significativa en el genotipo $Ik^{-/-}$ en ninguna de las dos edades analizadas. En cambio, el número de células postmitóticas que se generan en E14,5, correspondiente a la segunda oleada de neurogénesis (Mason y col., 2005) y que se localizan en la ZM, son menores en los animales $Ik^{-/-}$. En la zona germinal también se observa una tendencia a la disminución neuronal a pesar que no es significativa (figura 32). Estos resultados de génesis de células postmitóticas demuestran que la falta de Ikaros afecta específicamente a la segunda oleada de neurogénesis estriatal.

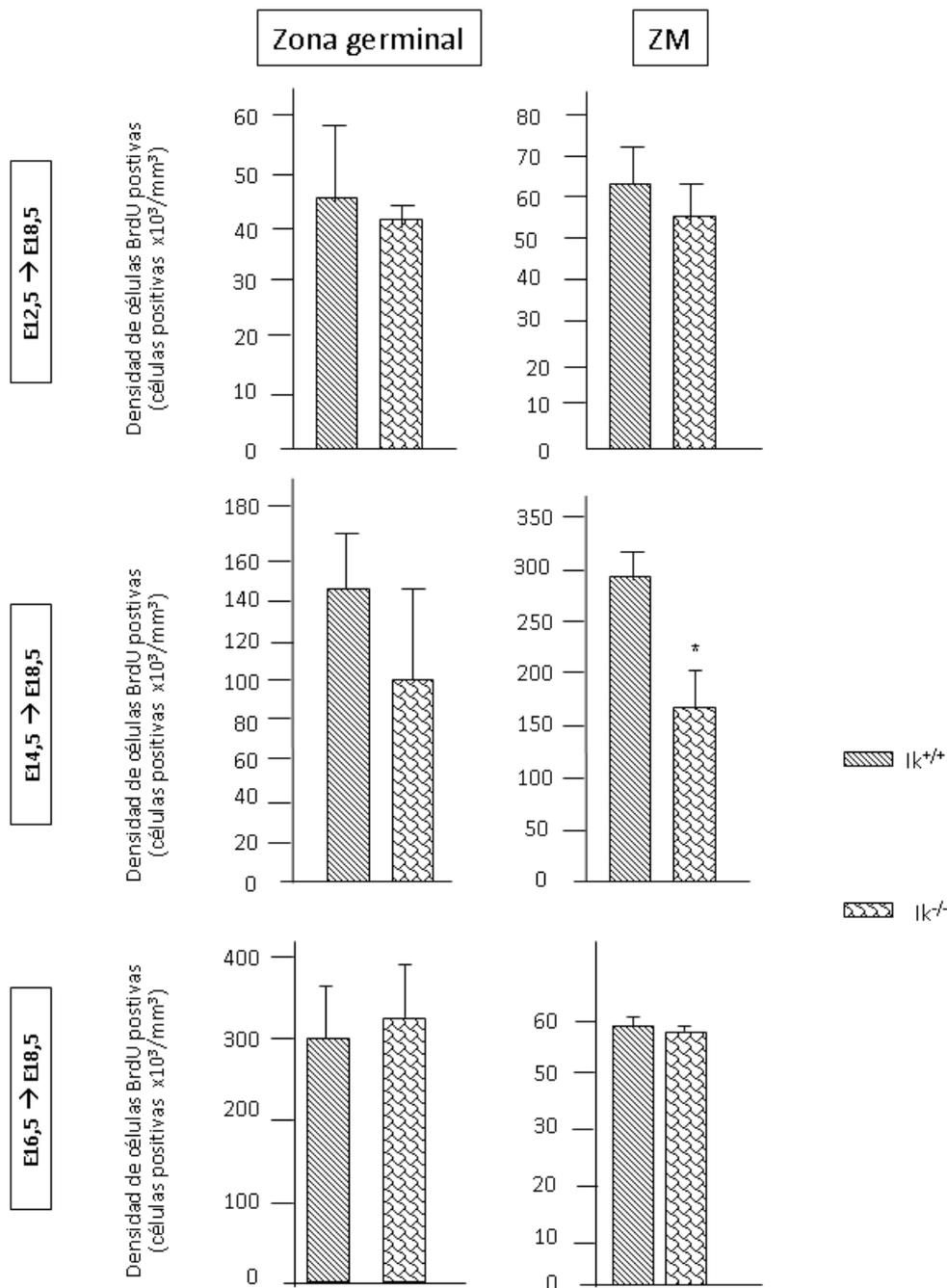


FIGURA 32: *Ik* es crítico para la generación de la segunda oleada de neurogénesis estriatal. Estudios de proliferación con pulsos largo de BrdU. Animales gestantes *Ik*^{+/+} fueron inyectados con BrdU a las edades E12,5, E14,5 y E16,5 y se analizaron los embriones *Ik*^{-/-} a E18,5. Los animales *Ik*^{-/-} muestran un reducción de células postmitóticas generadas en la ZM a E14,5. Los resultados son expresados como media ± s.e.m. de recuentos de 3-4 embriones. El análisis estadístico utilizado es el t-student; *p < 0,05.

Esta reducción en el número de células generadas en E14,5 puede ser debida a dos acontecimientos: que la ausencia de Ikaros provoque un aumento de células en proliferación que no puedan abandonar el ciclo celular o bien que la ausencia de la proteína provoque un aumento de la muerte celular. Para abordar la primera hipótesis estudiamos cómo estaba la tasa de proliferación de los progenitores de los animales $Ik^{-/-}$. Para tal efecto, administramos BrdU a ratones gestantes en el día 14 de embarazo y tras 30 minutos de tratamiento se extrajeron los embriones para su análisis posterior. De esta manera, podemos visualizar las células que están proliferando en la edad de la administración de BrdU. Los animales $Ik^{-/-}$ presentan un mayor número de las células proliferantes en la ZV y la ZSV respecto al animal Wt (figura 33A). Así pues, la ausencia de Ikaros provoca que los progenitores que deberían abandonar el ciclo celular a E14,5 no abandonen el ciclo y se queden en estado proliferante en la ZSV. La disminución de células postmitóticas a E14,5 podría también estar ocasionada por un aumento en la muerte celular de los progenitores a esta edad. Para estudiar esta hipótesis, realizamos un experimento de detección de muerte apoptótica, TUNEL, en encéfalos de animales E18,5, cuando el proceso neurogénico ha terminado. Como se observa en la inmunohistoquímica, no se observan diferencias en la muerte celular del estriado de los animales $Ik^{+/+}$ y los $Ik^{-/-}$ (figura 33B). Agrupando los resultados obtenidos en estos experimentos de análisis de nacimiento de las células post mitótica podríamos concluir que la ausencia de Ikaros impide que los progenitores localizados en la ZSV no puedan abandonar el ciclo celular. De esta manera, se genera un aumento de progenitores en la ZSV, y, consecuentemente, una reducción de las células postmitóticas generadas a la edad de E14,5 que corresponden a células originadas en la segunda oleada de neurogénesis.

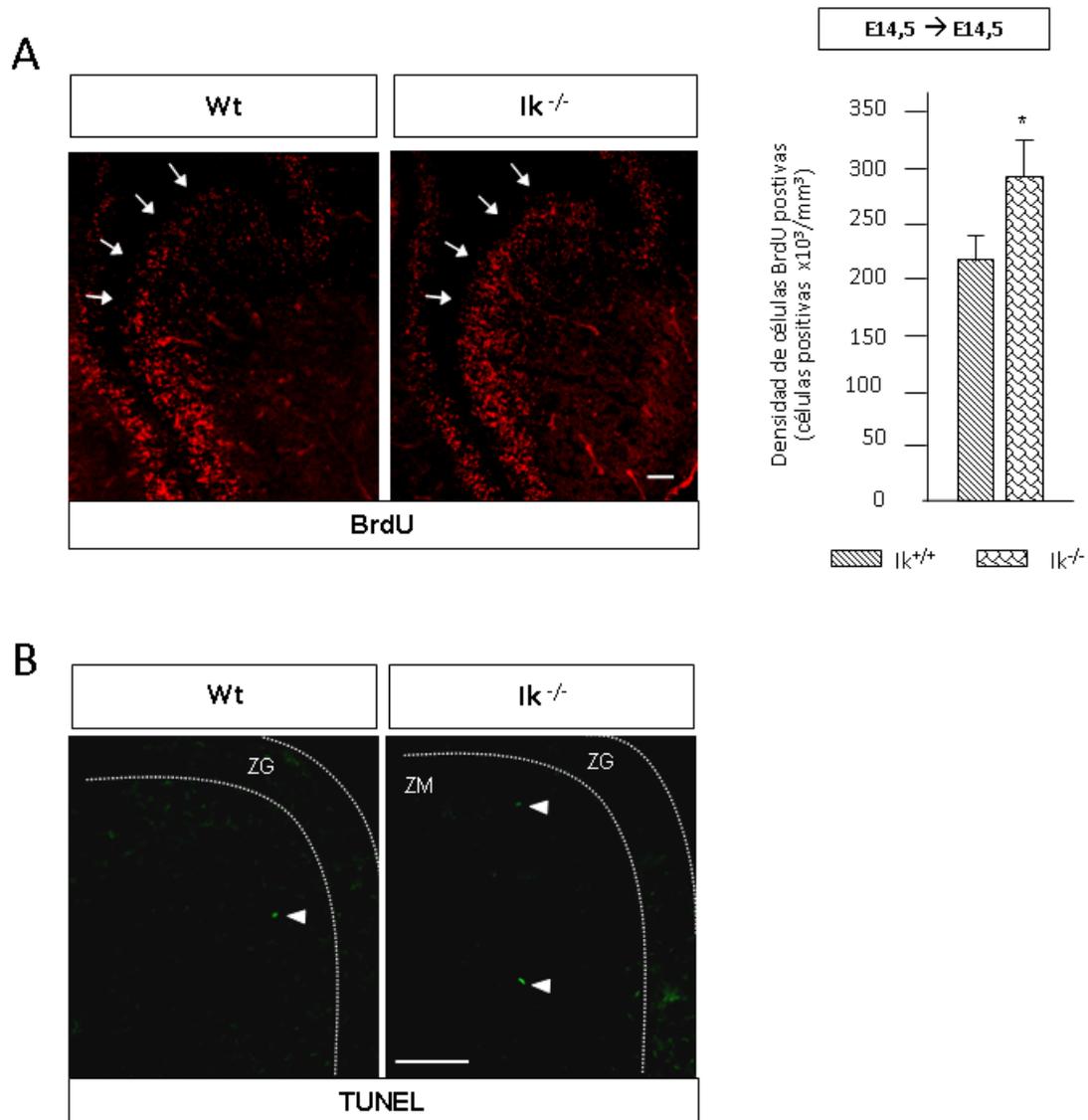


FIGURA 33: La ausencia de Ikaros provoca un aumento de los precursores proliferantes. (A) Animales gestantes *Ik^{+/+}* fueron inyectados con BrdU y los embriones *Ik^{-/-}* se analizaron 30 minutos tras la administración. Fotografía representativa de la inmunohistoquímica contra BrdU en una sección coronal de EGL de animales Wt y *Ik^{-/-}*. Las flechas indican las células proliferantes en la ZSV. El recuento de células positivas para BrdU en la ZSV demuestran un incremento de esta densidad celular en animales *Ik^{-/-}*. Las gráficas representan la media de 4-5 animales analizados y las barras de error la s.e.m. El análisis estadístico utilizado es el t-student; *p < 0,05. (B) Análisis de muerte celular mediante TUNEL en EGL de animales *Ik^{-/-}* a E18,5. Las flechas indican células TUNEL positivas en la ZM pero no en la zona germinal (ZG). No existen diferencias entre ambos genotipos. Barra de escala = 150 μ m.

5.2 – La ausencia de Ikaros afecta selectivamente la población encefalinérgica del núcleo estriado en ratones adultos

Las alteraciones ocurridas durante el desarrollo embrionario del estriado podrían repercutir en la génesis del estriado adulto. Como Ikaros está implicado en el proceso de diferenciación de las neuronas generadas a E14,5 y activa el promotor del gen de encefalina (Dobi y col., 1997), nos planteamos estudiar cómo se encuentra esta población en el encéfalo adulto del animal $Ik^{-/-}$. Al caracterizar por estereología el encéfalo, observamos que el volumen del hemisferio de los animales deficientes $Ik^{-/-}$ es menor comparado a su control (figura 34A). Posteriormente pasamos a caracterizar el volumen del núcleo estriado en estos animales. Como era de esperar por los resultados obtenidos del análisis durante las edades embrionarias, se observa una reducción específica del núcleo estriado (figura 34A). Esta reducción podría estar ocasionada por una reducción en el número de neuronas, así que para verificarlo pasamos a estudiar la densidad neuronal. En primer lugar observamos que utilizando el marcador neuronal maduro NeuN no encontramos diferencias entre los animales $Ik^{-/-}$ y sus controles. Cuando se analizan las diferentes poblaciones neuronales que forman el estriado adulto, se observa que existe una reducción de neuronas de proyección positivas para calbindina y DARPP-32 respecto el control (figura 34B). Así pues, estos resultados nos demuestran que la ausencia de Ikaros afecta negativamente a una subpoblación de neuronas de proyección. Para estudiar qué subpoblación estaba afectada realizamos hibridaciones *in situ* para detectar encefalina y sustancia P en animales adultos $Ik^{-/-}$. Las cuantificaciones tanto de los niveles de expresión del ARNm como de densidad neuronal, revelan una reducción significativa en la población encefalina positiva sin afectar la sustancia P (figura 34C). También analizamos si las interneuronas se veían afectadas por la ausencia de Ikaros. El recuento de las células positivas para parvalbúmina y acetilcolina, que corresponden a interneuronas GABAérgicas y colinérgicas respectivamente, muestra que no existen diferencias en el animal $Ik^{-/-}$ (figura 34D). Todos estos resultados indican que Ikaros está implicado en el control de la segunda oleada de neurogénesis afectando principalmente a la subpoblación de las neuronas de proyección encefalinérgicas del estriado.

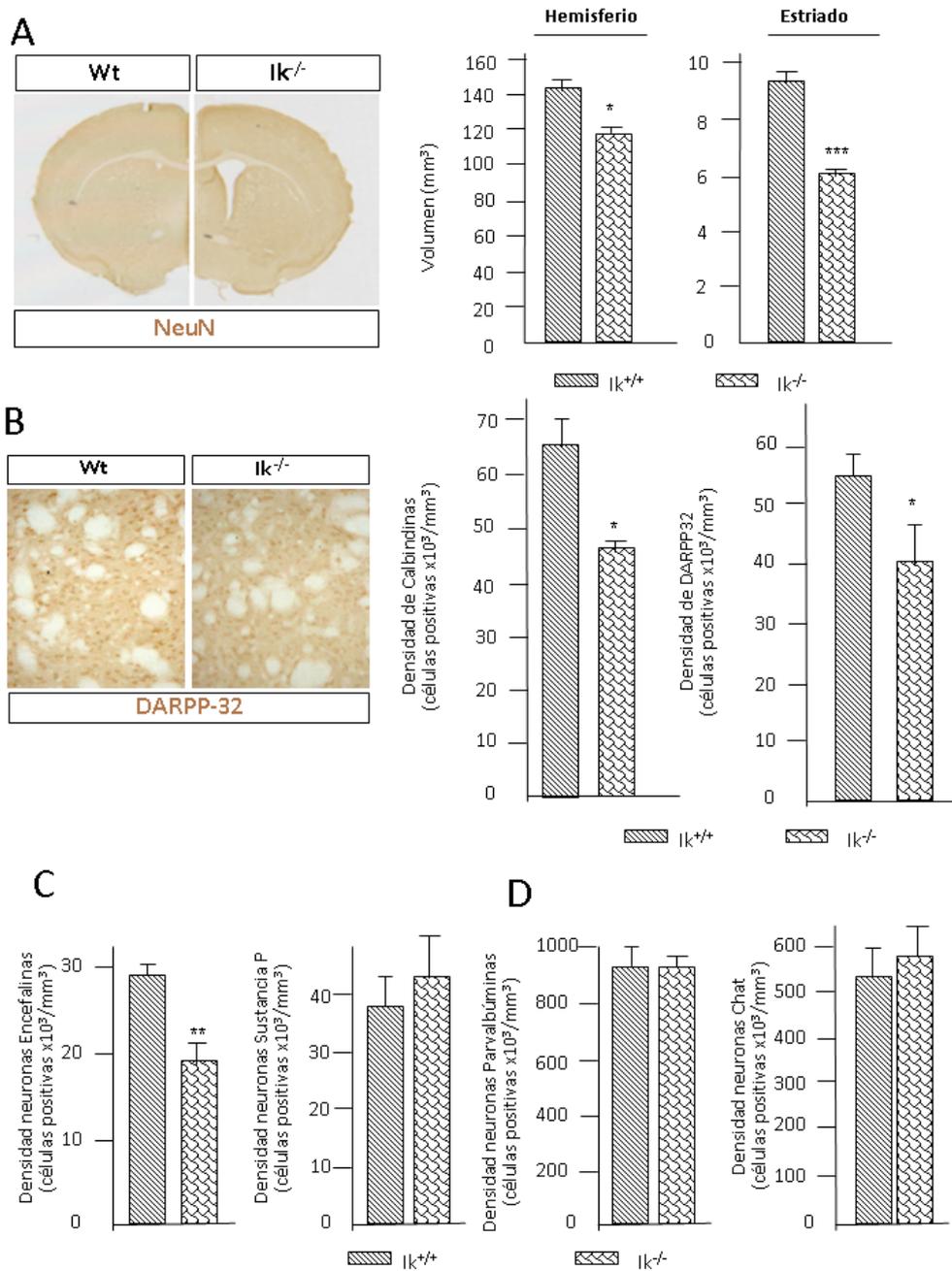


FIGURA 34: La ausencia de Ikaros afecta al desarrollo de las neuronas de proyección estriales que expresan encefalina. (A) Fotografía representativa de una inmunohistoquímica de NeuN del estriado de animales adultos. Los recuentos celulares muestran que los animales Ik^{-/-} presentan un menor volumen estriatal. (B) Fotografía representativa de inmunohistoquímica de DARPP-32 de estriado adulto. La densidad de neuronas de la matriz estriatal se obtiene contando el número de neuronas calbindina positivas/mm³ en el estriado adulto de animales s Wt y Ik^{-/-}. La densidad de neuronas de proyección estriales fue estudiada contando las células positivas para DARPP32/mm³. (C) Análisis de dos poblaciones de neuronas de proyección estriales: encefalinas y sustancia P. (D) Análisis de la densidad de interneuronas Parvalbúminas y Colinérgicas en animales Wt y Ik^{-/-}. Los resultados se expresan como media de 6 animales y las barras de error muestran la s.e.m. El test estadístico utilizado es t-student; *p < 0,05; **p < 0,005; ***p < 0,001. Barra de escala = 50 µm.

5.3 – Ikaros regula la diferenciación neuronal a expensas de la diferenciación astrocitaria

Algunos de los factores de transcripción que contienen dominios estructurales bHLH, como las Ngn, actúan durante el desarrollo embrionario controlando la diferenciación de los progenitores de precursores a neuronas o astrocitos (Nieto y col., 2001). Debido a la reducción específica de neuronas observada en los animales $Ik^{-/-}$, quisimos estudiar cómo se encontraba la gliogénesis en estos animales. Las inmunohistoquímicas en animales adultos demuestran que la ausencia de esta proteína provoca un aumento de la población astrocitaria caracterizada por la tinción positiva de GFAP en la corteza cerebral y en el núcleo estriado (figura 35).

