

*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*

III. Materiales y Métodos

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales

Todos los animales son estabulados con acceso a comida y agua *ad libitum* en una habitación que se mantiene a temperatura (19–22°C) y humedad (40–50%) constante siguiendo un ciclo de 12:12 horas de luz/oscuridad. Los tratamientos y procedimientos de manejo de animales han sido aprobados por el comité local (99/1) de la Universidad de Barcelona y la Generalitat de Catalunya (1094/99), de acuerdo con la Directiva de la Comunidad Europea (86/609/EU).

Ratones salvajes de la cepa B6CBA, ratones inmunodeficientes Nude Swiss nu/un (ambos obtenidos de Charles River Laboratorios Inc. Willmington, MA), ratones transgénicos Dlx-5/6-Cre-IRES-GFP y ratones transgénicos deficientes de Ikaros, Dlx-1/2 y Ebf-1 se han utilizado en los estudios descritos a continuación.

Muestras de cerebros de E18,5 de los ratones transgénicos Dlx-5/6 cre-IRES-GFP (Stenman y col., 2003a) han sido amablemente cedidas por el Dr. Oscar Marín del Instituto de Neurociencias de Alicante, Consejo General de Investigaciones Científicas y de la Universidad Miguel Hernández.

La cepa de ratones mutantes con un anelo nulo para Dlx-1/2 (Anderson y col., 1997; Qiu y col., 1997) ha sido utilizada en colaboración con en laboratorio del Dr. John L.R. Rubenstein del Nina Ireland Laboratory of Developmental Neurobiology, Center for Neurobiology and Psychiatry, Universidad de California San Francisco. Embriones de E18,5 derivados de cruces entre ratones heterocigotos para Dlx-1/2 son extraídos por sección cesárea y su genotipo determinado por PCR realizada tal y como se describe en (Bulfone y col., 1993; Anderson y col., 1997; Qiu y col., 1997; Depew y col., 1999).

La cepa de ratones deficientes para el factor de transcripción Ebf-1 (Garel y col., 1999) ha sido amablemente cedida por Dr. Grosschedl R. del Department

of Cellular and Molecular Immunology, Max Planck Institute of Immunobiology, Alemania.

Los ratones deficientes de Ikaros (Georgopoulos y col., 1994) han sido amablemente cedidos por la Dra. Katia Georgopoulos del Cutaneous Biology Research Center, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School.

Los ratones deficientes de Ikaros y de Ebf-1 son alimentados y mantenidos bajo condiciones estériles en una habitación libre de patógenos para mantener la colonia y obtener genotipos $-/-$, $+/-$ y salvajes ya que son ratones inmunodeprimidos. El día postnatal 21 o en el estadio embrionario estudiado, DNA de la cola es extraído y analizado para detectar el genotipo del animal por PCR de acuerdo con el protocolo descrito por (Garel y col., 1999) para Ebf-1 y (Georgopoulos y col., 1994) para Ikaros.

2. Cultivos celulares

Diferentes tipos de cultivos se han llevado a cabo para realizar los dos trabajos que son el objeto de la presente tesis doctoral. A continuación se describe detalladamente cada uno de ellos.

2.1. Cultivo y diferenciación de ESC murinas

La línea R1 de ESC de ratón utilizada para llevar a cabo el estudio del efecto del ácido retinoico y el LIF en la diferenciación neuronal de dichas células, ha sido desarrollada en el laboratorio de Nagy A. del Samuel Lunenfeld Research Institute, Canadá (Nagy y col., 1993).

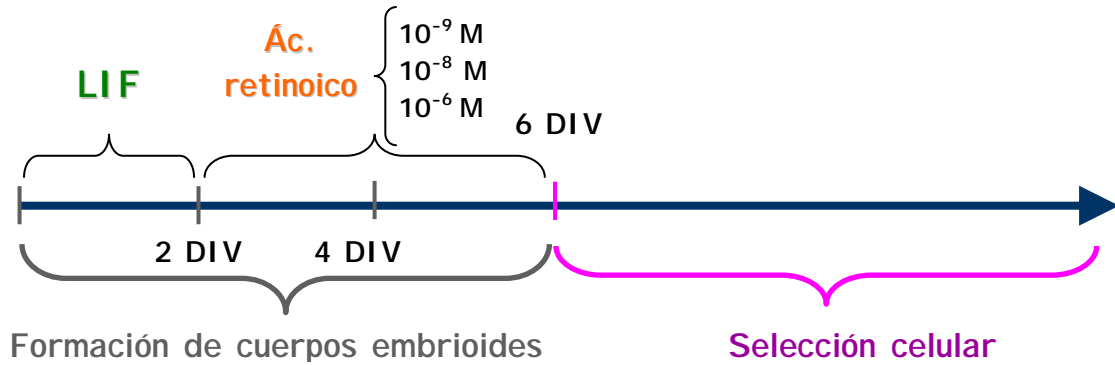
El mantenimiento y diferenciación de las ESC se ha llevado a cabo tal y como se ha descrito previamente (Okabe y col., 1996) con algunas modificaciones. Estas células se mantienen en cultivo en estado indiferenciado sembrándolas sobre una monocapa de fibroblastos murinos primarios inactivados mitóticamente (mediante el tratamiento con mitomicina C a la concentración de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ durante dos horas), en presencia de 1000 U/ml de LIF (ESGRO. Millipore, Bedford, MA). El medio de cultivo de ESC utilizado consiste en "Knockout DMEM" (Dulbecco's minimal essential medium; Gibco-

