

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

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

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

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

Dr. Jordi Alberch Vié

Dr. Josep M. Canals

Raquel Martín Ibáñez

Barcelona, Junio 2007

Índice

ÍNDICE

I. Introducción.....	1
1. CÉLULAS MADRE.....	4
1.1. Definición y propiedades.....	4
1.2. Tipos de células madre.....	6
1.2.1.Células madre embrionarias.....	7
1.2.2.Células embrionarias germinales.....	10
1.2.3.Células embrionarias de carcinoma.....	11
1.2.4.Células madre adultas o fetales.....	12
1.2.4.1. Plasticidad de las células madre adultas.....	12
1.2.4.2. Nichos de las células madre adultas.....	14
1.2.4.3. Neurogénesis en el cerebro adulto.....	16
2. TERAPIA CELULAR PARA ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS.....	19
2.1. Auto-reparación a partir de células madre endógenas.....	21
2.2. Terapias de sustitución.....	24
2.2.1.Obtención y manipulación de células madre.....	26
2.2.2.Diferenciación de células madre.....	30
2.2.2.1. Diferenciación espontánea hacia fenotipos neurales.....	31
2.2.2.2. Utilización de factores que inducen la diferenciación neuronal.....	31
2.2.2.3. Utilización de factores que inducen fenotipos neuronales Dopaminérgicos, Colinérgicos y GABAérgicos.....	34
2.2.2.4. Métodos de selección para la obtención de una población homogénea.....	35
2.2.3.Trasplante e integración funcional.....	37
3. TERAPIA CELULAR PARA LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON.....	38
3.1. Enfermedad de Huntington.....	38
3.2. Los ganglios basales.....	38
3.2.1.El núcleo estriado.....	39
3.2.1.1. Histología del núcleo estriado.....	40
3.2.1.2. Organización del núcleo estriado.....	41

3.3. Fisiopatología de la enfermedad de Huntington.....	44
3.4. Mecanismos moleculares implicados en la enfermedad de Huntington...	45
3.5. Terapia de neuroprotección para la enfermedad de Huntington.....	47
3.6. Terapia de sustitución celular para la enfermedad de Huntington.....	50
4. DESARROLLO DEL NÚCLEO ESTRIADO.....	52
4.1. El Telencéfalo.....	53
4.2. Origen del núcleo estriado.....	53
4.3. Migración celular en el núcleo estriado.....	55
4.3.1.Migración radial de las neuronas de proyección estriatales.....	55
4.3.2.Migración tangencial de las interneuronas estriatales.....	57
4.4. Neurogénesis en el núcleo estriado.....	59
4.5. Factores que intervienen en el desarrollo del núcleo estriado.....	62
4.5.1.Factores que intervienen en la determinación dorso- ventral del telencéfalo.....	62
4.5.1.1. Factores implicados en la determinación telencefálica dorsal...	63
4.5.1.2. Factores implicados en la determinación telencefálica ventral..	65
4.5.2.Factores implicados en la especificación de subtipos neurales estriatales.....	67
II. Objetivos.....	71
III. Materiales y Métodos.....	75
1. Animales.....	77
2. Cultivos celulares.....	78
2.1. Cultivo y diferenciación de ESC murinas.....	78
2.2. Cultivo primario de LGE de embriones de E14,5.....	80
2.3. Cultivo de neuroesferas obtenidas de embriones de E14,5.....	81
2.3.1.Transfección de neuroesferas embrionarias.....	81
2.4. Cultivo de neuroesferas adultas de la zona subventricular.....	82
2.5. Cultivo de la línea de NSC: C17.2.....	84
2.5.1.Transfección de la línea C17.2.....	84

3.	Ensayos de PCR cuantitativa.....	85
4.	Western Blot.....	86
5.	Transducción retroviral de ESC.....	87
6.	Trasplantes celulares.....	88
7.	Estudio de proliferación celular: tratamiento con BrdU.....	89
7.1.	Estudio de proliferación de las ESC en diferenciación.....	89
7.2.	Estudio de proliferación de las ESC diferenciadas y trasplantadas.....	89
7.3.	Estudio de proliferación durante el desarrollo del núcleo estriado.....	90
7.4.	Estudio de proliferación en la zona subventricular adulta.....	91
7.5.	Estudio de proliferación de neuroesferas embrionarias.....	91
8.	Citometría de flujo.....	92
9.	Procedimientos de inmunotinción.....	92
9.1.	Inmunocitoquímica.....	92
9.2.	Inmunohistoquímica.....	94
10.	Ensayo de TUNEL para la detección de muerte celular.....	97
11.	Hibridación <i>in situ</i>	98
11.1.	Hibridación <i>in situ</i> para la detección de la expresión de Ikaros.....	98
11.1.1.	Detección de Ikaros durante el desarrollo estriatal.....	98
11.1.2.	Detección de Ikaros en ratones deficientes para Dlx-1/2.....	98
11.2.	Hibridación <i>in situ</i> para la detección de la expresión de encefalina y sustancia P.....	99
11.3.	Hibridación <i>in situ</i> para la detección de la expresión de Dlx-2, Dlx-5 y Ebf-1.....	99
12.	Recuentos celulares.....	100
12.1.	Recuentos celulares en los experimentos de diferenciación y trasplante de ESC.....	100
12.2.	Recuentos para la evaluación de la capacidad de auto-renovación y proliferación de neuroesferas embrionarias.....	101
12.3.	Recuentos para la evaluación de la capacidad de auto-renovación y proliferación de neuroesferas adultas.....	102