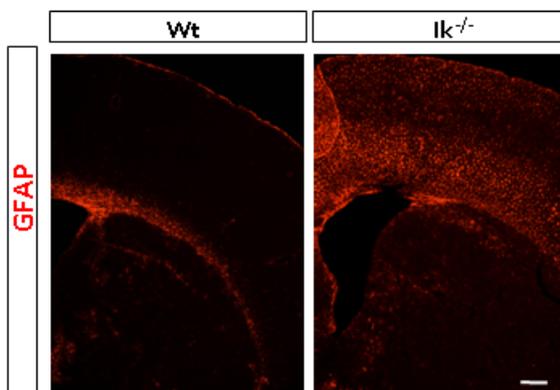


FIGURA 35: La ausencia de Ikaros provoca una aberrante diferenciación astrocitaria. Fotografía representativa de un inmunohistoquímica para GFAP de una sección coronal del estriado adulto de animales Wt y $Ik^{-/-}$. Experimento realizado en 3-4 animales adultos.

Bara de escala = 450 μ m.

La observación de la población astrocitaria en el animal $Ik^{-/-}$ junto con los recuentos celulares tras sobreexpresar Helios nos indica que los miembros de la familia de Ikaros podrían estar actuando a nivel de la toma de decisión de los progenitores para diferenciarse a neuronas o a astrocitos.

6 – IKAROS Y HELIOS ACTÚAN DE MANERA SECUENCIAL DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE LA EGL

Los resultados hasta ahora presentados, demuestran que los dos miembros de la familia Ikaros se expresan durante el desarrollo de la EGL ocupando regiones diferentes. Durante el desarrollo del sistema hematopoyético está descrito que Helios controla las etapas tempranas de la diferenciación linfocitaria mientras que Ikaros está regulando la diferenciación terminal de los linfocitos T (Rebollo y Schmitt., 2003).

Nuestro siguiente objetivo fue estudiar si existía alguna relación entre las dos proteínas de la familia Ikaros durante el desarrollo de la EGL tal y como ocurría durante el desarrollo del sistema hematopoyético.

6.1 – Helios e Ikaros se expresan en diferentes células en la EGL en el desarrollo

El control de la neurogénesis por parte de Helios e Ikaros puede estar controlado de manera independiente o estar regulado por actuaciones secuenciales de los dos miembros de la familia. Para estudiar este objetivo analizamos la expresión de ambas proteínas a lo largo del desarrollo de la EGL. Tal y como se observa a la edad de E18,5, en ningún momento del desarrollo estudiado se encuentran células en las que colocalicen las dos proteínas Ikaros y Helios (figura 36A). A parte de demostrar que no se expresan en las mismas células, quisimos estudiar la relación que los dos miembros de la familia mostraban. Así pues, analizamos la presencia de Helios en animales $Ik^{-/-}$ y observamos que la ausencia de Ikaros no modifica la expresión de Helios (figura 36B). La interpretación de estos resultados nos permite realizar dos postulados: Helios e Ikaros se expresan en vías de señalización independiente o ambas proteína se expresan secuencialmente estando separados temporalmente.

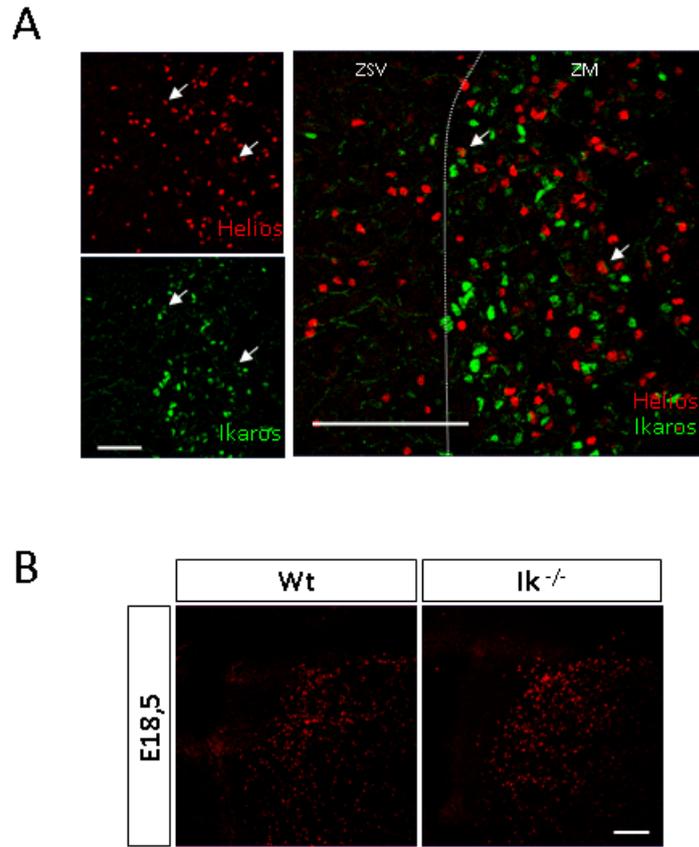


FIGURA 36: Helios se expresa de manera independiente o *upstream* de Ikaros. (A) Fotografía representativa de la doble inmunohistoquímica Helios-Ikaros en secciones coronales de la EGL de animales Wt a la edad de E18,5. Helios se expresa en la ZSV y en la ZM mientras que Ikaros se expresa en la ZM. Las flechas señalan las pocas células que presentan colocalización de las proteínas Helios e Ikaros (n=4 animales). Barra de escala = 400 μ m. (B) Fotografía representativa de la inmunohistoquímica para Helios en secciones coronales de la EGL en animales Wt y Ik^{-/-}. La ausencia de Ikaros no afecta a la expresión de Helios. (n=4 animales). Barra de escala = 500 μ m.

6.2 – Ikaros es esencial para la neurogénesis inducida por Helios

Con la finalidad de esclarecer estas dos interpretaciones, realizamos una serie de experimentos *in vitro* para concluir la relación existente entre ambas proteínas. En una primera instancia, analizamos los niveles de ARNm de Ikaros cuando sobreexpresábamos Helios en neuroesferas en estado proliferante. Como se puede observar en las gráficas que representan los resultados de la RT-PCR, la sobreexpresión de Helios incrementa los niveles de ARNm de Ikaros. Posteriormente, analizamos los niveles del ARNm de Helios en neuroesferas sobreexpresadas con Ikaros. En estas condiciones, se observa una disminución del ARNm de Helios (figura

37A). Según estos experimentos, todo parece indicar que la expresión de Helios es necesaria para la posterior expresión de Ikaros. Aún con todo, debemos suponer que no existe una regulación secuencial directa ya que no existe colocalización Helios-Ikaros en la EGL durante todo el desarrollo embrionario.

Con la finalidad de seguir estudiando la relación entre los dos miembros de la familia de factores de transcripción, pasamos a estudiar el efecto de la sobreexpresión de Helios en cultivos primarios derivados de $Ik^{-/-}$. Como se observa en el recuento de precursores neuronales o astrocitarios, la ausencia de Ikaros no permite realizar las funciones neurogénicas ni de inhibición astrocitaria observadas con la sobreexpresión de Helios (figura 37B).

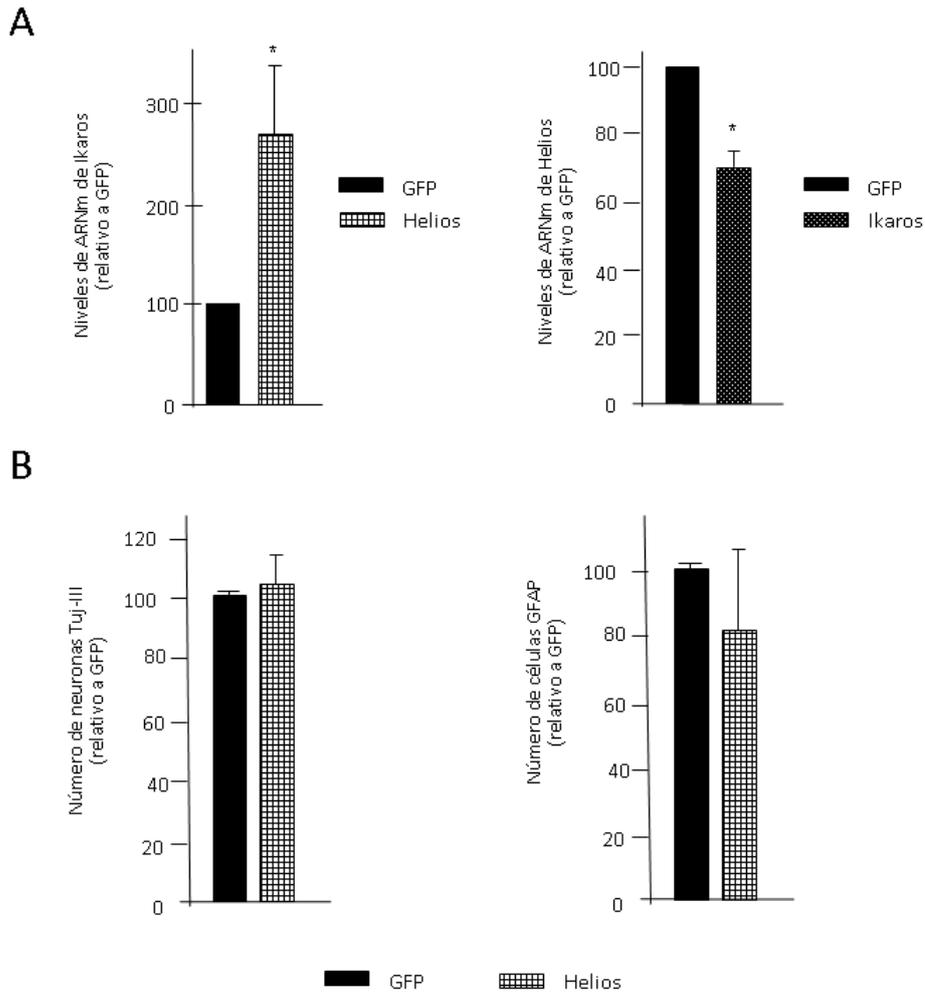


FIGURA 37: Helios requiere la presencia de Ikaros para realizar su función neurogénica. (A) Niveles de ARNm mensajeros de Ikaros y Helios en neuroesferas transfectadas medido por RT-PCR. La sobreexpresión de Helios induce un aumento del ARNm de Ikaros. La sobreexpresión de Ikaros induce una disminución del ARNm de Helios. Los resultados representan la media \pm s.e.m. de 3-4 cultivos de neuroesferas y está representado respecto a la transfección control, considerándola 100%. El análisis estadístico utilizado es t-student; *p < 0,05. (B) Cuantificación del número de células Tuj-III y GFAP positivas tras sobreexpresar Helios en cultivos primarios de la EGL de animales $Ik^{-/-}$ a E14,5. Helios no puede ejercer el efecto neurogénico en ausencia de Ikaros. Los resultados representan la media \pm s.e.m. de 3-4 cultivos y están relativizados a la transfección control, considerándola 100%. El análisis estadístico utilizado es el t-student.

Estos experimentos *in vitro* nos permiten postular que la presencia de Ikaros es necesaria para que Helios pueda realizar su efecto neurogénico.

7 – HELIOS E IKAROS ESTÁN RELACIONADOS CON LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN ESTRIATAL DE LA FAMILIA Dlx PERO NO CON Ebf-1

El desarrollo embrionario del estriado está controlado por la acción de muchos factores de transcripción que permiten un alto grado de regulación. Con la finalidad de elucidar qué papel podrían tener los factores de transcripción de la familia Ikaros durante el desarrollo de la EGL, quisimos estudiar la relación de estas proteínas con las vías descritas que participan en el control del desarrollo del núcleo estriado.

7.1 – La expresión de Helios e Ikaros está controlada por miembros de la familia de factores de transcripción Dlx

La familia de factores de transcripción Dlx la componen diferentes miembros y está involucrada en el control del proceso de neurogénesis estriatal (Anderson y col., 1997; Yun y col., 2002). Los componentes de esta familia se organizan en pares de genes (Dlx1/2, Dlx3/4 y Dlx5/6) de los que únicamente el Dlx3/4 no se expresa en el SNC. Los progenitores de la ZV y de la ZSV presentan una alta expresión de las proteínas Dlx1/2 mientras que Dlx5/6 se localiza en precursores más maduros localizados en la ZSV más próxima al manto y en la ZM de la EGL (Eisenstat y col., 1999). De estas proteínas, la pareja Dlx1/2 es esencial e imprescindible para la correcta generación de la segunda oleada de neurogénesis del estriado (Anderson y col., 1997). Debido a la implicación que presenta la familia de factores de transcripción Dlx durante la neurogénesis, nos planteamos estudiar la relación de Helios e Ikaros con los miembros Dlx1/2 y Dlx5/6.

En primer lugar estudiamos cómo se encontraba la expresión tanto de Helios como de Ikaros en animales deficientes en el par de factores de transcripción Dlx1/2 (Dlx1/2^{-/-}). Como se observa en las hibridaciones *in situ* realizadas en animales Dlx1/2^{-/-} a la edad de E18,5, desaparece la expresión del ARNm tanto de Helios como de Ikaros en la EGL (figura 38A y 38B). A continuación estudiamos si otros factores de transcripción implicados en la diferenciación neuronal del núcleo estriado se encontraban alterados en estos animales Dlx1/2^{-/-}. Estudiamos la expresión del factor de transcripción Ebf-1 el cual interviene en la generación de las neuronas de proyección tempranas sustancia P positivas del núcleo estriado (Garel y col., 1999; Lobo y col., 2006; Lobo y col., 2008). Como se observa en la microfotografía, Ebf1 continúa expresándose en el encéfalo de los animales deficientes de Dlx1/2 (figura 38C). La expresión de Ebf-1 en la EGL de los animales Dlx1/2^{-/-}, junto con el mantenimiento de la expresión de Helios en la corteza cingulada e insular, nos confirma

RESULTADOS

que la alteración en los factores Dlx1/2 afecta a la vía de diferenciación neuronal controlada por la familia Ikaros. Con todo, podemos concluir que la expresión tanto de Helios como de Ikaros transcurre posteriormente a la expresión de Dlx1/2 durante el desarrollo embrionario. Es necesaria la actividad de Dlx1/2 para la correcta expresión de los miembros de la familia de Ikaros.

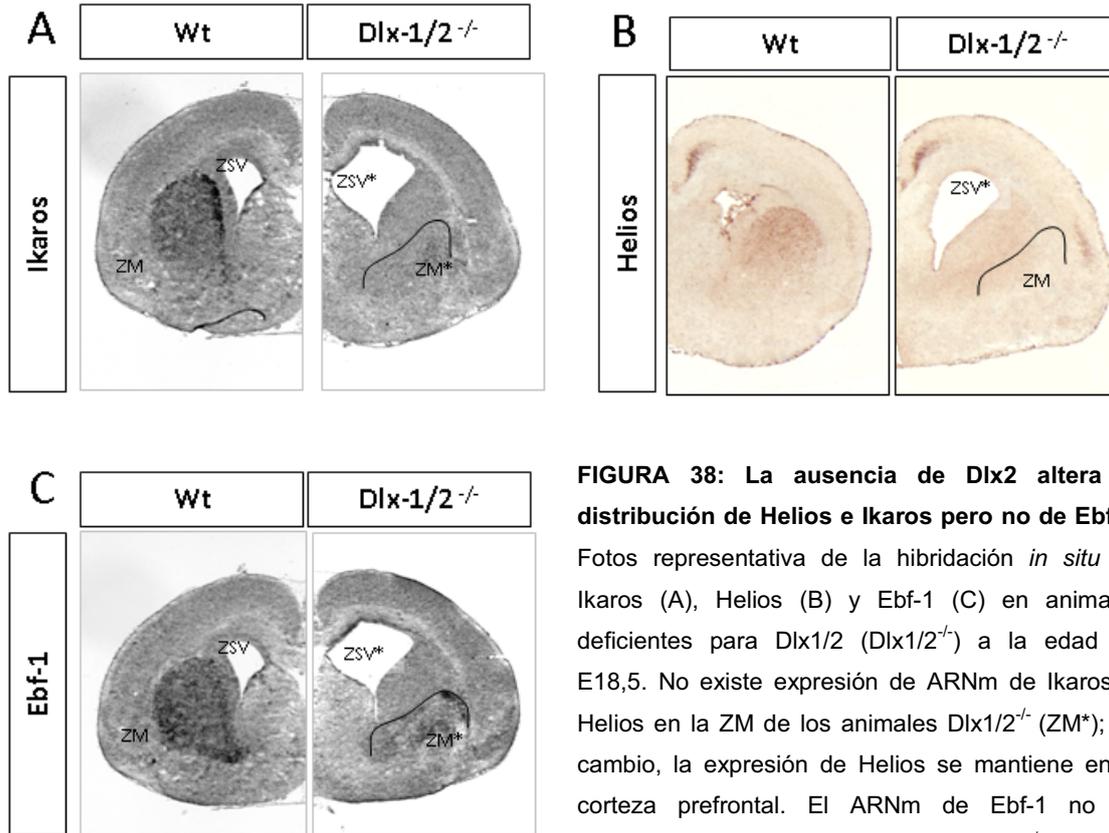


FIGURA 38: La ausencia de Dlx2 altera la distribución de Helios e Ikaros pero no de Ebf-1.

Fotos representativa de la hibridación *in situ* de Ikaros (A), Helios (B) y Ebf-1 (C) en animales deficientes para Dlx1/2 (Dlx1/2^{-/-}) a la edad de E18,5. No existe expresión de ARNm de Ikaros ni Helios en la ZM de los animales Dlx1/2^{-/-} (ZM*); en cambio, la expresión de Helios se mantiene en la corteza prefrontal. El ARNm de Ebf-1 no se encuentra alterado en los animales Dlx1/2^{-/-}.

7.2 – La expresión de Helios e Ikaros no modifica la expresión de los factores de transcripción Dlx1/2

En un segundo lugar, quisimos estudiar si los factores de transcripción de la familia Ikaros regulaban la expresión de los miembros Dlx1/2. Para llevar a cabo este objetivo realizamos dos aproximaciones experimentales *in vitro*. La relación entre Helios y Dlx2 fue estudiada analizando los niveles del ARNm tras la sobreexpresión de Helios en neurosféricas en estado proliferante. Las neurosféricas sobreexpresadas con Helios no modifican la expresión del ARNm de la proteína Dlx2 respecto a las transfectadas con el plásmido control (figura 39A). Así pues, al menos en experimentos *in vitro*, parece que Helios no altere los niveles de Dlx2. En cuanto al estudio de la relación de Ikaros con Dlx2 y Dlx5 la analizamos estudiando la expresión de la proteína Dlx2 y Dlx5 en animales $Ik^{-/-}$. Como se puede observar en las hibridaciones *in situ* realizadas a dos edades diferentes del desarrollo de la EGL de los animales $Ik^{-/-}$, no existe ninguna anomalía de expresión de Dlx2 y Dlx5 (figura 39B).