BRL, Renfrewshire, Scotland, UK) suplementado con 15% “knockout serum replacement” (Gibco-BRL), 0,1 mM 2-mercaptoetanol, 2 mM L-glutamina, 0,1 mM aminoácidos no esenciales, 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomicina (todos estos productos son obtenidos de Gibco-BRL).

Antes de iniciar la diferenciación de las ESC eliminamos la monocapa de fibroblastos pasando las ESC a placas tratadas con gelatina. Para evitar que las ESC se diferencien en la ausencia de fibroblastos las cultivamos en presencia de 1.400 U/ml de LIF en el medio descrito anteriormente.

La diferenciación de ESC la llevamos a cabo mediante la formación de cuerpos embrioides. Para inducir la formación de estos agregados celulares, las células son disociadas con tripsina/EDTA 0,05% (Gibco-BRL) hasta conseguir una suspensión de células individuales que se siembran en placas de cultivo no adherentes de grado bacteriológico a una densidad final de $1-2 \times 10^4$ células/cm² en medio de cultivo ESC. Los cuerpos embrioides se forman en suspensión durante 4 ó 6 días y el medio de cultivo se cambia cada dos días. Estas condiciones corresponden a las de cultivo control sobre las que se introducen modificaciones. Durante los dos primeros días de la formación de cuerpos embrioides, 1000 U/ml de LIF están presentes en el medio de cultivo en la condición con LIF. A los dos días de formación de cuerpos embrioides, el medio es reemplazado y se añade ácido retinoico (all-trans-retinoic acid. Sigma, St Louis, MO, USA) a diferentes concentraciones (0 M, 10^{-9} M, 10^{-8} M y 10^{-6} M). Los cuerpos embrioides se forman durante 4 ó 6 días, reemplazando el medio cada dos días con medio nuevo conteniendo las mismas concentraciones de ácido retinoico hasta el final de la formación. Una vez formados, los cuerpos embrioides se siembran sobre placas adherentes con el fin de permitir que salgan de ellos las células y se diferencien. El medio de cultivo será el mismo que hemos utilizado hasta ahora durante las primeras 24 horas tras las cuales será reemplazado por un medio de selección de precursores neurales, libre de suero, que fue descrito por Okabe y colaboradores y que contiene DMEM/F12 (Gibco-BRL) suplementado con 12 mg/ml glucosa, 5 µg/ml insulina, 50 µg/ml transferrina, 30 nM selenito, 5 µg/ml fibronectina, 2,4 mg/ml NaHCO₃ (todos

obtenidos de Sigma), 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomicina (ambos obtenidos de Gibco-BRL) (Okabe y col., 1996). El medio se reemplaza cada dos días y la diferenciación se para 6 días después (ver esquema 1).



Esquema 1. Protocolo de diferenciación de las ESC hacia un fenotipo neuronal.

2.2. Cultivo primario de LGE de embriones de E14,5

Los cultivos primarios de LGE de embriones de E14,5 utilizados para los estudios de colocalización de Ikaros con diferentes marcadores se realizan como se detalla a continuación. Ratones gestantes son sacrificados bajo anestesia en el día E14,5 (el día del tapón vaginal se considera E0,5) y los fetos se extraen rápidamente del útero mediante sección cesárea. Los cerebros de los fetos se conservan en tampón fosfato salino (PBS) de pH 7,4 estéril. Las LGEs se disecan bilateralmente, se mezclan y se disgregan suavemente con una pipeta pasteur. Una vez disociadas las células se siembran en placas de 24 pocillos con cubreobjetos pretratados con 0,1 mg/ml poly-D-lysine (Sigma) a una densidad de 150.000 cells/cm². Conseguimos un cultivo mixto de neuronas y glía mediante el cultivo de las células en Eagle's minimum essential medium (MEM) (Gibco-BRL) suplementado con: 7,5% suero fetal bovino (Gibco-BRL), 0,6% D-(+)-glucosa (Sigma), 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml estreptomicina (obtenidas de Gibco-BRL). Las células se cultivan en incubadores a 37°C en una atmósfera que contienen un 5% CO₂.