12.4. Recuentos de los diferentes tipos de células presentes en la zona subventricular adulta.....	102
12.5. Recuentos estereológicos.....	103
13. Estadística.....	104
IV. Resultados.....	105
1. El tratamiento con LIF durante la formación de cuerpos embrioides bloquea la diferenciación neuronal.....	107
2. El ácido retinoico induce la diferenciación neuronal en ausencia de LIF durante la formación de cuerpos embrioides.....	109
3. El tratamiento de cuerpos embrioides con ácido retinoico produce la diferenciación de ESC hacia neuronas post-mitóticas, afectando a la viabilidad a largo plazo.....	114
4. La diferenciación <i>in vitro</i> de ESC de ratón previene la formación de teratocarcinomas tras el trasplante cerebral.....	121
5. Ikaros-1 se expresa selectivamente en neuronas post-mitóticas durante el desarrollo del núcleo estriado.....	124
6. La falta de Ikaros bloquea la segunda oleada de neurogénesis del núcleo estriado en desarrollo produciendo una reducción en el volumen estriatal que va acompañada de un incremento en el volumen de la zona germinal.....	128
7. La falta de Ikaros durante el desarrollo estriatal produce una reducción en la capacidad de auto-renovación y una alteración de las poblaciones de la zona germinal adulta.....	134
8. Ikaros interviene en la diferenciación de las neuronas estriatales de proyección encefalinérgicas.....	140
9. La sobre-expresión de Ikaros-1 incrementa la determinación encefalinérgica de precursores neurales.....	144
10. Ikaros-1 regula el desarrollo encefalinérgico estriatal por debajo de la vía de los factores de transcripción de la familia de Dlx.....	145

V. <i>Discusión</i>	149
1. LIF bloquea la diferenciación neuronal inducida por el tratamiento con ácido retinoico en ESC de ratón.....	153
2. El tratamiento de cuerpos embrioides con ácido retinoico produce neuronas post-mitóticas que comprometen la viabilidad del cultivo a largo plazo.....	157
3. La diferenciación <i>in vitro</i> de las ESC de ratón previene la formación de teratocarcinomas después del trasplante cerebral.....	158
4. Ikaros-1 se expresa específicamente en las neuronas estriatales en desarrollo.....	162
5. Ikaros interviene en la diferenciación de precursores neurales de la LGE.....	163
6. Ikaros controla específicamente el desarrollo de las neuronas estriatales de proyección encefalinérgicas.....	166
7. Ikaros interviene en el desarrollo del núcleo estriado por debajo de la familia de factores de transcripción Dlx.....	168
VI. <i>Conclusiones</i>	173
VII. <i>Bibliografía</i>	177

ABREVIACIONES

3-NP	3-nitropropiónico
AMPC	Monofosfato de adenosina cíclico
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BL	Lámina basal
BMPs	Proteínas morfogenéticas del hueso
BrdU	5-bromo-2'-desoxiuridina
BV	Vasos sanguíneos
CAG	Citosina adenosina guanidina
DNA	Ácido desoxiribonucleico
ChAT	Acetilcolinesterasa
CNTF	Factor neurotrófico ciliar
Ctx	Corteza cerebral
Cy3	Cianina 3
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DG	Giro dentado
DIV	Días <i>in vitro</i>
DMEM	Medio esencial mínimo Dulbecco
E14	Día embrionario 14
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFP	Proteína verde fluorescente mejorada
ENK	Encefalina
ESC	Células madre embrionarias
FACS	Selección celular por activación fluorescente
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
GABA	ácido γ -aminobutírico
GAD	Ácido glutámico descarboxilasa
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la glía
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GPe	<i>Globus pallidus</i> externo
GPi	<i>Globus pallidus</i> interno

GZ	Zona germinal
HP	Hipocampo
Htt	Huntingtina
IGF	Factor de crecimiento tipo Insulina
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL-1	Interleucina-1
LGE	Eminencia ganglionar lateral
LIF	Factor inhibidor de leucemia
LV	Ventrículo lateral
MACS	Selección celular por activación magnética
MEM	Medio esencial mínimo
MGE	Eminencia ganglionar medial
Mhtt	Huntingtina mutada
NGF	Factor de crecimiento nervioso
Ngn	Neurogenina
NMDA	N-metil-D-aspartato
NOS	Óxido nítrico sintasa
NSC	Células madre neurales
NT-3	Neurotrofina-3
NT-4	Neurotrofina-4
NT-4/5	Neurotrofina-4/5
NTRN	Neurturina
OB	Bulbo olfativo
P4	Día postnatal 4
PB	Tampón fosfato
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
RARs	Receptores de ácido retinoico
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
SEM	Error estándar de la media

SFRP-2	Proteína frizzlet-2 secretada
SGZ	Zona subgranular
Shh	Sonic hedgehod
SNc	Sustancia Negra <i>pars compacta</i>
SNr	Sustancia Negra <i>pars reticulata</i>
SP	Sustancia P
STN	Núcleo subtalámico
Str	Núcleo estriado
SVZ	Zona subventricular
TGF	Factor de crecimiento transformado
TH	Tirosina hidroxilasa
TUNEL	TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling
VZ	Zona ventricular