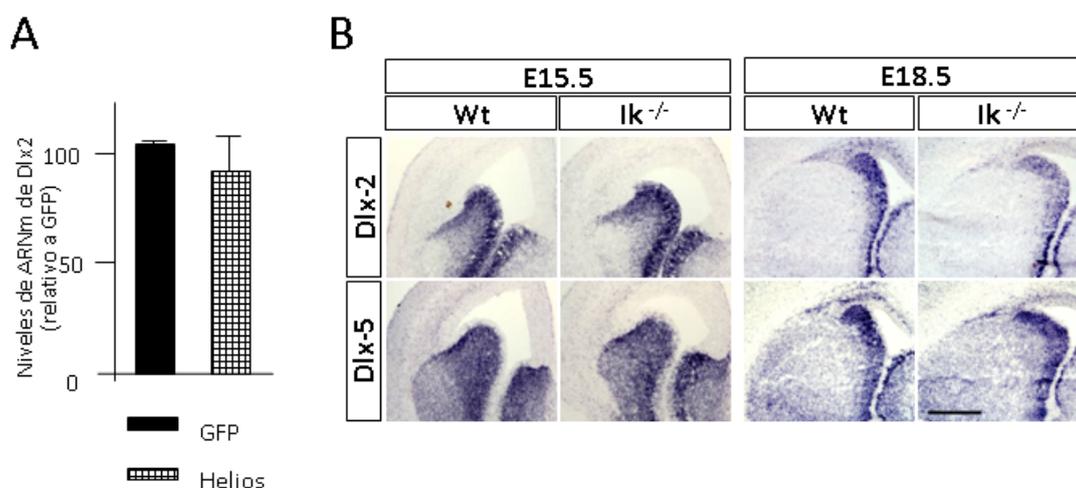


FIGURA 39: Helios e Ikaros no modifican la expresión de la familia Dlx. (A) Niveles de ARN, de Dlx2 medidos por RT-PCR en neurosféricas sobreexpresadas con Helios y GFP. La sobreexpresión de Helios no modifica los niveles de ARNm de Dlx2 en las neurosféricas. Los resultados representan la media \pm s.e.m. de 4-5 cultivos de neurosféricas relativizados al GFP. El análisis estadístico utilizado es t-student. (B) Hibridación *in situ* de Dlx2 y Dlx5 en animales Wt y $Ik^{-/-}$ a las edades E15,5 y E18,5. No se observa ninguna diferencia entre ambos genotipos. Barra de escala = 500 μ m.

Todos estos resultados nos permiten concluir que los factores Dlx1/2 y los miembros de la familia Ikaros se expresan en la misma cascada de diferenciación. Sería necesaria la presencia de Dlx1/2 para la correcta expresión de Helios e Ikaros.

7.3 – Helios e Ikaros muestran una diferente relación con la proteína Dlx5/6

La expresión de Dlx1/2 activa la expresión de los otros miembros de la familia, Dlx5/6. Como hemos observado que tanto Helios como Ikaros se expresan en el linaje celular que expresa Dlx1/2, quisimos estudiar si existía alguna relación de los miembros de la familia Ikaros con la proteína Dlx5/6. Para tal efecto, analizamos la expresión de Helios e Ikaros en secciones coronales de la EGL de los animales transgénicos Dlx5/6-cre-IRES-EGFP. En estos animales, los precursores que hayan expresado las proteínas Dlx5/6 expresarán GFP de manera permanente, lo cual permite el seguimiento de las neuronas que provienen de los precursores Dlx5/6 positivos. El análisis de las dobles inmunohistoquímicas revelan que Helios no se expresa en las células Dlx5/6 positivas mientras el 100% de las células positivas para Dlx5/6 son Ikaros positivas (figura 40). Estos resultados nos indican que mientras Helios está expresado de manera independiente o es anterior a la expresión de Dlx5/6, la expresión de Ikaros se realiza en los progenitores que han expresado Dlx5/6 durante el desarrollo embrionario.

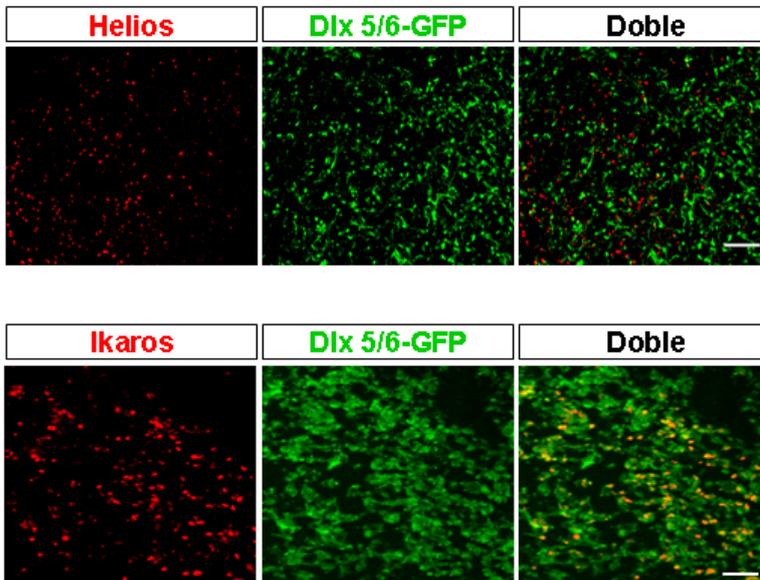


FIGURA 40: Helios se expresa *upstream* o independientemente a Dlx5/6 mientras que Ikaros se expresa *downstream* de Dlx5/6. Foto representativa de inmunohistoquímicas dobles Helios-GFP y Ikaros-GFP en animales transgénicos Dlx5/6-IRES-GFP a la edad de E18,5. Helios no se expresa en la mayoría de células Dlx5/6 positivas mientras que Ikaros se expresa en todas la células Dlx5/6 positivas. Barra de escala = 100 μ m.

Recapitulando todos los resultados anteriores, podemos establecer una correlación entre las dos proteínas Helios e Ikaros y la otra vía de señalización neurogénica, la familia Dlx. Durante el desarrollo embrionario Helios e Ikaros están controlados por la expresión de Dlx1/2. A medida que se avanza en la cascada de

señalización, algunos progenitores Dlx5/6 positivos expresarán la proteína Ikaros. Sin embargo la relación de Helios con Dlx5/6 no parece estar tan clara. Los resultados que presentamos nos permiten postular que la expresión de Helios es independiente a la de Dlx5/6, o bien, que Helios se expresara río arriba de Dlx5/6.

7.4 – Helios e Ikaros no están implicados en la diferenciación de neuronas controlada por Ebf-1

Y por último, para terminar de estudiar la relación que establecía Helios e Ikaros con los factores de transcripción involucrados en la diferenciación del núcleo estriado, pasamos a estudiar qué relación presentaban los miembros de la familia Ikaros con la proteína Ebf-1. Cuando analizamos la expresión de Helios e Ikaros en animales deficientes de Ebf-1^{-/-} observamos que ni la expresión de Helios ni la de Ikaros se encuentra modificada en los animales Ebf-1^{-/-} (figura 41-). Este resultado, junto la ausencia de afectación de este factor de transcripción en animales Dlx1/2^{-/-}, nos permite postular que Ebf-1 conforma una vía de diferenciación neuronal diferente a la establecida por las proteínas de la familia de Dlx y la de Ikaros.

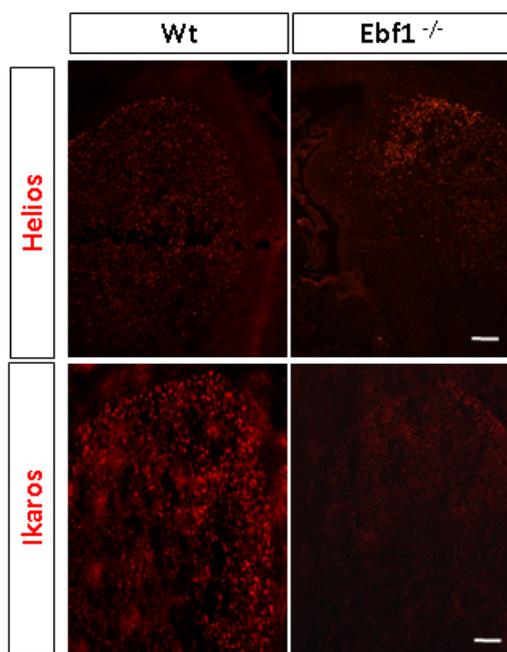


FIGURA 41: Helios e Ikaros no se encuentran alterados por la ausencia de Ebf-1. Fotos representativas de inmunohistoquímicas para Helios e Ikaros en animales Wt y deficientes para Ebf-1 (Ebf-1^{-/-}) a la edad de E18,5. Ni Helios ni Ikaros alteran su expresión en los animales Ebf-1^{-/-}. Animales n=3. Barra de escala = 500 µm.

V. DISCUSIÓN

En el desarrollo de esta tesis doctoral nos hemos centrado en el estudio de dos factores de transcripción involucrados en el desarrollo del estriado, más concretamente las proteínas pertenecientes a la familia Ikaros: Helios e Ikaros. Como ocurre con muchas otras proteínas implicadas en embriogénesis del cerebro, estos dos factores de transcripción habían sido ampliamente estudiados en el sistema hematopoyético pero poco se conocía sobre su función en el SNC. En primer lugar, se quiso estudiar la distribución tanto temporal como espacial de ambos factores de transcripción durante la génesis del núcleo estriado. Posteriormente, se estudió su funcionalidad en sistemas *in vitro* para poder así conocer qué papel se les podría atribuir durante el desarrollo embrionario de la EGL. Por último, debido a que la génesis de un sistema está regulada por un compendio de factores de transcripción que actúan de manera regular y secuencial, se estudió qué posición ocupaban los dos factores dentro de los procesos de diferenciación ya establecidos. Los resultados mostrados corroboran que tanto Helios como Ikaros se expresan específicamente durante el desarrollo embrionario del núcleo estriado y que están implicados directamente en potenciar la formación de neuronas de proyección.

Tal y como quedará reflejado en la discusión, y de acuerdo con los resultados presentados anteriormente, podemos concluir que (1) la localización de los factores de transcripción durante el desarrollo embrionario nos da información sobre la funcionalidad que tienen durante la embriogénesis; (2) la correcta neurogénesis está acompañada por un control exhaustivo del ciclo celular y de la diferenciación astrocitaria; (3) los factores de transcripción actúan dentro de un gran puzzle en el que se encaban diferentes proteínas, unas conocidos y otras que quedan por conocer.

Teniendo en cuenta todos nuestros resultados y la información que hasta día de hoy existe sobre la diferenciación de la EGL, se pretende completar el modelo de diferenciación neuronal del núcleo estriado con nuevas proteínas. El esclarecimiento del engranaje proteico involucrado en el desarrollo del estriado facilitará la comprensión del proceso en global. Tras adquirir este conocimiento, resultará más factible la diferenciación de células madre hacia el linaje deseado y su posible aplicación terapéutica.

1 – HELIOS E IKAROS SE EXPRESAN EN UNA SUBPOBLACIÓN DE PRECURSORES NEURALES

La acción secuencial de los factores de transcripción que controlan la diferenciación estriatal es necesaria para asegurar un proceso correcto de embriogénesis (Anderson y col., 1997; Wang y Liu, 2001). La distribución espacial y temporal de cada proteína está altamente ligada con la función que cada una de ellas ejerce durante el proceso de desarrollo. Nuestros resultados demuestran que los dos miembros de la familia Ikaros presentan un patrón de expresión diferente durante el desarrollo de la EGL. De acuerdo con la primera descripción de Helios durante el desarrollo embrionario (Kelley y col., 1998), nuestro trabajo describe la expresión de la proteína en diferentes áreas neurogénicas del cerebro. En la EGL, Helios se expresa en la zona ocupada tanto por progenitores neurales en estado proliferante, ZSV, como en células postmitóticas localizadas en la ZM. Respecto el otro miembro de la familia, de manera coincidente con lo que se había observado anteriormente (Agoston y col., 2007; Tucker y col., 2008), Ikaros presenta una expresión delimitada en la zona de unión entre la ZSV y ZM de la EGL. Ikaros se expresa en un área habitada exclusivamente por precursores postmitóticos que durante estas etapas embrionarias generarán la gran diversidad de neuronas de proyección estriatales (Toresson y Campbell, 2001). La expresión específica en diferentes áreas de la EGL nos induce a pensar que cada proteína puede tener un papel en diferentes etapas de la neurogénesis del estriado. De hecho, durante la diferenciación de linfocitos B, sistema donde las proteínas de la familia Ikaros han estado ampliamente caracterizadas, Helios e Ikaros actúan secuencialmente para conseguir una correcta especificación y maduración de estas células hematopoyéticas (Georgopolus y col., 1997). Helios se expresa en progenitores hematopoyéticos tempranos (Kelley y col., 1998) mientras que Ikaros actúa en etapas más tardías con el objetivo de determinar la diferenciación terminal de los linfocitos B (Kirstetter y col., 2002; Busslinger y col., 2004). La actuación secuencial observada en el desarrollo del sistema hematopoyético nos permitió postular que Helios e Ikaros podrían establecer una relación semejante durante de la diferenciación del núcleo estriado. Los estudios en *Drosophila melanogaster* demuestran que el gen ortólogo de Helios, el gen Hunckback, confiere a los progenitores una identidad de neuroblastos en etapas tempranas del desarrollo neural (Perason y Doe, 2003; Cleary y Doe, 2006; Tran y col., 2010). En roedores, la relación de Helios con marcadores de precursores neurales como Nestina nos permite postular que esta proteína se expresa en procesos iniciales de diferenciación de los progenitores neuronales. Así pues, en el desarrollo de la EGL Helios podría estar

actuando en las etapas tempranas de diferenciación tal como ocurre en el sistema hematopoyético.

Por otra parte, Ikaros se localiza en la ZM donde residen progenitores más maduros que han abandonado el ciclo celular. Además, nuestros experimentos *in vitro* demuestran que Ikaros se expresa en células positivas para el marcador β -III-tubulina, específico de neuroblastos que se encuentran en la última división celular o acaban de abandonar el ciclo celular (Lee y col., 1990). La relación de Ikaros con un marcador más maduro, su localización en la ZM y la función que esta proteína realiza en el sistema hematopoyético nos sugiere que Ikaros actúa en los estados más avanzados del proceso de diferenciación.

Sin embargo, no todos los precursores neurales de la EGL expresan Helios o Ikaros, tal y como se observa en los experimentos de localización de estos factores de transcripción. La expresión limitada a unos progenitores específicos nos permite postular que estos factores de transcripción actúan en una pequeña población de precursores. La diferenciación de los tipos neuronales existentes en el núcleo estriado adulto viene controlada por la expresión de diferentes factores de transcripción. Con tal de estudiar qué tipo de células generaban los progenitores que expresan Helios e Ikaros, pasamos a estudiar la funcionalidad en sistemas *in vitro*.

2 – HELIOS E IKAROS ACTÚAN REGULANDO DIFERENTES ETAPAS DE LA DIFERENCIACIÓN DE LOS PRECURSORES NEURALES

La diferenciación neuronal está controlado por una gran cantidad de factores de transcripción que actúan en los diferentes pasos del proceso: regulan el estado de proliferación, controlan las etapas de especificación de linaje y actúan a nivel de la diferenciación terminal (Nguyen y col., 2006). Los estudios realizados en la corteza cerebral demuestran que una misma familia de factores de transcripción pueden regular el proceso de diferenciación de los progenitores en diferentes etapas. Es el caso de la familia de factores de transcripción bHLH. El mantenimiento del estado de progenitor de los precursores por parte de la familia Hes, miembro de bHLH, lo consigue actuando a dos niveles: inhibiendo genes de diferenciación neuronal y activando antagonistas de las proteínas proneurales. Sin embargo, las proteínas bHLH proneurales (Mash1, Ngn1 y Ngn2) coordinan la transición del estado proliferante a estado de diferenciación neurogénica inhibiendo la actividad de Hes (Ross y col., 2003). En nuestros resultados, la sobreexpresión de Helios y de Ikaros provoca efectos tanto en el control de la proliferación como en el proceso de diferenciación de los

progenitores neurales. Asumiendo que el desarrollo del núcleo estriado es análogo al de la corteza, podríamos pensar que los miembros de la familia Ikaros actuarían a nivel de diferentes etapas de la diferenciación neuronal.

2.1 – La salida de ciclo inducida por Ikaros la realiza mediante el control de las proteínas inhibidoras de ciclinas

El proceso de diferenciación neural está altamente relacionado con el control de la proliferación de los progenitores. Una reducción en la tasa de proliferación está asociada con un incremento en la diferenciación de los precursores (Edlund y Jessell, 1999). La distribución de progenitores que expresan Helios en la ZSV y ZM y células que expresan Ikaros únicamente en la ZM parece indicar que los miembros de la familia Ikaros están controlando alguna etapa de la proliferación de los precursores. Junto a estos resultados *in vivo*, en el ensayo de neuroesferas observamos que mientras Helios presenta mayor expresión de ARNm en el estado proliferante de los progenitores, la expresión de Ikaros aumenta durante la diferenciación celular. La expresión de las dos proteínas en los diferentes estadios de la diferenciación de los progenitores correlaciona con la expresión restringida a zonas específicas en los cortes histológicos de EGL. En los cultivos celulares, la presencia forzada de ambos factores, Helios e Ikaros, reduce el número de células progenitoras en estado proliferante, mientras la ausencia de Ikaros aumenta el número de células que se encuentran en este estado. Junto a nuestros resultados, la observación que Ikaros colocaliza con células BrdU positivas de la EGL tras un tratamiento de 18 horas de inyección (Agoston y col., 2007) nos permite concluir que los miembros de esta familia regulan la salida de ciclo celular de los precursores. De manera similar en otros sistemas como el hematopoyético, los miembros de la familia Ikaros actúan facilitando la salida de ciclo celular de los progenitores (Kopially y col., 1999).

La proliferación de los precursores está controlada por diferentes vías de señalización siendo la más importante la vía de Notch (Gaiano y Fishell, 2002; Corbin y col., 2008) y el control de las proteínas ciclinas mediante sus inhibidores (Morgan, 1997; Satyanarayana y Kaldi, 2009). Así pues, los miembros de la familia Ikaros podrían inducir la salida de ciclo regulando alguno de estos dos procesos. En el sistema hematopoyético, Ikaros controla el estado proliferante de los precursores, entre otras vías, actuando a nivel de los miembros de la familia Notch (Bellavia y col., 2007; Demarest y Capobianco, 2008). Sin embargo, nuestros resultados en la EGL demuestran que los miembros de la familia Notch, Notch1 y Notch3, no varían tras la

expresión forzada de Ikaros. En el caso de Helios, todo parece indicar que tampoco utilizaría la vía de Notch para inhibir el ciclo celular de los progenitores. Podemos concluir que Helios e Ikaros controlan la proliferación de diferente manera según el sistema donde se expresen y ejerzan su función.

La otra vía implicada en el control de la proliferación de las células progenitoras es la compuesta por las ciclinas y los inhibidores de las mismas. En el desarrollo de los linfocitos B, Ikaros-1 induce la salida de ciclo celular variando los niveles de las ciclinas (Ma y col., 2010) y de sus inhibidores como p27^{Kip1} (Kathrein y col., 2005). En la sobreexpresión de Ikaros en los precursores de la EGL no se observa una variación en los niveles de p27^{Kip1}, en cambio, se observa una regulación positiva de los niveles de proteína del inhibidor de ciclinas p21^{Cip1/Waf1}. Tal y como ocurre con el mecanismo de acción de Ikaros, estudios preliminares del laboratorio indican que la sobreexpresión de Helios regularía de manera similar en el control de la expresión de estas proteínas inhibidoras de ciclo (resultados preliminares). Durante la embriogénesis, tanto de p27^{Kip1} como de p21^{Cip1/Waf1} tienen un papel fundamental en el mantenimiento de estado progenitor de las células madre neurales (van Lookeren y Gill, 1998; Doetsch y col., 2002; Kippin y col., 2005). La regulación específica de la proteína inhibidora de ciclo p21^{Cip1/Waf1} está respaldada por el hecho que el promotor de esta proteína presenta un sitio de unión específico para la proteína Ikaros (TFDEARCH program, version 1.3; 1995 Yutaka Akiyama, Kyoto University). Además, en ausencia de p21^{Cip1/Waf1} la sobreexpresión de Ikaros no induce la salida de ciclo celular observado en células Wt. Todo parece indicar que el control de la proliferación por parte de Ikaros sería regulando los niveles del inhibidor de ciclina p21^{Cip1/Waf1} y no modificando la vía de Notch.

Resumiendo brevemente el mecanismo de acción de Ikaros en la proliferación de los progenitores, concluimos que este factor de transcripción facilita la salida de ciclo celular aumentando los niveles de la proteína inhibidora de ciclinas p21^{Cip1/Waf1} que actúa en la fase G1 retrasando o bloqueando la progresión del ciclo celular hacia la fase S (Sherr y Roberts, 1999).

2.2 – Helios e Ikaros favorecen la diferenciación neuronal inhibiendo la astrocitaria en el desarrollo de la EGL

La salida de ciclo celular por parte de las células madre neuronales viene determinado por el control ejercido por los diferentes mecanismos anteriormente citados en la fase G1 del ciclo (Zetterberg y col., 1995; Edlund y Jessell, 1999; Pechnick y col., 2008). Tras esta decisión de abandono del estado proliferante, los precursores lejos de quedarse en estado de quiescencia, se someten a diferentes señales que orquestrarán el complejo proceso de determinación de estirpe y diferenciación terminal. Al sobreexpresar Helios e Ikaros, tanto en ensayos de neuroesferas como en cultivos primarios, se observa se incrementa la población neuronal.

Durante el proceso de diferenciación, los progenitores adquieren diferentes estados intermedios, CPI, que por la actuación de diferentes factores adquirirán las características maduras definitivas. Se ha descrito que la neurogénesis adulta del hipocampo se caracteriza por la formación de dos tipos de células madre neurales dependiendo de la distribución del neurofilamento Nestina. Así pues, los progenitores tipo I son los precursores neuronales inmaduros mientras los tipos II se consideran que son neuroblastos maduros que finalmente darán lugar a las neuronas (Fukuda y col., 2003; Steiner y col., 2006). Al analizar que la sobreexpresión de Helios no varía la población Nestina positiva en los cultivos de neuroesferas, observamos que Helios facilita la conversión hacia el estado Nestina tipo II de diferenciación, el estado más maduro. Este cambio en la distribución de poblaciones genera un aumento de las células postmitóticas β -III-Tubulina positivas. Sin embargo, la sobreexpresión de Ikaros no colocalizaba con el marcador Nestina en este sistema de precursores neurales. Así pues, analizando estos resultados, postulamos que mientras que Helios facilita la diferenciación hacia la estirpe neuronal actuando sobre progenitores inmaduros, Ikaros incrementa la población neuronal en etapas posteriores (figura 42).

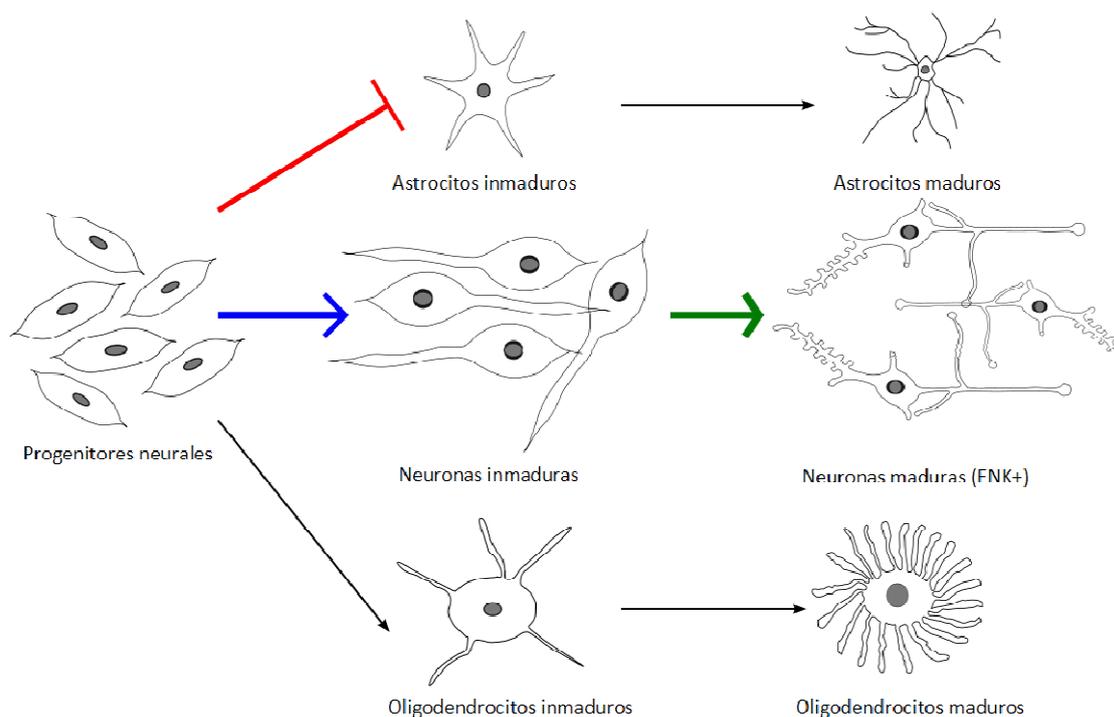


Figura 42: Esquema propuesto para explicar el efecto de Helios e Ikaros durante la diferenciación de los precursores neurales. Según nuestros resultados Helios inducirían una diferenciación hacia neuronas inmaduras (flecha azul) mientras que Ikaros facilitaría la diferenciación hacia neuronas encefalinas positivas (ENK+; flecha verde). La estirpe astrocitaria se vería afectada negativamente tanto por Helios como por Ikaros en las primeras etapas de determinación (flecha roja). En cambio, la estirpe oligodendrocitaria no se vería afectada.

Durante el proceso de génesis del estriado, las diferentes estirpes neurales (neuronas, astrocitos y oligodendrocitos) se originan a partir de las mismas células progenitoras (Guillemot, 2007). Existen diferentes proteínas o factores exógenos que facilitan la diferenciación hacia un tipo de célula madura y, consecuentemente, originan una alteración en la generación de los otros tipos celulares. En el caso de las proteínas como Mash1 y Ngn2, su presencia induce la generación de características neuronales en detrimento de la diferenciación astrocitaria (Kageyama y col., 2005). Helios e Ikaros podrían actuar de la misma manera que lo hacen estos miembros de la familia bHLH, actuando como interruptor que controla por qué vía deben diferenciarse los progenitores (Vetter y Brown, 2001). Por una parte, estos factores pueden actuar directamente sobre promotores de genes implicados en la diferenciación terminal de neuronas. El factor de transcripción Ikaros se une específicamente a los elementos reguladores del gen de la encefalina con tal de regular la diferenciación de este tipo neuronal (Dobi y col., 1997). Por otra parte, la inhibición astrocitaria está controlada por

la regulación de la principal vía de diferenciación de astrocitos, la vía JAK/STAT3 (Fukuda y Taga, 2005). En el sistema hematopoyético, determinadas isoformas de Ikaros provocan la aparición de linfomas desregulando la vía JAK/STAT (Kano y col., 2008; Tefferi, 2010). En el SNC, la ausencia de Ikaros provoca una aberrante diferenciación astrocitaria en ratones adultos. Aunque en el desarrollo del estriado todas estas cuestiones tienen que ser estudiadas más ampliamente, todo parece indicar que la familia de Ikaros regularía la diferenciación estriatal actuando tanto en la vía de diferenciación neuronal como en la astrocitaria. La cuestión que queda por esclarecer es si los miembros de la familia Ikaros actúan simultáneamente regulando los dos procesos de diferenciación o si, en cambio, los resultados observados en la población astrocitaria es consecuencia del incremento de la población neuronal.

2.3 – Ikaros promueve la correcta diferenciación neuronal de la segunda oleada de neurogénesis

Los precursores neurales de la EGL pueden formar neuronas encefalinérgicas o sustancia P positivas que formarán la matriz del núcleo estriado adulto (van der Kooy y Fishell, 1987). Nuestros resultados demuestran que Ikaros es esencial para la génesis de las neuronas nacidas en la segunda oleada de neurogénesis. Además, el análisis de los animales adultos deficientes para Ikaros presentan una reducción significativa en el número de neuronas de proyección, principalmente, las neuronas encefalinérgicas. Nuestros resultados coincidían con trabajos previos donde se había descrito que Ikaros participa en la diferenciación de las neuronas encefalinérgicas actuando a nivel del promotor (Dobi y col., 1997; Agoston y col., 2007). Otros factores de transcripción como MNR2 o Math1 actúan promoviendo diferentes estirpes neuronales en diferentes áreas del SNC (Tanabe y col., 1998; Canzoniere y col., 2004). Pero Ikaros no sólo actúa a nivel del promotor de la encefalina, sino que también favorece la diferenciación hacia la estirpe neuronal. El hecho que la sobreexpresión de Ikaros en cultivos primarios induzca una mayor de diferenciación tanto de neuronas encefalinérgicas como calbindinas positivas nos corrobora esta hipótesis. Pero esta inducción de neuronas de proyección encefalinérgicas positivas únicamente se observa en los estudios realizados en el desarrollo del estriado. La sobreexpresión de Ikaros en progenitores derivados del cerebelo induce un aumento de expresión del ARNm de Encefalina pero no se observa un aumento de neuronas maduras encefalinérgicas positivas (dato no mostrado). Este resultado nos demuestra que dependiendo en qué contexto actúe Ikaros, realizará una función u otra.

El análisis de los animales adultos deficientes para la proteína Ikaros demuestra que dentro de la población neuronal encefalinérgica debe existir una subpoblación para la cual sea necesaria la presencia de Ikaros. Tal y como demuestran nuestros resultados y Agoston y col (2007), la ausencia de Ikaros no afecta a la totalidad de las neuronas encefalinas positivas, únicamente un porcentaje. Así pues, otros factores de transcripción estarán participando en el control de la correcta generación de las neuronas de proyección estriatales encefalina positivas. El análisis de otro modelo animal transgénico el cual sobreexpresa una isoforma aberrante de Ikaros que permite actuar como dominante negativo de la familia Ikaros revela una mayor reducción de neuronas encefalinas positivas (Agoston y col., 2007). Así pues, podríamos postular que este animal presentaría una alteración de otros miembros de la familia Ikaros. Como ya se ha mostrado en esta tesis, Helios se expresa en la EGL en desarrollo. Además, en el sistema hematopoyético existen mecanismos compensatorios entre Helios e Ikaros (Zhang y col., 2007). A pesar que estas evidencias podrían explicar la afectación selectiva de la población encefalinérgica en los animales deficientes para Ikaros, nuestros resultados muestran que Helios e Ikaros se expresan en diferentes células. Además, en el desarrollo de la EGL no existe ningún tipo de mecanismo compensatorio ya que la expresión de Helios es similar en los animales deficientes de Ikaros y los controles. Así pues, la selectividad de afectación de la población encefalinérgica podría ser debida a alteraciones en otros factores involucrados en la diferenciación de las neuronas encefalinas positivas (Agoston y Dobi, 2000).

3 – HELIOS E IKAROS ACTÚAN SECUENCIALMENTE PARA PROMOVER LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL EN EL DESARROLLO DE LA EGL

Helios e Ikaros regulan los genes dianas realizando un control transcripcional de los mismos. Existen dos mecanismos de acción para realizar el control de la expresión génica: la unión directa sobre promotor del gen específico (como la actuación a nivel del gen de la encefalina mencionado anteriormente) o la regulación a nivel de la remodelación de la cromatina (Kim y col., 1999; Koipally y col., 1999).

La dimerización de moléculas es un requisito previo y necesario para la correcta actuación de todos los miembros de la familia Ikaros (Sun y col., 1996). La formación de complejos homo o heteroméricos por parte de los miembros de la familia permite un exhaustivo control transcripcional en los linajes hematopoyéticos (Kelley y col., 1998). Sin embargo, a lo largo de desarrollo de la EGL, no encontramos ninguna célula Helios

positiva que coexpresen Ikaros. Este resultado nos sugiere que en el SNC las dos proteínas no heterodimerizan para realizar la acción sobre el control transcripcional. Sin embargo, sí que encontramos una relación de expresión entre Helios e Ikaros en el desarrollo de la EGL. Los resultados de expresión génica corroboran que Helios induce la expresión de Ikaros, el cual a su vez, inhibe la de Helios mostrando un bucle de regulación negativa. Con todos estos resultados, podemos postular que, a diferencia de la heterodimerización necesaria en el sistema hematopoyético (Hahm y col., 1998), en el desarrollo de la EGL se formarían homodímeros de Helios e Ikaros con el objetivo de realizar su función de regulación transcripcional. Además, estos experimentos demuestran que existe una relación entre los miembros de la familia de factores de transcripción de Ikaros. La expresión de Helios precedería a la expresión de Ikaros durante el desarrollo de la EGL. Corroborando esta hipótesis, Helios presenta una expresión en la ZSV y en la ZM mientras que Ikaros está totalmente restringido a la ZM. De manera similar a los resultados observados con la sobreexpresión de Ikaros, la sobreexpresión de Helios en cultivos primarios induce la diferenciación terminal hacia neuronas encefalinas positivas. Junto a todos estos resultados observamos que la sobreexpresión de Helios en cultivos primarios procedentes de animales deficientes de Ikaros es incapaz de modificar la población neuronal encefalina positiva. Con todo esto, podemos postular que Ikaros debe estar presente para que Helios pueda realizar su función neurogénica.

Los genes proneurales descritos actualmente que actúan durante el desarrollo embrionario de la EGL forman parte de una misma familia de factores de transcripción, la familia bHLH. Los miembros de esta familia confieren a los progenitores las características neuronales genéricas. Y, además, una identidad de subpoblación específica apropiada a la localización y temporalidad en la que se encuentren los progenitores en el momento de expresión de estas proteínas (Bertrand y col., 2002). Analizando los resultados obtenidos en los estudios con Helios e Ikaros, sería plausible proponer la familia de factores de transcripción Ikaros como inductores del linaje neuronal. Helios e Ikaros actúan de manera coordinada para inducir una diferenciación neuronal durante el desarrollo embrionario de la EGL.

4 – LOS MIEMBROS DE LA FAMILIA IKAROS PARTICIPAN EN EL CONTROL DEL PATRÓN DE DIFERENCIACIÓN DE LA EGL

Los miembros de la familia de Ikaros han estado implicados en el control de la diferenciación de los precursores de diferentes sistemas tales como el hematopoyético (Nutt y Kee, 2007), neuroendocrino (Ezzat y Asa, 2008) o en SNC (Agoston y col., 2007; Elliott y col., 2008). La implicación de los miembros de la familia Ikaros en cada uno de los sistemas es específica y determinada por el contexto. Así pues, mientras Ikaros regula la competencia temprana de los progenitores de la retina (Elliott y col., 2008), nuestros resultados muestran que en la EGL estarían implicados en la determinación de neuronas encefalinérgicas nacidas durante la segunda oleada de neurogénesis (Mason y col., 2005).

La acción tanto de Helios como de Ikaros no se desarrollan de manera aislada sino que están enmarcadas dentro de un engranaje de factores de transcripción que están implicados en el desarrollo de la EGL (Merkle y Alvarez-Buylla, 2006). Una de las vías que está más estudiada y que participa en la diferenciación de las neuronas originadas en la segunda oleada de neurogénesis es la vía Dlx. (Anderson y col., 1997). Los miembros de la familia Dlx, Dlx1/2, están altamente expresados en los precursores localizados en la ZSV (Bulfone y col., 1993; Einsensat y col., 1999) y a medida que maduran, expresan los miembros Dlx5/6 y abandonan la ZSV para ocupar la ZM (Nery y col., 2003) donde residen las células postmitóticas. Nuestros resultados muestran que tanto Helios como Ikaros ejercen su función río abajo de la expresión de Dlx1/2. En los animales deficientes para Dlx1/2 desaparece la expresión tanto de Helios como de Ikaros en la EGL; sin embargo, la expresión de Helios se mantiene en otras áreas del SNC como la corteza (presente tesis; Long y col., 2009). Con respecto a Dlx5/6, la relación de Helios e Ikaros es diferente. Mientras que Helios parece expresarse de manera independiente o río arriba de Dlx5/6, Ikaros se expresa en células de la ZM que han expresado anteriormente estos miembros de la familia Dlx. Parece plausible postular que los progenitores que darán lugar a neuronas de la segunda oleada de neurogénesis, primeramente expresan el factor Dlx1/2 y posteriormente se activa la expresión de Helios encarando los progenitores a una diferenciación neuronal. Debido a que la mayoría de las neuronas de proyección derivan de las células Dlx5/6 (Stenman y col., 2003), suponemos que Helios se situaría río arriba de Dlx5/6 expresándose en un neuroblasto intermedio. La posterior expresión de Dlx5/6 permitiría a los progenitores a migrar (Cobos y col., 2007) y ya en la ZM

activar la transcripción de la proteína Ikaros con tal de diferenciar las neuronas de proyección al subtipo encefalinérgico.

Los mecanismos implicados en el control de la diferenciación de estas neuronas de proyección encefalinérgicas son variados y difíciles de esclarecer debido al gran abanico de factores que se expresan. La activación de una proteína o de otra no es automática, es decir, no es una activación y represión instantánea. En todo proceso existe una escala de grises que no podemos obviar y que dificulta el estudio y la descripción completa del mecanismo de acción.

Otro factor de transcripción que regula la diferenciación de neuronas de proyección de la EGL es Ebf-1. Ebf-1 se expresa en la matriz de la ZM (Garel y col., 1999) y participa en la regulación de la salida de ciclo celular durante la diferenciación de las neuronas sustancia P positivas originadas de la primera oleada de neurogénesis (García-Domínguez y col., 2003; Lobo y col., 2006). En el análisis del animal deficiente para Ebf-1 no se ha observado ninguna alteración en la expresión ni de Helios ni de Ikaros. Además, la proteína Ebf-1 no se encuentra alterada en los animales deficientes de Ikaros. En el caso de Ikaros, los resultados muestran que las dos proteínas están expresadas en dos vías de señalización diferente. En cambio, la única relación que podemos extrapolar en el caso de Helios es que la expresión de Helios no precisa de la previa expresión de Ebf-1. Así pues, observando todos estos resultados conjuntamente, podemos concluir que hay diferentes vías de control transcripcional que controlan la diferenciación neuronal de la primera oleada (neuronas sustancia P positivas) y de la segunda oleada de neurogénesis (neuronas encefalina positivas).

Con el objetivo de integrar los resultados de esta tesis en el conocimiento del control de la formación embrionaria del estriado, se sugiere un modelo de diferenciación de las neuronas de proyección estriatales en el cual se integran aquellos factores de transcripción que se habían descrito hasta el momento, y la posible función de los miembros de la familia Ikaros (figura 43).

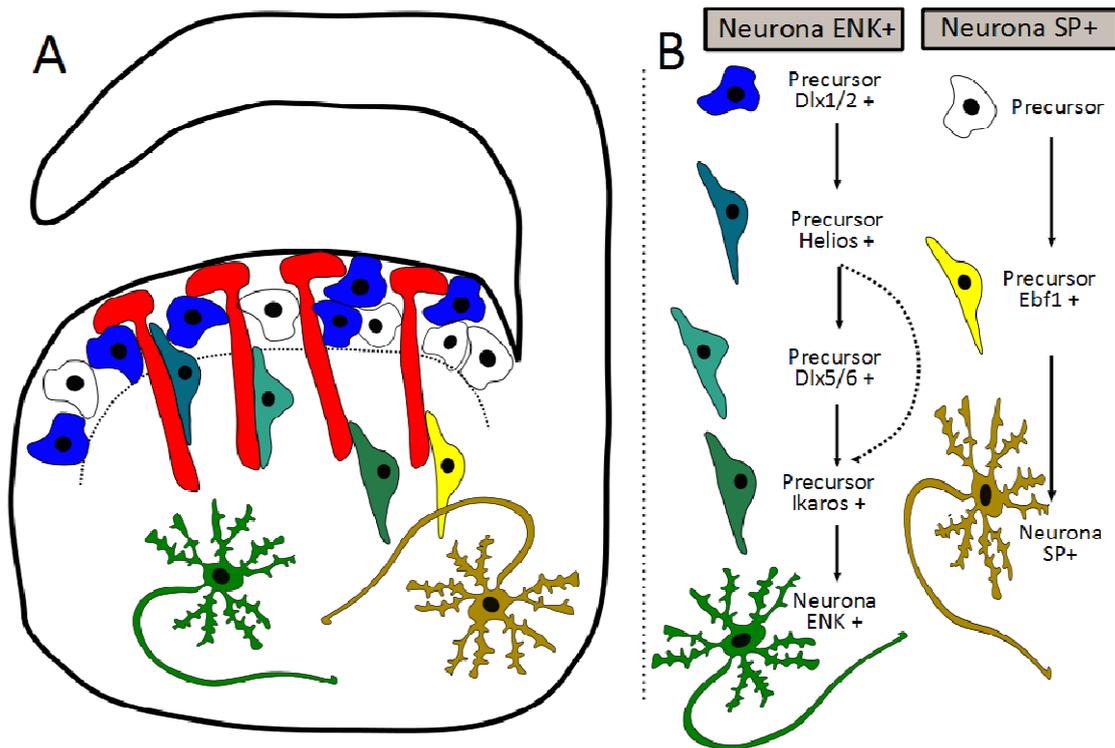


Figura 43: Esquemización de los factores de transcripción que actúan durante el desarrollo embrionario de la EGL. (A) Dentro de la ZSV, la expresión de determinados factores de transcripción determinan la diferenciación terminal. Así pues, los progenitores Dlx1/2+ (azul) activan la expresión de Helios que a su vez o de manera independiente activará la expresión de Dlx5/6 e Ikaros para formar neuronas maduras Encefalina+ (ENK; degradación verde). En cambio, los progenitores que no expresan Dlx1/2 posteriormente expresarán Ebf-1 y formarán las neuronas de proyección SP+(degradación amarillo). (B) Esquema representativo de las vías propuestas tras analizar los resultados presentados en esta tesis. ENK+: encefalina positiva; SP+: sustancia P positiva.

En las primeras etapas de estriogénesis, los precursores de la ZV de la EGL se caracterizan por la ausencia de expresión del factor de transcripción bHLH, Mash1 (Yun y col., 2002). Durante el proceso de especificación neuronal, los progenitores neurales pasan a expresar Mash1 restringiendo así la diferenciación hacia la estirpe neuronal (Yun y col., 2002). Así pues, dentro de la población Mash1 positiva se crearán dos subpoblaciones de progenitores dependiendo de la vía de señalización que activen en cada caso. En las primeras etapas de neurogénesis, dentro de la primera oleada, los progenitores de la ZSV Mash1 positivas activarán la expresión de la proteína Ebf-1 con la finalidad de conseguir la diferenciación de neuronas sustancia P positivas que ocuparán la matriz del estriado en formación. Posteriormente, durante la segunda oleada de neurogénesis, los precursores Mash1 positivos y Ebf-1 negativos activan la

expresión de Dlx1/2 con tal de encarar la diferenciación a neuronas de proyección que de la segunda oleada de neurogénesis (Poitras y col., 2007). Tras la activación de Dlx1/2 en la ZSV, la vía de señalización avanzará activando la expresión de Helios que, de manera secuencial, disparará la expresión de Dlx5/6. Los progenitores de la ZSV abandonarán el ciclo celular para ocupar así la ZM y activar la expresión de Dlx5/6. Únicamente una subpoblación de estas células Dlx5/6 positivas disparará la expresión de Ikaros con la finalidad de diferenciar estas neuronas de proyección hacia una subpoblación específica de neuronas encefalina positivas. Así pues, dentro de todo el proceso de embriogénesis, existen diferentes subpoblaciones de progenitores que darán lugar a diferentes las diferentes poblaciones neuronales maduras.

Tan sólo conocemos unas pocas piezas del complejo puzzle que caracteriza la diferenciación estriatal; a medida que se describan nuevas proteínas y nuevas relaciones entre ellas seremos capaces de colocar todas las piezas. Sólo conociendo a la perfección los procesos que se llevan a cabo durante el desarrollo embrionario, podremos avanzar en el campo de la medicina regenerativa. Los resultados presentados en la presente tesis permiten postular que los miembros de la familia Ikaros pueden constituir una herramienta fundamental para la terapia regenerativa de determinadas enfermedades estriatales como sería el caso de la enfermedad de Huntington.

VI. CONCLUSIONES

1. – Durante el desarrollo embrionario de la EGL, Helios e Ikaros muestran un patrón de expresión diferente, sugiriendo un papel distinto en la neurogénesis estriatal.
2. – Helios se expresa tanto en precursores neurales como en neuroblastos pero está totalmente excluido en áreas con expresión de marcadores astrocitarios.
3. – Helios regula negativamente la proliferación de precursores neurales favoreciendo la diferenciación neuronal a expensas de la astrocitaria.
4. – Ikaros promueve la salida de ciclo celular de los precursores neurales de la EGL a través de la regulación positiva de la ciclina reguladora de ciclo p21^{Cip/Waf1}.
5. – Ikaros participa en la generación de neuronas encefalina positivas generadas durante la segunda oleada de neurogénesis.
6. – Ikaros induce la diferenciación neuronal a expensas de la diferenciación astrocitaria.
7. – Helios e Ikaros actúan secuencialmente durante el desarrollo de la EGL, siendo indispensable la presencia de Ikaros para que Helios pueda realizar su función.
8. – Helios e Ikaros participan en la generación de neuronas de proyección originadas a partir de progenitores Dlx1/2 positivos y mantienen una relación distinta con los factores Dlx5/6. En cambio, son independientes al factor de transcripción Ebf-1.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Agoston, D. V. and A. Dobi. 2000. Complexity of transcriptional control in neuropeptide gene expression; enkephalin gene regulation during neurodevelopment. *Biochem. Soc. Trans.* 28:446-451.
- Agoston, D. V., M. Szemes, A. Dobi, M. Palkovits, K. Georgopoulos, A. Gyorgy, and M. A. Ring. 2007. Ikaros is expressed in developing striatal neurons and involved in enkephalinergic differentiation. *J. Neurochem.* 102:1805-1816.
- Alberch, J., E. Perez-Navarro, and J. M. Canals. 2002. Neuroprotection by neurotrophins and GDNF family members in the excitotoxic model of Huntington's disease. *Brain Res. Bull.* 57:817-822.
- Alberch, J., E. Perez-Navarro, and J. M. Canals. 2004. Neurotrophic factors in Huntington's disease. *Prog. Brain Res.* 146:195-229.
- Alberta, J. A., S. K. Park, J. Mora, D. Yuk, I. Pawlitzky, P. Iannarelli, T. Vartanian, C. D. Stiles, and D. H. Rowitch. 2001. Sonic hedgehog is required during an early phase of oligodendrocyte development in mammalian brain. *Mol. Cell Neurosci.* 18:434-441.
- Anderson, S. A., M. Qiu, A. Bulfone, D. D. Eisenstat, J. Meneses, R. Pedersen, and J. L. Rubenstein. 1997. Mutations of the homeobox genes *Dlx-1* and *Dlx-2* disrupt the striatal subventricular zone and differentiation of late born striatal neurons. *Neuron* 19:27-37.
- Aoto, K., T. Nishimura, K. Eto, and J. Motoyama. 2002. Mouse *GLI3* regulates *Fgf8* expression and apoptosis in the developing neural tube, face, and limb bud. *Dev. Biol.* 251:320-332.
- Bachoud-Levi, A. C., V. Gaura, P. Brugieres, J. P. Lefaucheur, M. F. Boisse, P. Maison, S. Baudic, M. J. Ribeiro, C. Bourdet, P. Remy, P. Cesaro, P. Hantraye, and M. Peschanski. 2006. Effect of fetal neural transplants in patients with Huntington's disease 6 years after surgery: a long-term follow-up study. *Lancet Neurol.* 5:303-309.
- Barres, B. A. and M. C. Raff. 1994. Control of oligodendrocyte number in the developing rat optic nerve. *Neuron* 12:935-942.
- Bayer, S. A. and J. Altman. 1991. Development of the endopiriform nucleus and the claustrum in the rat brain. *Neuroscience* 45:391-412.
- Bellavia, D., M. Mecarozzi, A. F. Campese, P. Grazioli, A. Gulino, and I. Screpanti. 2007. Notch and Ikaros: not only converging players in T cell leukemia. *Cell Cycle* 6:2730-2734.
- Bellavia, D., M. Mecarozzi, A. F. Campese, P. Grazioli, C. Talora, L. Frati, A. Gulino, and I. Screpanti. 2007. Notch3 and the Notch3-upregulated RNA-binding protein HuD regulate Ikaros alternative splicing. *EMBO J.* 26:1670-1680.
- Bellion, A., J. P. Baudoin, C. Alvarez, M. Bornens, and C. Metin. 2005. Nucleokinesis in tangentially migrating neurons comprises two alternating phases: forward migration of the Golgi/centrosome associated with centrosome splitting and myosin contraction at the rear. *J. Neurosci.* 25:5691-5699.
- Bennett, B. D. and J. P. Bolam. 1993. Characterization of calretinin-immunoreactive structures in the striatum of the rat. *Brain Res.* 609:137-148.
- Bertrand, N., D. S. Castro, and F. Guillemot. 2002. Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat. Rev. Neurosci.* 3:517-530.

BIBLIOGRAFÍA

- Bhide, P. G., M. Day, E. Sapp, C. Schwarz, A. Sheth, J. Kim, A. B. Young, J. Penney, J. Golden, N. Aronin, and M. DiFiglia. 1996. Expression of normal and mutant huntingtin in the developing brain. *J. Neurosci.* 16:5523-5535.
- Bloom, J. and F. R. Cross. 2007. Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:149-160.
- Bohner, A. P., R. M. Akers, and S. K. McConnell. 1997. Induction of deep layer cortical neurons in vitro. *Development* 124:915-923.
- Bolam, J. P. and P. N. Izzo. 1988. The postsynaptic targets of substance P-immunoreactive terminals in the rat neostriatum with particular reference to identified spiny striatonigral neurons. *Exp. Brain Res.* 70:361-377.
- Bolam, J. P., J. J. Hanley, P. A. Booth, and M. D. Bevan. 2000. Synaptic organisation of the basal ganglia. *J. Anat.* 196 (Pt 4):527-542.
- Bonni, A., Y. Sun, M. Nadal-Vicens, A. Bhatt, D. A. Frank, I. Rozovsky, N. Stahl, G. D. Yancopoulos, and M. E. Greenberg. 1997. Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway. *Science* 278:477-483.
- Borello, U., I. Cobos, J. E. Long, J. R. McWhirter, C. Murre, and J. L. Rubenstein. 2008. FGF15 promotes neurogenesis and opposes FGF8 function during neocortical development. *Neural Dev.* 3:17.
- Brugarolas, J., C. Chandrasekaran, J. I. Gordon, D. Beach, T. Jacks, and G. J. Hannon. 1995. Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* 377:552-557.
- Bulfone, A., H. J. Kim, L. Puellas, M. H. Porteus, J. F. Grippo, and J. L. Rubenstein. 1993. The mouse *Dlx-2* (*Tes-1*) gene is expressed in spatially restricted domains of the forebrain, face and limbs in midgestation mouse embryos. *Mech. Dev.* 40:129-140.
- Busslinger, M. 2004. Transcriptional control of early B cell development. *Annu. Rev. Immunol.* 22:55-79.
- Canals, J. M., J. R. Pineda, J. F. Torres-Peraza, M. Bosch, R. Martin-Ibanez, M. T. Munoz, G. Mengod, P. Ernfors, and J. Alberch. 2004. Brain-derived neurotrophic factor regulates the onset and severity of motor dysfunction associated with enkephalinergic neuronal degeneration in Huntington's disease. *J. Neurosci.* 24:7727-7739.
- Canzoniere, D., S. Farioli-Vecchioli, F. Conti, M. T. Ciotti, A. M. Tata, G. Augusti-Tocco, E. Mattei, M. K. Lakshmana, V. Krizhanovsky, S. A. Reeves, R. Giovannoni, F. Castano, A. Servadio, N. Ben Arie, and F. Tirone. 2004. Dual control of neurogenesis by PC3 through cell cycle inhibition and induction of *Math1*. *J. Neurosci.* 24:3355-3369.
- Carney, R. S., L. A. Cocas, T. Hirata, K. Mansfield, and J. G. Corbin. 2009. Differential regulation of telencephalic pallial-subpallial boundary patterning by *Pax6* and *Gsh2*. *Cereb. Cortex* 19:745-759.
- Casarosa, S., C. Fode, and F. Guillemot. 1999. *Mash1* regulates neurogenesis in the ventral telencephalon. *Development* 126:525-534.
- Chandran, S., H. Kato, D. Gerreli, A. Compston, C. N. Svendsen, and N. D. Allen. 2003. FGF-dependent generation of oligodendrocytes by a hedgehog-independent pathway. *Development* 130:6599-6609.
- Chedotal, A. and F. M. Rijli. 2009. Transcriptional regulation of tangential neuronal migration in the developing forebrain. *Curr. Opin. Neurobiol.* 19:139-145.

- Chenn, A. and S. K. McConnell. 1995. Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis. *Cell* 82:631-641.
- Chesselet, M. F. and A. M. Graybiel. 1986. Striatal neurons expressing somatostatin-like immunoreactivity: evidence for a peptidergic interneuronal system in the cat. *Neuroscience* 17:547-571.
- Chiang, C., Y. Litingtung, E. Lee, K. E. Young, J. L. Corden, H. Westphal, and P. A. Beachy. 1996. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383:407-413.
- Cleary, M. D. and C. Q. Doe. 2006. Regulation of neuroblast competence: multiple temporal identity factors specify distinct neuronal fates within a single early competence window. *Genes Dev.* 20:429-434.
- Cobos, I., U. Borello, and J. L. Rubenstein. 2007. Dlx transcription factors promote migration through repression of axon and dendrite growth. *Neuron* 54:873-888.
- Corbin, J. G., M. Rutlin, N. Gaiano, and G. Fishell. 2003. Combinatorial function of the homeodomain proteins Nkx2.1 and Gsh2 in ventral telencephalic patterning. *Development* 130:4895-4906.
- Corbin, J. G., N. Gaiano, S. L. Juliano, S. Poluch, E. Stancik, and T. F. Haydar. 2008. Regulation of neural progenitor cell development in the nervous system. *J. Neurochem.* 106:2272-2287.
- Correa, F. M., R. B. Innis, L. D. Hester, and S. H. Snyder. 1981. Diffuse enkephalin innervation from caudate to globus pallidus. *Neurosci. Lett.* 25:63-68.
- Cowan, R. L., C. J. Wilson, P. C. Emson, and C. W. Heizmann. 1990. Parvalbumin-containing GABAergic interneurons in the rat neostriatum. *J. Comp Neurol.* 302:197-205.
- Crossley, P. H. and G. R. Martin. 1995. The mouse Fgf8 gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development* 121:439-451.
- Cuello, A. C. and G. Paxinos. 1978. Evidence for a long Leu-enkephalin striopallidal pathway in rat brain. *Nature* 271:178-180.
- Dang, L. and V. Tropepe. 2006. Neural induction and neural stem cell development. *Regen. Med.* 1:635-652.
- Demarest, R. M., F. Ratti, and A. J. Capobianco. 2008. It's T-ALL about Notch. *Oncogene* 27:5082-5091.
- DiFiglia, M., E. Sapp, K. O. Chase, S. W. Davies, G. P. Bates, J. P. Vonsattel, and N. Aronin. 1997. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 277:1990-1993.
- Dobi, A., M. Palkovits, M. A. Ring, A. Eitel, C. G. Palkovits, F. Lim, and D. V. Agoston. 1997. Sample and probe: a novel approach for identifying development-specific cis-elements of the enkephalin gene. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 52:98-111.
- Doetsch, F., J. M. Verdugo, I. Caille, A. Alvarez-Buylla, M. V. Chao, and P. Casaccia-Bonnel. 2002. Lack of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 results in selective increase of transit-amplifying cells for adult neurogenesis. *J. Neurosci.* 22:2255-2264.

- Donoghue, J. P. and M. Herkenham. 1986. Neostriatal projections from individual cortical fields conform to histochemically distinct striatal compartments in the rat. *Brain Res.* 365:397-403.
- Dore, J. J., J. C. DeWitt, N. Setty, M. D. Donald, E. Joo, M. A. Chesarone, and S. J. Birren. 2009. Multiple signaling pathways converge to regulate bone-morphogenetic-protein-dependent glial gene expression. *Dev. Neurosci.* 31:473-486.
- Duyao, M., C. Ambrose, R. Myers, A. Novelletto, F. Persichetti, M. Frontali, S. Folstein, C. Ross, M. Franz, M. Abbott, and . 1993. Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease. *Nat. Genet.* 4:387-392.
- Echelard, Y., D. J. Epstein, B. St Jacques, L. Shen, J. Mohler, J. A. McMahon, and A. P. McMahon. 1993. Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75:1417-1430.
- Echevarria, D., J. A. Belo, and S. Martinez. 2005. Modulation of Fgf8 activity during vertebrate brain development. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 49:150-157.
- Edlund, T. and T. M. Jessell. 1999. Progression from extrinsic to intrinsic signaling in cell fate specification: a view from the nervous system. *Cell* 96:211-224.
- Eisenstat, D. D., J. K. Liu, M. Mione, W. Zhong, G. Yu, S. A. Anderson, I. Ghattas, L. Puellas, and J. L. Rubenstein. 1999. DLX-1, DLX-2, and DLX-5 expression define distinct stages of basal forebrain differentiation. *J. Comp Neurol.* 414:217-237.
- Elliott, J., C. Jolicoeur, V. Ramamurthy, and M. Cayouette. 2008. Ikaros confers early temporal competence to mouse retinal progenitor cells. *Neuron* 60:26-39.
- Eswarakumar, V. P., I. Lax, and J. Schlessinger. 2005. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16:139-149.
- Ezzat, S., R. Mader, S. Fischer, S. Yu, C. Ackerley, and S. L. Asa. 2006. An essential role for the hematopoietic transcription factor Ikaros in hypothalamic-pituitary-mediated somatic growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103:2214-2219.
- Ezzat, S. and S. L. Asa. 2008. The emerging role of the Ikaros stem cell factor in the neuroendocrine system. *J. Mol. Endocrinol.* 41:45-51.
- Farah, M. H., J. M. Olson, H. B. Sucic, R. I. Hume, S. J. Tapscott, and D. L. Turner. 2000. Generation of neurons by transient expression of neural bHLH proteins in mammalian cells. *Development* 127:693-702.
- Fero, M. L., M. Rivkin, M. Tasch, P. Porter, C. E. Carow, E. Firpo, K. Polyak, L. H. Tsai, V. Broudy, R. M. Perlmutter, K. Kaushansky, and J. M. Roberts. 1996. A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell* 85:733-744.
- Ferrante, R. J., N. W. Kowall, M. F. Beal, E. P. Richardson, Jr., E. D. Bird, and J. B. Martin. 1985. Selective sparing of a class of striatal neurons in Huntington's disease. *Science* 230:561-563.
- Ferrante, R. J., N. W. Kowall, M. F. Beal, J. B. Martin, E. D. Bird, and E. P. Richardson, Jr. 1987. Morphologic and histochemical characteristics of a spared subset of striatal neurons in Huntington's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 46:12-27.

- Ferrante, R. J., N. W. Kowall, and E. P. Richardson, Jr. 1991. Proliferative and degenerative changes in striatal spiny neurons in Huntington's disease: a combined study using the section-Golgi method and calbindin D28k immunocytochemistry. *J. Neurosci.* 11:3877-3887.
- Ferrante, R. J. 2009. Mouse models of Huntington's disease and methodological considerations for therapeutic trials. *Biochim. Biophys. Acta* 1792:506-520.
- Flames, N., J. E. Long, A. N. Garratt, T. M. Fischer, M. Gassmann, C. Birchmeier, C. Lai, J. L. Rubenstein, and O. Marin. 2004. Short- and long-range attraction of cortical GABAergic interneurons by neuregulin-1. *Neuron* 44:251-261.
- Fode, C., Q. Ma, S. Casarosa, S. L. Ang, D. J. Anderson, and F. Guillemot. 2000. A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons. *Genes Dev.* 14:67-80.
- Fukuda, S., F. Kato, Y. Tozuka, M. Yamaguchi, Y. Miyamoto, and T. Hisatsune. 2003. Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *J. Neurosci.* 23:9357-9366.
- Fukuda, S. and T. Taga. 2005. Cell fate determination regulated by a transcriptional signal network in the developing mouse brain. *Anat. Sci. Int.* 80:12-18.
- Gaiano, N. and G. Fishell. 2002. The role of notch in promoting glial and neural stem cell fates. *Annu. Rev. Neurosci.* 25:471-490.
- Garcia-Dominguez, M., C. Poquet, S. Garel, and P. Charnay. 2003. Ebf gene function is required for coupling neuronal differentiation and cell cycle exit. *Development* 130:6013-6025.
- Garel, S., F. Marin, R. Grosschedl, and P. Charnay. 1999. Ebf1 controls early cell differentiation in the embryonic striatum. *Development* 126:5285-5294.
- Georgopoulos, K. 1997. Transcription factors required for lymphoid lineage commitment. *Curr. Opin. Immunol.* 9:222-227.
- Gerfen, C. R. 1984. The neostriatal mosaic: compartmentalization of corticostriatal input and striatonigral output systems. *Nature* 311:461-464.
- Gerfen, C. R., K. G. Baimbridge, and J. J. Miller. 1985. The neostriatal mosaic: compartmental distribution of calcium-binding protein and parvalbumin in the basal ganglia of the rat and monkey. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 82:8780-8784.
- Gerfen, C. R. 1992. The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia. *Annu. Rev. Neurosci.* 15:285-320.
- Ghanem, N., M. Yu, J. Long, G. Hatch, J. L. Rubenstein, and M. Ekker. 2007. Distinct cis-regulatory elements from the *Dlx1/Dlx2* locus mark different progenitor cell populations in the ganglionic eminences and different subtypes of adult cortical interneurons. *J. Neurosci.* 27:5012-5022.
- Giralt, A., H. C. Friedman, B. Caneda-Ferron, N. Urban, E. Moreno, N. Rubio, J. Blanco, A. Peterson, J. M. Canals, and J. Alberch. 2010. BDNF regulation under GFAP promoter provides engineered astrocytes as a new approach for long-term protection in Huntington's disease. *Gene Ther.*
- Glickstein, S. B., J. A. Monaghan, H. B. Koeller, T. K. Jones, and M. E. Ross. 2009. Cyclin D2 is critical for intermediate progenitor cell proliferation in the embryonic cortex. *J. Neurosci.* 29:9614-9624.

BIBLIOGRAFÍA

- Gomez-del Arco, P., K. Maki, and K. Georgopoulos. 2004. Phosphorylation controls Ikaros's ability to negatively regulate the G(1)-S transition. *Mol. Cell Biol.* 24:2797-2807.
- Goto, T., T. Mitsuhashi, and T. Takahashi. 2004. Altered patterns of neuron production in the p27 knockout mouse. *Dev. Neurosci.* 26:208-217.
- Gotz, M. and W. B. Huttner. 2005. The cell biology of neurogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6:777-788.
- Graybiel, A. M. and C. W. Ragsdale, Jr. 1978. Histochemically distinct compartments in the striatum of human, monkeys, and cat demonstrated by acetylthiocholinesterase staining. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 75:5723-5726.
- Graybiel, A. M. 1986. Neuropeptides in the basal ganglia. *Res. Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.* 64:135-161.
- Graybiel, A. M., F. C. Liu, and S. B. Dunnett. 1989. Intrastratial grafts derived from fetal striatal primordia. I. Phenotypy and modular organization. *J. Neurosci.* 9:3250-3271.
- Graybiel, A. M. 2000. The basal ganglia. *Curr. Biol.* 10:R509-R511.
- Grove, E. A., S. Tole, J. Limon, L. Yip, and C. W. Ragsdale. 1998. The hem of the embryonic cerebral cortex is defined by the expression of multiple Wnt genes and is compromised in Gli3-deficient mice. *Development* 125:2315-2325.
- Guillemot, F. 2007. Cell fate specification in the mammalian telencephalon. *Prog. Neurobiol.* 83:37-52.
- Gunhaga, L., T. M. Jessell, and T. Edlund. 2000. Sonic hedgehog signaling at gastrula stages specifies ventral telencephalic cells in the chick embryo. *Development* 127:3283-3293.
- Gutin, G., M. Fernandes, L. Palazzolo, H. Paek, K. Yu, D. M. Ornitz, S. K. McConnell, and J. M. Hebert. 2006. FGF signalling generates ventral telencephalic cells independently of SHH. *Development* 133:2937-2946.
- Hahm, K., B. S. Cobb, A. S. McCarty, K. E. Brown, C. A. Klug, R. Lee, K. Akashi, I. L. Weissman, A. G. Fisher, and S. T. Smale. 1998. Helios, a T cell-restricted Ikaros family member that quantitatively associates with Ikaros at centromeric heterochromatin. *Genes Dev.* 12:782-796.
- Harlan, R. E., M. M. Garcia, and J. E. Krause. 1989. Cellular localization of substance P- and neurokinin A-encoding preprotachykinin mRNA in the female rat brain. *J. Comp Neurol.* 287:179-212.
- Hatten, M. E. and C. A. Mason. 1990. Mechanisms of glial-guided neuronal migration in vitro and in vivo. *Experientia* 46:907-916.
- Haubensak, W., A. Attardo, W. Denk, and W. B. Huttner. 2004. Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101:3196-3201.
- He, F., W. Ge, K. Martinowich, S. Becker-Catania, V. Coskun, W. Zhu, H. Wu, D. Castro, F. Guillemot, G. Fan, J. de Vellis, and Y. E. Sun. 2005. A positive autoregulatory loop of Jak-STAT signaling controls the onset of astroglialogenesis. *Nat. Neurosci.* 8:616-625.

- Hebert, J. M. and G. Fishell. 2008. The genetics of early telencephalon patterning: some assembly required. *Nat. Rev. Neurosci.* 9:678-685.
- Herkenham, M. and C. B. Pert. 1981. Mosaic distribution of opiate receptors, parafascicular projections and acetylcholinesterase in rat striatum. *Nature* 291:415-418.
- Hirata, H., T. Ohtsuka, Y. Bessho, and R. Kageyama. 2000. Generation of structurally and functionally distinct factors from the basic helix-loop-helix gene *Hes3* by alternative first exons. *J. Biol. Chem.* 275:19083-19089.
- Hitoshi, S., T. Alexson, V. Tropepe, D. Donoviel, A. J. Elia, J. S. Nye, R. A. Conlon, T. W. Mak, A. Bernstein, and K. D. Van der. 2002. Notch pathway molecules are essential for the maintenance, but not the generation, of mammalian neural stem cells. *Genes Dev.* 16:846-858.
- Hoch, R. V., J. L. Rubenstein, and S. Pleasure. 2009. Genes and signaling events that establish regional patterning of the mammalian forebrain. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20:378-386.
- Ince, E., B. J. Ciliax, and A. I. Levey. 1997. Differential expression of D1 and D2 dopamine and m4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in identified striatonigral neurons. *Synapse* 27:357-366.
- Ishibashi, M., K. Moriyoshi, Y. Sasai, K. Shiota, S. Nakanishi, and R. Kageyama. 1994. Persistent expression of helix-loop-helix factor HES-1 prevents mammalian neural differentiation in the central nervous system. *EMBO J.* 13:1799-1805.
- Iso, T., L. Kedes, and Y. Hamamori. 2003. HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J. Cell Physiol* 194:237-255.
- Iwata, T. and R. F. Hevner. 2009. Fibroblast growth factor signaling in development of the cerebral cortex. *Dev. Growth Differ.* 51:299-323.
- Jessell, T. M. 2000. Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat. Rev. Genet.* 1:20-29.
- Kageyama, R., T. Ohtsuka, J. Hatakeyama, and R. Ohsawa. 2005. Roles of bHLH genes in neural stem cell differentiation. *Exp. Cell Res.* 306:343-348.
- Kageyama, R., T. Ohtsuka, and T. Kobayashi. 2008. Roles of *Hes* genes in neural development. *Dev. Growth Differ.* 50 Suppl 1:S97-103.
- Kandel E., Schwartz J., Jessell T. *Principios de Neurociencia.* 4a ed. McGraw Hill-Interamericana (Madrid); 2001.
- Kano, G., A. Morimoto, M. Takanashi, S. Hibi, T. Sugimoto, T. Inaba, T. Yagi, and S. Imashuku. 2008. Ikaros dominant negative isoform (Ik6) induces IL-3-independent survival of murine pro-B lymphocytes by activating JAK-STAT and up-regulating Bcl-xl levels. *Leuk. Lymphoma* 49:965-973.
- Kathrein, K. L., R. Lorenz, A. M. Innes, E. Griffiths, and S. Winandy. 2005. Ikaros induces quiescence and T-cell differentiation in a leukemia cell line. *Mol. Cell Biol.* 25:1645-1654.
- Kawaguchi, Y., C. J. Wilson, S. J. Augood, and P. C. Emson. 1995. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci.* 18:527-535.

BIBLIOGRAFÍA

- Kelley, C. M., T. Ikeda, J. Koipally, N. Avitahl, L. Wu, K. Georgopoulos, and B. A. Morgan. 1998. Helios, a novel dimerization partner of Ikaros expressed in the earliest hematopoietic progenitors. *Curr. Biol.* 8:508-515.
- Kemp, J. M. and T. P. Powell. 1971. The synaptic organization of the caudate nucleus. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 262:403-412.
- Kempermann, G., H. G. Kuhn, and F. H. Gage. 1997. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386:493-495.
- Kessarlis, N., M. Fogarty, P. Iannarelli, M. Grist, M. Wegner, and W. D. Richardson. 2006. Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat. Neurosci.* 9:173-179.
- Kiehl, T. R., S. E. Fischer, S. Ezzat, and S. L. Asa. 2008. Mice lacking the transcription factor Ikaros display behavioral alterations of an anti-depressive phenotype. *Exp. Neurol.* 211:107-114.
- Kim, J., S. Sif, B. Jones, A. Jackson, J. Koipally, E. Heller, S. Winandy, A. Viel, A. Sawyer, T. Ikeda, R. Kingston, and K. Georgopoulos. 1999. Ikaros DNA-binding proteins direct formation of chromatin remodeling complexes in lymphocytes. *Immunity.* 10:345-355.
- Kippin, T. E., D. J. Martens, and K. D. Van der. 2005. p21 loss compromises the relative quiescence of forebrain stem cell proliferation leading to exhaustion of their proliferation capacity. *Genes Dev.* 19:756-767.
- Kirstetter, P., M. Thomas, A. Dierich, P. Kastner, and S. Chan. 2002. Ikaros is critical for B cell differentiation and function. *Eur. J. Immunol.* 32:720-730.
- Koipally, J., A. Renold, J. Kim, and K. Georgopoulos. 1999. Repression by Ikaros and Aiolos is mediated through histone deacetylase complexes. *EMBO J.* 18:3090-3100.
- Kreitzer, A. C. 2009. Physiology and pharmacology of striatal neurons. *Annu. Rev. Neurosci.* 32:127-147.
- Krezel, W., P. Kastner, and P. Chambon. 1999. Differential expression of retinoid receptors in the adult mouse central nervous system. *Neuroscience* 89:1291-1300.
- Kroll, T. T. and D. D. O'Leary. 2005. Ventralized dorsal telencephalic progenitors in Pax6 mutant mice generate GABA interneurons of a lateral ganglionic eminence fate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:7374-7379.
- Krushel, L. A., J. A. Connolly, and K. D. Van der. 1989. Pattern formation in the mammalian forebrain: patch neurons from the rat striatum selectively reassociate in vitro. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 47:137-142.
- Krushel, L. A., G. Fishell, and K. D. Van der. 1995. Pattern formation in the mammalian forebrain: striatal patch and matrix neurons intermix prior to compartment formation. *Eur. J. Neurosci.* 7:1210-1219.
- Kuschel, S., U. Ruther, and T. Theil. 2003. A disrupted balance between Bmp/Wnt and Fgf signaling underlies the ventralization of the Gli3 mutant telencephalon. *Dev. Biol.* 260:484-495.
- Lange, C. and F. Calegari. 2010. Cdks and cyclins link G(1) length and differentiation of embryonic, neural and hematopoietic stem cells. *Cell Cycle* 9.

- Le, T. N., G. Du, M. Fonseca, Q. P. Zhou, J. T. Wigle, and D. D. Eisenstat. 2007. Dlx homeobox genes promote cortical interneuron migration from the basal forebrain by direct repression of the semaphorin receptor neuropilin-2. *J. Biol. Chem.* 282:19071-19081.
- Lee, M. K., L. I. Rebhun, and A. Frankfurter. 1990. Posttranslational modification of class III beta-tubulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87:7195-7199.
- Levesque, M., A. Bedard, M. Cossette, and A. Parent. 2003. Novel aspects of the chemical anatomy of the striatum and its efferents projections. *J. Chem. Neuroanat.* 26:271-281.
- Lewis, S. J. and R. A. Barker. 2009. Understanding the dopaminergic deficits in Parkinson's disease: insights into disease heterogeneity. *J. Clin. Neurosci.* 16:620-625.
- Li, H., E. Wagner, P. McCaffery, D. Smith, A. Andreadis, and U. C. Drager. 2000. A retinoic acid synthesizing enzyme in ventral retina and telencephalon of the embryonic mouse. *Mech. Dev.* 95:283-289.
- Liao, W. L., H. C. Tsai, C. Y. Wu, and F. C. Liu. 2005. Differential expression of RARbeta isoforms in the mouse striatum during development: a gradient of RARbeta2 expression along the rostrocaudal axis. *Dev. Dyn.* 233:584-594.
- Liao, W. L., H. F. Wang, H. C. Tsai, P. Chambon, M. Wagner, A. Kakizuka, and F. C. Liu. 2005. Retinoid signaling competence and RARbeta-mediated gene regulation in the developing mammalian telencephalon. *Dev. Dyn.* 232:887-900.
- Liao, W. L., H. C. Tsai, H. F. Wang, J. Chang, K. M. Lu, H. L. Wu, Y. C. Lee, T. F. Tsai, H. Takahashi, M. Wagner, N. B. Ghyselinck, P. Chambon, and F. C. Liu. 2008. Modular patterning of structure and function of the striatum by retinoid receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105:6765-6770.
- Lie, D. C., H. Song, S. A. Colamarino, G. L. Ming, and F. H. Gage. 2004. Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44:399-421.
- Lin, H. and R. Grosschedl. 1995. Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF. *Nature* 376:263-267.
- Lindvall, O. and L. U. Wahlberg. 2008. Encapsulated cell biodelivery of GDNF: a novel clinical strategy for neuroprotection and neuroregeneration in Parkinson's disease? *Exp. Neurol.* 209:82-88.
- Litingtung, Y., R. D. Dahn, Y. Li, J. F. Fallon, and C. Chiang. 2002. Shh and Gli3 are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity. *Nature* 418:979-983.
- Lobo, M. K., S. L. Karsten, M. Gray, D. H. Geschwind, and X. W. Yang. 2006. FACS-array profiling of striatal projection neuron subtypes in juvenile and adult mouse brains. *Nat. Neurosci.* 9:443-452.
- Lobo, M. K., C. Yeh, and X. W. Yang. 2008. Pivotal role of early B-cell factor 1 in development of striatonigral medium spiny neurons in the matrix compartment. *J. Neurosci. Res.* 86:2134-2146.
- Long, J. E., C. Swan, W. S. Liang, I. Cobos, G. B. Potter, and J. L. Rubenstein. 2009. Dlx1&2 and Mash1 transcription factors control striatal patterning and differentiation through parallel and overlapping pathways. *J. Comp Neurol.* 512:556-572.

- Ma, S., S. Pathak, M. Mandal, L. Trinh, M. R. Clark, and R. Lu. 2010. Ikaros and Aiolos inhibit pre-B-cell proliferation by directly suppressing c-Myc expression. *Mol. Cell Biol.* 30:4149-4158.
- Machon, O., M. Backman, O. Machonova, Z. Kozmik, T. Vacik, L. Andersen, and S. Krauss. 2007. A dynamic gradient of Wnt signaling controls initiation of neurogenesis in the mammalian cortex and cellular specification in the hippocampus. *Dev. Biol.* 311:223-237.
- Mangale, V. S., K. E. Hirokawa, P. R. Satyaki, N. Gokulchandran, S. Chikbire, L. Subramanian, A. S. Shetty, B. Martynoga, J. Paul, M. V. Mai, Y. Li, L. A. Flanagan, S. Tole, and E. S. Monuki. 2008. Lhx2 selector activity specifies cortical identity and suppresses hippocampal organizer fate. *Science* 319:304-309.
- Marco, S., E. Perez-Navarro, E. Tolosa, E. Arenas, and J. Alberch. 2002. Striatopallidal neurons are selectively protected by neurturin in an excitotoxic model of Huntington's disease. *J. Neurobiol.* 50:323-332.
- Marin, O., A. Yaron, A. Bagri, M. Tessier-Lavigne, and J. L. Rubenstein. 2001. Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions. *Science* 293:872-875.
- Marin, O. and J. L. Rubenstein. 2001. A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat. Rev. Neurosci.* 2:780-790.
- Marin, O. and J. L. Rubenstein. 2003. Cell migration in the forebrain. *Annu. Rev. Neurosci.* 26:441-483.
- Marklund, M., M. Sjodal, B. C. Beehler, T. M. Jessell, T. Edlund, and L. Gunhaga. 2004. Retinoic acid signalling specifies intermediate character in the developing telencephalon. *Development* 131:4323-4332.
- Martin, J. B. and J. F. Gusella. 1986. Huntington's disease. Pathogenesis and management. *N. Engl. J. Med.* 315:1267-1276.
- Martinez-Serrano, A. and A. Bjorklund. 1997. Immortalized neural progenitor cells for CNS gene transfer and repair. *Trends Neurosci.* 20:530-538.
- Martinez, A. A., V. Zecchini, and K. Brennan. 2002. CSL-independent Notch signalling: a checkpoint in cell fate decisions during development? *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12:524-533.
- Martini, F. J., M. Valiente, B. G. Lopez, G. Szabo, F. Moya, M. Valdeolmillos, and O. Marin. 2009. Biased selection of leading process branches mediates chemotaxis during tangential neuronal migration. *Development* 136:41-50.
- Mason, H. A., S. M. Rakowiecki, M. Raftopoulou, S. Nery, Y. Huang, T. Gridley, and G. Fishell. 2005. Notch signaling coordinates the patterning of striatal compartments. *Development* 132:4247-4258.
- Matise, M. P. and A. L. Joyner. 1999. Gli genes in development and cancer. *Oncogene* 18:7852-7859.
- Mattar, P., L. M. Langevin, K. Markham, N. Klenin, S. Shivji, D. Zinyk, and C. Schuurmans. 2008. Basic helix-loop-helix transcription factors cooperate to specify a cortical projection neuron identity. *Mol. Cell Biol.* 28:1456-1469.

- McCaffery, P. and U. C. Drager. 1994. High levels of a retinoic acid-generating dehydrogenase in the meso-telencephalic dopamine system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91:7772-7776.
- McConnell, S. K. and C. E. Kaznowski. 1991. Cell cycle dependence of laminar determination in developing neocortex. *Science* 254:282-285.
- McConnell, S. K. 1995. Constructing the cerebral cortex: neurogenesis and fate determination. *Neuron* 15:761-768.
- McHaffie, J. G., T. R. Stanford, B. E. Stein, V. Coizet, and P. Redgrave. 2005. Subcortical loops through the basal ganglia. *Trends Neurosci.* 28:401-407.
- Medina, L. and A. Abellan. 2009. Development and evolution of the pallium. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20:698-711.
- Merkle, F. T. and A. Alvarez-Buylla. 2006. Neural stem cells in mammalian development. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18:704-709.
- Meyer, N. P. and H. Roelink. 2003. The amino-terminal region of Gli3 antagonizes the Shh response and acts in dorsoventral fate specification in the developing spinal cord. *Dev. Biol.* 257:343-355.
- Middleton, F. A. and P. L. Strick. 2000. Basal ganglia and cerebellar loops: motor and cognitive circuits. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 31:236-250.
- Miller, F. D. and A. S. Gauthier. 2007. Timing is everything: making neurons versus glia in the developing cortex. *Neuron* 54:357-369.
- Mitsuhashi, T. and T. Takahashi. 2009. Genetic regulation of proliferation/differentiation characteristics of neural progenitor cells in the developing neocortex. *Brain Dev.* 31:553-557.
- Miyata, T., A. Kawaguchi, K. Saito, M. Kawano, T. Muto, and M. Ogawa. 2004. Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells. *Development* 131:3133-3145.
- Miyata, T. and M. Ogawa. 2007. Twisting of neocortical progenitor cells underlies a spring-like mechanism for daughter-cell migration. *Curr. Biol.* 17:146-151.
- Molnar, A. and K. Georgopoulos. 1994. The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins. *Mol. Cell Biol.* 14:8292-8303.
- Morgan, D. O. 1997. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13:261-291.
- Muzio, L. and A. Mallamaci. 2005. Foxg1 confines Cajal-Retzius neuronogenesis and hippocampal morphogenesis to the dorsomedial pallium. *J. Neurosci.* 25:4435-4441.
- Myers, R. H., J. P. Vonsattel, T. J. Stevens, L. A. Cupples, E. P. Richardson, J. B. Martin, and E. D. Bird. 1988. Clinical and neuropathologic assessment of severity in Huntington's disease. *Neurology* 38:341-347.
- Nakano, K., T. Kayahara, T. Tsutsumi, and H. Ushiro. 2000. Neural circuits and functional organization of the striatum. *J. Neurol.* 247 Suppl 5:V1-15.

- Nakashima, K., S. Wiese, M. Yanagisawa, H. Arakawa, N. Kimura, T. Hisatsune, K. Yoshida, T. Kishimoto, M. Sendtner, and T. Taga. 1999. Developmental requirement of gp130 signaling in neuronal survival and astrocyte differentiation. *J. Neurosci.* 19:5429-5434.
- Nakayama, K., N. Ishida, M. Shirane, A. Inomata, T. Inoue, N. Shishido, I. Horii, D. Y. Loh, and K. Nakayama. 1996. Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell* 85:707-720.
- Naldini, L., U. Blomer, F. H. Gage, D. Trono, and I. M. Verma. 1996. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93:11382-11388.
- Nery, S., H. Wichterle, and G. Fishell. 2001. Sonic hedgehog contributes to oligodendrocyte specification in the mammalian forebrain. *Development* 128:527-540.
- Nery, S., J. G. Corbin, and G. Fishell. 2003. Dlx2 progenitor migration in wild type and Nkx2.1 mutant telencephalon. *Cereb. Cortex* 13:895-903.
- Nguyen, L., A. Besson, J. M. Roberts, and F. Guillemot. 2006. Coupling cell cycle exit, neuronal differentiation and migration in cortical neurogenesis. *Cell Cycle* 5:2314-2318.
- Nieto, M., C. Schuurmans, O. Britz, and F. Guillemot. 2001. Neural bHLH genes control the neuronal versus glial fate decision in cortical progenitors. *Neuron* 29:401-413.
- Noctor, S. C., V. Martinez-Cerdeno, L. Ivic, and A. R. Kriegstein. 2004. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat. Neurosci.* 7:136-144.
- Nottebohm, F. 2002. Neuronal replacement in adult brain. *Brain Res. Bull.* 57:737-749.
- Nutt, S. L. and B. L. Kee. 2007. The transcriptional regulation of B cell lineage commitment. *Immunity.* 26:715-725.
- O'Leary, D. D., S. J. Chou, T. Hamasaki, S. Sahara, A. Takeuchi, S. Thuret, and A. Leingartner. 2007. Regulation of laminar and area patterning of mammalian neocortex and behavioural implications. *Novartis. Found. Symp.* 288:141-159.
- Oertel, W. H. and E. Mugnaini. 1984. Immunocytochemical studies of GABAergic neurons in rat basal ganglia and their relations to other neuronal systems. *Neurosci. Lett.* 47:233-238.
- Ohtsuka, T., M. Sakamoto, F. Guillemot, and R. Kageyama. 2001. Roles of the basic helix-loop-helix genes Hes1 and Hes5 in expansion of neural stem cells of the developing brain. *J. Biol. Chem.* 276:30467-30474.
- Ouimet, C. C., A. S. LaMantia, P. Goldman-Rakic, P. Rakic, and P. Greengard. 1992. Immunocytochemical localization of DARPP-32, a dopamine and cyclic-AMP-regulated phosphoprotein, in the primate brain. *J. Comp Neurol.* 323:209-218.
- Panganiban, G. and J. L. Rubenstein. 2002. Developmental functions of the Distal-less/Dlx homeobox genes. *Development* 129:4371-4386.
- Parras, C. M., C. Schuurmans, R. Scardigli, J. Kim, D. J. Anderson, and F. Guillemot. 2002. Divergent functions of the proneural genes Mash1 and Ngn2 in the specification of neuronal subtype identity. *Genes Dev.* 16:324-338.

- Pearson, B. J. and C. Q. Doe. 2003. Regulation of neuroblast competence in *Drosophila*. *Nature* 425:624-628.
- Pechnick, R. N., S. Zonis, K. Wawrowsky, J. Pourmorady, and V. Chesnokova. 2008. p21Cip1 restricts neuronal proliferation in the subgranular zone of the dentate gyrus of the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105:1358-1363.
- Pennartz, C. M., J. D. Berke, A. M. Graybiel, R. Ito, C. S. Lansink, M. M. van der, A. D. Redish, K. S. Smith, and P. Voorn. 2009. Corticostriatal Interactions during Learning, Memory Processing, and Decision Making. *J. Neurosci.* 29:12831-12838.
- Penny, G. R., S. Afsharpour, and S. T. Kitai. 1986. Substance P-immunoreactive neurons in the neocortex of the rat: a subset of the glutamic acid decarboxylase-immunoreactive neurons. *Neurosci. Lett.* 65:53-59.
- Perez-Navarro, E., J. M. Canals, S. Gines, and J. Alberch. 2006. Cellular and molecular mechanisms involved in the selective vulnerability of striatal projection neurons in Huntington's disease. *Histol. Histopathol.* 21:1217-1232.
- Peschanski, M., A. C. Bachoud-Levi, and P. Hantraye. 2004. Integrating fetal neural transplants into a therapeutic strategy: the example of Huntington's disease. *Brain* 127:1219-1228.
- Petryniak, M. A., G. B. Potter, D. H. Rowitch, and J. L. Rubenstein. 2007. Dlx1 and Dlx2 control neuronal versus oligodendroglial cell fate acquisition in the developing forebrain. *Neuron* 55:417-433.
- Pineda, J. R., J. M. Canals, M. Bosch, A. Adell, G. Mengod, F. Artigas, P. Ernfors, and J. Alberch. 2005. Brain-derived neurotrophic factor modulates dopaminergic deficits in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J. Neurochem.* 93:1057-1068.
- Pineda, J. R., N. Rubio, P. Akerud, N. Urban, L. Badimon, E. Arenas, J. Alberch, J. Blanco, and J. M. Canals. 2007. Neuroprotection by GDNF-secreting stem cells in a Huntington's disease model: optical neuroimage tracking of brain-grafted cells. *Gene Ther.* 14:118-128.
- Poitras, L., N. Ghanem, G. Hatch, and M. Ekker. 2007. The proneural determinant MASH1 regulates forebrain Dlx1/2 expression through the l12b intergenic enhancer. *Development* 134:1755-1765.
- Puelles, L., E. Kuwana, E. Puelles, A. Bulfone, K. Shimamura, J. Keleher, S. Smiga, and J. L. Rubenstein. 2000. Pallial and subpallial derivatives in the embryonic chick and mouse telencephalon, traced by the expression of the genes Dlx-2, Emx-1, Nkx-2.1, Pax-6, and Tbr-1. *J. Comp Neurol.* 424:409-438.
- Qian, X., A. A. Davis, S. K. Goderie, and S. Temple. 1997. FGF2 concentration regulates the generation of neurons and glia from multipotent cortical stem cells. *Neuron* 18:81-93.
- Qian, X., Q. Shen, S. K. Goderie, W. He, A. Capela, A. A. Davis, and S. Temple. 2000. Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. *Neuron* 28:69-80.
- Qiu, M., A. Bulfone, I. Ghattas, J. J. Meneses, L. Christensen, P. T. Sharpe, R. Presley, R. A. Pedersen, and J. L. Rubenstein. 1997. Role of the Dlx homeobox genes in proximodistal patterning of the branchial arches: mutations of Dlx-1, Dlx-2, and Dlx-1 and -2 alter morphogenesis of proximal skeletal and soft tissue structures derived from the first and second arches. *Dev. Biol.* 185:165-184.

- Rakic, P. 1971. Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in *Macacus Rhesus*. *J. Comp Neurol.* 141:283-312.
- Rakic, P. 2007. The radial edifice of cortical architecture: from neuronal silhouettes to genetic engineering. *Brain Res. Rev.* 55:204-219.
- Rallu, M., R. Machold, N. Gaiano, J. G. Corbin, A. P. McMahon, and G. Fishell. 2002. Dorsoventral patterning is established in the telencephalon of mutants lacking both *Gli3* and Hedgehog signaling. *Development* 129:4963-4974.
- Rallu, M., J. G. Corbin, and G. Fishell. 2002. Parsing the prosencephalon. *Nat. Rev. Neurosci.* 3:943-951.
- Ramaswamy, S., K. M. Shannon, and J. H. Kordower. 2007. Huntington's disease: pathological mechanisms and therapeutic strategies. *Cell Transplant.* 16:301-312.
- Rash, B. G. and E. A. Grove. 2007. Patterning the dorsal telencephalon: a role for sonic hedgehog? *J. Neurosci.* 27:11595-11603.
- Rebollo, A. and C. Schmitt. 2003. *Ikaros*, *Aiolos* and *Helios*: transcription regulators and lymphoid malignancies. *Immunol. Cell Biol.* 81:171-175.
- Redies, C., D. Kovjanic, D. Heyers, L. Medina, S. Hirano, S. T. Suzuki, and L. Puelles. 2002. Patch/matrix patterns of gray matter differentiation in the telencephalon of chicken and mouse. *Brain Res. Bull.* 57:489-493.
- Reiner, A., R. L. Albin, K. D. Anderson, C. J. D'Amato, J. B. Penney, and A. B. Young. 1988. Differential loss of striatal projection neurons in Huntington disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85:5733-5737.
- Ribak, C. E., J. E. Vaughn, and E. Roberts. 1979. The GABA neurons and their axon terminals in rat corpus striatum as demonstrated by GAD immunocytochemistry. *J. Comp Neurol.* 187:261-283.
- Ribes, V., Z. Wang, P. Dolle, and K. Niederreither. 2006. Retinaldehyde dehydrogenase 2 (RALDH2)-mediated retinoic acid synthesis regulates early mouse embryonic forebrain development by controlling FGF and sonic hedgehog signaling. *Development* 133:351-361.
- Ross, S. E., M. E. Greenberg, and C. D. Stiles. 2003. Basic helix-loop-helix factors in cortical development. *Neuron* 39:13-25.
- Rosser, A. E., R. A. Barker, T. Harrower, C. Watts, M. Farrington, A. K. Ho, R. M. Burnstein, D. K. Menon, J. H. Gillard, J. Pickard, and S. B. Dunnett. 2002. Unilateral transplantation of human primary fetal tissue in four patients with Huntington's disease: NEST-UK safety report ISRCTN no 36485475. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 73:678-685.
- Rubenstein, J. L. 2000. Intrinsic and extrinsic control of cortical development. *Novartis Found. Symp.* 228:67-75.
- Ruberte, E., V. Friederich, P. Chambon, and G. Morriss-Kay. 1993. Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. III. Their differential transcript distribution during mouse nervous system development. *Development* 118:267-282.

- Sansom, S. N., D. S. Griffiths, A. Faedo, D. J. Kleinjan, Y. Ruan, J. Smith, H. van, V, J. L. Rubenstein, and F. J. Livesey. 2009. The level of the transcription factor Pax6 is essential for controlling the balance between neural stem cell self-renewal and neurogenesis. *PLoS. Genet.* 5:e1000511.
- Satyanarayana, A. and P. Kaldis. 2009. Mammalian cell-cycle regulation: several Cdk, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene* 28:2925-2939.
- Sauvageot, C. M. and C. D. Stiles. 2002. Molecular mechanisms controlling cortical gliogenesis. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12:244-249.
- Schaeren-Wiemers, N. and A. Gerfin-Moser. 1993. A single protocol to detect transcripts of various types and expression levels in neural tissue and cultured cells: in situ hybridization using digoxigenin-labelled cRNA probes. *Histochemistry* 100:431-440.
- Schiffmann, S. N., O. Jacobs, and J. J. Vanderhaeghen. 1991. Striatal restricted adenosine A2 receptor (RDC8) is expressed by enkephalin but not by substance P neurons: an in situ hybridization histochemistry study. *J. Neurochem.* 57:1062-1067.
- Schmid, R. S., S. Shelton, A. Stanco, Y. Yokota, J. A. Kreidberg, and E. S. Anton. 2004. $\alpha 3 \beta 1$ integrin modulates neuronal migration and placement during early stages of cerebral cortical development. *Development* 131:6023-6031.
- Schober, A., H. Peterziel, C. S. von Bartheld, H. Simon, K. Kriegstein, and K. Unsicker. 2007. GDNF applied to the MPTP-lesioned nigrostriatal system requires TGF-beta for its neuroprotective action. *Neurobiol. Dis.* 25:378-391.
- Selkoe, D. and R. Kopan. 2003. Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* 26:565-597.
- Shanmugalingam, S., C. Houart, A. Picker, F. Reifers, R. Macdonald, A. Barth, K. Griffin, M. Brand, and S. W. Wilson. 2000. *Ace/Fgf8* is required for forebrain commissure formation and patterning of the telencephalon. *Development* 127:2549-2561.
- Sherr, C. J. and J. M. Roberts. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13:1501-1512.
- Shimogori, T., V. Banuchi, H. Y. Ng, J. B. Strauss, and E. A. Grove. 2004. Embryonic signaling centers expressing BMP, WNT and FGF proteins interact to pattern the cerebral cortex. *Development* 131:5639-5647.
- Smith, Y. and A. Parent. 1986. Neuropeptide Y-immunoreactive neurons in the striatum of cat and monkey: morphological characteristics, intrinsic organization and co-localization with somatostatin. *Brain Res.* 372:241-252.
- Smith, Y., M. D. Bevan, E. Shink, and J. P. Bolam. 1998. Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience* 86:353-387.
- Smith, Y., E. Shink, and M. Sidibe. 1998. Neuronal circuitry and synaptic connectivity of the basal ganglia. *Neurosurg. Clin. N. Am.* 9:203-222.
- Song, D. D. and R. E. Harlan. 1994. Genesis and migration patterns of neurons forming the patch and matrix compartments of the rat striatum. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 83:233-245.
- Song, D. D. and R. E. Harlan. 1994. The development of enkephalin and substance P neurons in the basal ganglia: insights into neostriatal compartments and the extended amygdala. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 83:247-261.

BIBLIOGRAFÍA

- Stanton, B. Z. and L. F. Peng. 2010. Small-molecule modulators of the Sonic Hedgehog signaling pathway. *Mol. Biosyst.* 6:44-54.
- Steiner, B., F. Klempin, L. Wang, M. Kott, H. Kettenmann, and G. Kempermann. 2006. Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis. *Glia* 54:805-814.
- Stenman, J., R. T. Yu, R. M. Evans, and K. Campbell. 2003. Tlx and Pax6 co-operate genetically to establish the pallio-subpallial boundary in the embryonic mouse telencephalon. *Development* 130:1113-1122.
- Strong, T. V., D. A. Tagle, J. M. Valdes, L. W. Elmer, K. Boehm, M. Swaroop, K. W. Kaatz, F. S. Collins, and R. L. Albin. 1993. Widespread expression of the human and rat Huntington's disease gene in brain and nonneural tissues. *Nat. Genet.* 5:259-265.
- Subramanian, L. and S. Tole. 2009. Mechanisms underlying the specification, positional regulation, and function of the cortical hem. *Cereb. Cortex* 19 Suppl 1:i90-i95.
- Sun, L., A. Liu, and K. Georgopoulos. 1996. Zinc finger-mediated protein interactions modulate Ikaros activity, a molecular control of lymphocyte development. *EMBO J.* 15:5358-5369.
- Sun, Y., M. Nadal-Vicens, S. Misono, M. Z. Lin, A. Zubiaga, X. Hua, G. Fan, and M. E. Greenberg. 2001. Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell* 104:365-376.
- Sussel, L., O. Marin, S. Kimura, and J. L. Rubenstein. 1999. Loss of Nkx2.1 homeobox gene function results in a ventral to dorsal molecular respecification within the basal telencephalon: evidence for a transformation of the pallidum into the striatum. *Development* 126:3359-3370.
- Takahashi, H. and F. C. Liu. 2006. Genetic patterning of the mammalian telencephalon by morphogenetic molecules and transcription factors. *Birth Defects Res. C. Embryo. Today* 78:256-266.
- Takahashi, T., R. S. Nowakowski, and V. S. Caviness, Jr. 1995. The cell cycle of the pseudostratified ventricular epithelium of the embryonic murine cerebral wall. *J. Neurosci.* 15:6046-6057.
- Tanabe, Y., C. William, and T. M. Jessell. 1998. Specification of motor neuron identity by the MNR2 homeodomain protein. *Cell* 95:67-80.
- Tanigaki, K., F. Nogaki, J. Takahashi, K. Tashiro, H. Kurooka, and T. Honjo. 2001. Notch1 and Notch3 instructively restrict bFGF-responsive multipotent neural progenitor cells to an astroglial fate. *Neuron* 29:45-55.
- Tefferi, A. 2010. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. *Leukemia* 24:1128-1138.
- Temple, S. 2001. The development of neural stem cells. *Nature* 414:112-117.
- Tepper, J. M. and J. P. Bolam. 2004. Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14:685-692.
- The Huntington's disease collaborative research group (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell* 72: 971-983.

- Theil, T., G. Alvarez-Bolado, A. Walter, and U. Ruther. 1999. Gli3 is required for Emx gene expression during dorsal telencephalon development. *Development* 126:3561-3571.
- Tobe, R. H., R. Bansal, D. Xu, X. Hao, J. Liu, J. Sanchez, and B. S. Peterson. 2010. Cerebellar morphology in Tourette syndrome and obsessive-compulsive disorder. *Ann. Neurol.* 67:479-487.
- Toresson, H., d. U. Mata, C. Fagerstrom, T. Perlmann, and K. Campbell. 1999. Retinoids are produced by glia in the lateral ganglionic eminence and regulate striatal neuron differentiation. *Development* 126:1317-1326.
- Toresson, H., M. Parmar, and K. Campbell. 2000. Expression of Meis and Pbx genes and their protein products in the developing telencephalon: implications for regional differentiation. *Mech. Dev.* 94:183-187.
- Toresson, H. and K. Campbell. 2001. A role for Gsh1 in the developing striatum and olfactory bulb of Gsh2 mutant mice. *Development* 128:4769-4780.
- Tran, N. L., L. M. Barraj, M. M. Murphy, and X. Bi. 2010. Dietary Acrylamide Exposure and Hemoglobin Adducts - National Health and Nutrition Examination Survey (2003-04). *Food Chem. Toxicol.*
- Tucker, E. S., S. Segall, D. Gopalakrishna, Y. Wu, M. Vernon, F. Polleux, and A. S. LaMantia. 2008. Molecular specification and patterning of progenitor cells in the lateral and medial ganglionic eminences. *J. Neurosci.* 28:9504-9518.
- Van der, K. D. and G. Fishell. 1987. Neuronal birthdate underlies the development of striatal compartments. *Brain Res.* 401:155-161.
- van Lookeren, C. M. and R. Gill. 1998. Tumor-suppressor p53 is expressed in proliferating and newly formed neurons of the embryonic and postnatal rat brain: comparison with expression of the cell cycle regulators p21Waf1/Cip1, p27Kip1, p57Kip2, p16Ink4a, cyclin G1, and the proto-oncogene Bax. *J. Comp Neurol.* 397:181-198.
- van Praag, H., G. Kempermann, and F. H. Gage. 2000. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat. Rev. Neurosci.* 1:191-198.
- Vetter, M. L. and N. L. Brown. 2001. The role of basic helix-loop-helix genes in vertebrate retinogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 12:491-498.
- Vincent, S. R., O. Johansson, T. Hokfelt, L. Skirboll, R. P. Elde, L. Terenius, J. Kimmel, and M. Goldstein. 1983. NADPH-diaphorase: a selective histochemical marker for striatal neurons containing both somatostatin- and avian pancreatic polypeptide (APP)-like immunoreactivities. *J. Comp Neurol.* 217:252-263.
- Vonsattel, J. P., R. H. Myers, T. J. Stevens, R. J. Ferrante, E. D. Bird, and E. P. Richardson, Jr. 1985. Neuropathological classification of Huntington's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 44:559-577.
- Vonsattel, J. P. and M. DiFiglia. 1998. Huntington disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57:369-384.
- Wang, B., J. F. Fallon, and P. A. Beachy. 2000. Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell* 100:423-434.

- Wang, B., R. R. Waclaw, Z. J. Allen, F. Guillemot, and K. Campbell. 2009. *Ascl1* is a required downstream effector of *Gsx* gene function in the embryonic mouse telencephalon. *Neural Dev.* 4:5.
- Wang, H. F. and F. C. Liu. 2001. Developmental restriction of the LIM homeodomain transcription factor *Islet-1* expression to cholinergic neurons in the rat striatum. *Neuroscience* 103:999-1016.
- Wang, J. H., A. Nichogiannopoulou, L. Wu, L. Sun, A. H. Sharpe, M. Bigby, and K. Georgopoulos. 1996. Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an *Ikaros* null mutation. *Immunity.* 5:537-549.
- Whittington, M. A. and R. D. Traub. 2003. Interneuron diversity series: inhibitory interneurons and network oscillations in vitro. *Trends Neurosci.* 26:676-682.
- Wilson, L. and M. Maden. 2005. The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. *Dev. Biol.* 282:1-13.
- Wilson, S. W. and J. L. Rubenstein. 2000. Induction and dorsoventral patterning of the telencephalon. *Neuron* 28:641-651.
- Wonders, C. P. and S. A. Anderson. 2006. The origin and specification of cortical interneurons. *Nat. Rev. Neurosci.* 7:687-696.
- Yelnik, J. 2002. Functional anatomy of the basal ganglia. *Mov Disord.* 17 Suppl 3:S15-S21.
- Yoon, K., S. Nery, M. L. Rutlin, F. Radtke, G. Fishell, and N. Gaiano. 2004. Fibroblast growth factor receptor signaling promotes radial glial identity and interacts with *Notch1* signaling in telencephalic progenitors. *J. Neurosci.* 24:9497-9506.
- Yoon, K. and N. Gaiano. 2005. Notch signaling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants. *Nat. Neurosci.* 8:709-715.
- Yun, K., S. Potter, and J. L. Rubenstein. 2001. *Gsh2* and *Pax6* play complementary roles in dorsoventral patterning of the mammalian telencephalon. *Development* 128:193-205.
- Yun, K., S. Fischman, J. Johnson, d. A. Hrabe, G. Weinmaster, and J. L. Rubenstein. 2002. Modulation of the notch signaling by *Mash1* and *Dlx1/2* regulates sequential specification and differentiation of progenitor cell types in the subcortical telencephalon. *Development* 129:5029-5040.
- Yun, K., S. Garel, S. Fischman, and J. L. Rubenstein. 2003. Patterning of the lateral ganglionic eminence by the *Gsh1* and *Gsh2* homeobox genes regulates striatal and olfactory bulb histogenesis and the growth of axons through the basal ganglia. *J. Comp Neurol.* 461:151-165.
- Zerucha, T., T. Stuhmer, G. Hatch, B. K. Park, Q. Long, G. Yu, A. Gambarotta, J. R. Schultz, J. L. Rubenstein, and M. Ekker. 2000. A highly conserved enhancer in the *Dlx5/Dlx6* intergenic region is the site of cross-regulatory interactions between *Dlx* genes in the embryonic forebrain. *J. Neurosci.* 20:709-721.
- Zetterberg, A., O. Larsson, and K. G. Wiman. 1995. What is the restriction point? *Curr. Opin. Cell Biol.* 7:835-842.
- Zetterstrom, R. H., A. Simon, M. M. Giacobini, U. Eriksson, and L. Olson. 1994. Localization of cellular retinoid-binding proteins suggests specific roles for retinoids in the adult central nervous system. *Neuroscience* 62:899-918.

Zhang, Z., C. S. Swindle, J. T. Bates, R. Ko, C. V. Cotta, and C. A. Klug. 2007. Expression of a non-DNA-binding isoform of Helios induces T-cell lymphoma in mice. *Blood* 109:2190-2197.

VII. ANEXO

Ikaros-1 Couples Cell Cycle Arrest of Late Striatal Precursors With Neurogenesis of Enkephalinergic Neurons

Raquel Martín-Ibáñez,^{1,2} Empar Crespo,^{1,2} Noelia Urbán,^{1,2} Solène Sergent-Tanguy,¹ Cristina Herranz,^{1,2} Montserrat Jaumot,¹ Manuel Valiente,³ Jason E. Long,⁴ José Ramón Pineda,¹ Celia Andreu,^{2,5} John L.R. Rubenstein,⁴ Óscar Marín,³ Katia Georgopoulos,⁶ Guadalupe Mengod,^{2,7} Isabel Fariñas,^{2,5} Oriol Bachs,¹ Jordi Alberch,^{1,2} and Josep M. Canals^{1,2*}

¹Departament de Biologia Celular, Immunologia i Neurociències, Facultat de Medicina, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, E-08036 Barcelona, Spain

²Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), 41013 Sevilla, Spain

³Instituto de Neurociencias de Alicante, CSIC, and Universidad Miguel Hernández, E-03550 Sant Joan d'Alacant, Spain

⁴Nina Ireland Laboratory of Developmental Neurobiology, Department of Psychiatry, University of California at San Francisco, San Francisco, California 94143

⁵Departamento de Biología Celular, Universidad de Valencia, E-461010 Burjassot, Spain

⁶Cutaneous Biology Research Center, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Charlestown, Massachusetts 02114

⁷Department of Neurochemistry and Neuropharmacology, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, IDIBAPS, E-08036 Barcelona, Spain

ABSTRACT

During central nervous system development, several transcription factors regulate the differentiation of progenitor cells to postmitotic neurons. Here we describe a novel role for Ikaros-1 in the generation of late-born striatal neurons. Our results show that Ikaros-1 is expressed in the boundary of the striatal germinal zone (GZ)/mantle zone (MZ), where it induces cell cycle arrest of neural progenitors by up-regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKi) p21^{Cip1/Waf1}. This effect is coupled with the neuronal differentiation of late precursors, which in turn is critical for the second wave of striatal neurogenesis that gives rise to matrix neurons. Consistently, *Ikaros*^{-/-} mice had fewer striatal projecting neurons and, in particular, enkephalin (ENK)-positive neurons. In addition, overexpres-

sion of Ikaros-1 in primary striatal cultures increases the number of calbindin- and ENK-positive neurons. Our results also show that Ikaros-1 acts downstream of the Dlx family of transcription factors, insofar as its expression is lost in Dlx1/2 double knockout mice. However, we demonstrate that Ikaros-1 and Ebf-1 independently regulate the final determination of the two populations of striatal projection neurons of the matrix compartment, ENK- and substance P-positive neurons. In conclusion, our findings identify Ikaros-1 as a modulator of cell cycle exit of neural progenitors that gives rise to the neurogenesis of ENK-positive striatal neurons. *J. Comp. Neurol.* 518:329–351, 2010.

© 2009 Wiley-Liss, Inc.

INDEXING TERMS: telencephalon; differentiation; striatum; P21; Dlx; Ebf-1

Neural progenitor cells (NPCs) that are located at concrete positions during brain development give rise to different neuronal and glial cell types (Bertrand et al., 2002). These processes are regulated by several proneural tran-

scription factors that follow specific temporal expression patterns and regulate neurogenesis of discrete neuronal populations. Some of these factors are likely to be part of the switch from neurogenesis to gliogenesis, insofar as the

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Grant sponsor: Ministerio de Educación y Ciencia; Grant number: BFU2005-04773/BMC (to O.M.); Grant number: SAF2006-05212 (to O.B.); Grant number: SAF2005-01335 (to J.A.); Grant number: SAF2006-04202 (to J.M.C.); Grant sponsor: Ministerio de Sanidad y Consumo [CIBERNED]; to I.F., G.M., J.A., E.C.; Red de Terapia Celular (RETICS); to I.F. and J.M.C.); Grant sponsor: Fundació La Caixa (to O.M., J.A.); Grant sponsor: European Commission; Grant number: STREP 005139 (INTERDEV); to O.M.) Grant sponsor: EURYI program (O.M.); Grant sponsor: CIRIT, Generalitat de Catalunya (to N.U.).

© 2009 Wiley-Liss, Inc.

Solène Sergent-Tanguy's current address is INSERM U643, Nantes, France. José Ramón Pineda's current address is Institut Curie, CNRS UMR 146, Orsay, France.

*CORRESPONDENCE TO: Dr. Josep M. Canals, Departament de Biologia Celular, Immunologia i Neurociències, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, C/Casanova 143, E-08036 Barcelona, Spain. E-mail: jmcansals@ub.edu

Received 4 March 2009; Revised 24 May 2009; Accepted 31 August 2009.
DOI 10.1002/cne.22215
Published online September 16, 2009 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Nolz1 promotes striatal neurogenesis through the regulation of retinoic acid signaling

Noelia Urbán^{1,2,3}, Raquel Martín-Ibáñez^{1,2,4}, Cristina Herranz^{1,2,4}, Miriam Esgleas^{1,2,4}, Empar Crespo^{1,2,4}, Monica Pardo¹, Ivan Crespo-Enríquez⁵, Héctor R Méndez-Gómez^{2,6}, Ronald Waclaw⁷, Christina Chatzi⁸, Susana Álvarez⁹, Rosana Álvarez⁹, Gregg Duester⁸, Kenneth Campbell⁷, Angel R de Lera⁹, Carlos Vicario-Abejón^{2,6}, Salvador Martínez², Jordi Alberch^{1,2,4}, Josep M Canals^{1,2,4*}

Abstract

Background: *Nolz1* is a zinc finger transcription factor whose expression is enriched in the lateral ganglionic eminence (LGE), although its function is still unknown.

Results: Here we analyze the role of *Nolz1* during LGE development. We show that *Nolz1* expression is high in proliferating neural progenitor cells (NPCs) of the LGE subventricular zone. In addition, low levels of *Nolz1* are detected in the mantle zone, as well as in the adult striatum. Similarly, *Nolz1* is highly expressed in proliferating LGE-derived NPC cultures, but its levels rapidly decrease upon cell differentiation, pointing to a role of *Nolz1* in the control of NPC proliferation and/or differentiation. In agreement with this hypothesis, we find that *Nolz1* over-expression promotes cell cycle exit of NPCs in neurosphere cultures and negatively regulates proliferation in telencephalic organotypic cultures. Within LGE primary cultures, *Nolz1* over-expression promotes the acquisition of a neuronal phenotype, since it increases the number of β -III tubulin (Tuj1)- and microtubule-associated protein (MAP)2-positive neurons, and inhibits astrocyte generation and/or differentiation. Retinoic acid (RA) is one of the most important morphogens involved in striatal neurogenesis, and regulates *Nolz1* expression in different systems. Here we show that *Nolz1* also responds to this morphogen in E12.5 LGE-derived cell cultures. However, *Nolz1* expression is not regulated by RA in E14.5 LGE-derived cell cultures, nor is it affected during LGE development in mouse models that present decreased RA levels. Interestingly, we find that *Gsx2*, which is necessary for normal RA signaling during LGE development, is also required for *Nolz1* expression, which is lost in *Gsx2* knockout mice. These findings suggest that *Nolz1* might act downstream of *Gsx2* to regulate RA-induced neurogenesis. Keeping with this hypothesis, we show that *Nolz1* induces the selective expression of the RA receptor (RAR) β without altering RAR α or RAR γ . In addition, *Nolz1* over-expression increases RA signaling since it stimulates the RA response element. This RA signaling is essential for *Nolz1*-induced neurogenesis, which is impaired in a RA-free environment or in the presence of a RAR inverse agonist. It has been proposed that *Drosophila Gsx2* and *Nolz1* homologues could cooperate with the transcriptional co-repressors Groucho-TLE to regulate cell proliferation. In agreement with this view, we show that *Nolz1* could act in collaboration with TLE-4, as they are expressed at the same time in NPC cultures and during mouse development.

Conclusions: *Nolz1* promotes RA signaling in the LGE, contributing to the striatal neurogenesis during development.

* Correspondence: jmcanals@ub.edu

¹Department of Cell Biology, Immunology and Neuroscience, Faculty of Medicine, IDIBAPS, Universitat de Barcelona, C/Casanova 143, 08036 Barcelona, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



© 2010 Urbán et al; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Submitted:***Helios*, a new neurogenic factor involved in telencephalic stem cell differentiation**

EMPAR CRESPO,^{a,b,*} RAQUEL MARTÍN-IBÁÑEZ,^{a,b,*} BEI WANG,^c MIRIAM ESGLEAS,^{a,b} CRISTINA HERRANZ,^{a,b} CARLOS VICARIO-ABEJÓN,^{b,d} JORDI ALBERCH,^{a,b} JOHN L. RUBENSTEIN,^c JOSEP M. CANALS^{a,b}.

^aDepartment of Cell Biology, Immunology and Neuroscience, and Cell Therapy Program, Faculty of Medicine, IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona, SPAIN;

^bCentro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), SPAIN; ^cNina Ireland Laboratory of

Developmental Neurobiology, Department of Psychiatry, University of California at San Francisco, San Francisco, California, USA; ^dDepartamento de Neurobiología

Molecular, Celular y del Desarrollo, Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, SPAIN.

*Both authors contributed equally to this work.

Running head: *Helios* promotes neuronal differentiation.

Author contributions: E.C.: Collection and assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing, final approval of manuscript; R.M.-I., Collection and assembly of data, data analysis and interpretation, final approval of manuscript; B.W., M.E., C.H.: Collection and assembly of data, final approval of manuscript; C.V.-A., J.A., J.L.R.: Financial support, data analysis and interpretation, final approval of manuscript; J.M.C.: Conception and design, financial support, administrative support, data analysis and interpretation, manuscript writing, final approval of manuscript.

Correspondence: Josep M. Canals, Departament de Biologia Cel.lular, Immunologia i Neurociències, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, C/ Casanova 143, 08036 Barcelona, Spain. Telephone: +34 934035288; Fax: +34 9321907; e-mail: jmcanals@ub.edu;