2.3. Cultivo de neuroesferas obtenidas de embriones de E14,5

El cultivo primario de neuroesferas de embriones de E14,5 se ha realizado para estudiar el efecto de Ikaros, en la proliferación y auto-renovación de NSC. Para los estudios de sobre-expresión, el aislamiento y cultivo de NSC embrionarias se han llevado a cabo utilizando ratones de la cepa B6CBA gestantes que se sacrifican a E14,5 y los fetos se extraen rápidamente del útero mediante sección cesárea. Los cerebros de los fetos se cortan en pedacitos con la ayuda de bisturís y se someten a digestión enzimática con tripsina 0.05% (Gibco-BRL) durante 15 minutos a 37°C. La reacción enzimática se para por adición de medio de cultivo compuesto por: DMEM (Sigma) y F12 (Gibco-BRL) (1:1) suplementado con: glucosa 1,5%, glutamina 2 mM, Hepes 10 mM, 10% suero de caballo y 50 U/ml penicilina/estreptomicina (todos los productos se obtienen de Gibco-BRL). A continuación, el tejido es digerido con DNasa 6,5 mg/ml (Sigma) durante 10 minutos a 37°C y pasado este tiempo se procede a centrifugar durante 10 minutos a 1000 rpm. El sobrenadante se elimina y el pellet se resuspende en un volumen de medio de cultivo equivalente a 1 ml por cada 2 embriones. A continuación se siembra 1 ml (que contendrá las células correspondientes a 2 embriones) en placas P-100 y se incuban a 37°C/5%CO₂. A las 24 horas se expande cada placa a dos cambiando el medio por uno libre de suero compuesto por: DMEM (Sigma) y F12 (Gibco-BRL) (1:1), suplementado con: glucosa 1,5%, glutamina 2 mM, Hepes 1M, 50 U/ml penicilina/estreptomicina, suplemento N2 1X (todos obtenidos de Gibco-BRL), EGF 4 ng/ml, FGF 25 ng/ml (ambos de R&D Systems Inc., Minneapolis, MN) y Heparina 2µg/ml (Sigma). Las células crecen en suspensión formando neuroesferas durante 7 días y el medio se cambia cada 3 días.

2.3.1. Transfección de neuroesferas embrionarias

Para llevar a cabo el estudio de sobre-expresión de Ikaros se procede a la transfección de las neuroesferas con el plásmido pMX-IK1-IRES-GFP que codifica para la isoforma 1 de Ikaros unida a la proteína verde EGFP descrito previamente (Gomez-del y col., 2004) y amablemente cedido por la Dra. Katia

Georgopoulos de Cutaneous Biology Research Center, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School. Como plásmido control se utiliza pmax-EGFP que codifica para EGFP (AMAXA Biosystems, Cologne, Germany). A los siete días de cultivo de las neuroesferas, éstas son disgregadas con tripsina 0,05% (Gibco-BRL) y transfectadas por nucleofección siguiendo las instrucciones del protocolo de Amaxa para la transfección de NSC de ratón. Se transfectan 5×10^6 células con 12 μg del plásmido de Ikaros-1 ó 4 μg de plásmido control EGFP utilizando el programa A33 del Nucleofector. Cinco días después de la transfección se cuenta el número de neuroesferas por placa, utilizando la cámara de Neubauer.

Para analizar el efecto de la falta de expresión de Ikaros en la proliferación y auto-renovación de NSC embrionarias, se utilizan embriones derivados de cruces realizados entre animales heterocigotos para Ikaros. El proceso de extracción y cultivo es igual al descrito anteriormente pero en este caso, el cerebro de cada embrión se procesa independientemente a la espera de saber el genotipo de cada uno de ellos. Una vez disgregadas las células, se cuentan utilizando la cámara de Neubauer y se siembran las células correspondientes al cerebro de un embrión en un pocillo de una placa de 6 conteniendo 3 ml de medio. A las 24 horas se cambia el medio por uno libre de suero y las neuroesferas se dejan crecer durante 5 días más cambiando el medio cada tres días. Transcurrido este tiempo se cuenta el número de neuroesferas por pocillo utilizando la cámara de Neubauer. A continuación las neuroesferas se disgregan y se cuenta el número total de células contenidas en las neuroesferas utilizando la cámara de Neubauer. Refiriendo el número total de células al número de neuroesferas conseguimos tener una medida aproximada de la proliferación de los precursores neurales.

2.4. Cultivo de neuroesferas adultas de la zona subventricular

El aislamiento y cultivo de NSC de la zona subventricular del cerebro de ratones adultos se realiza tal y como describen previamente (Ferron y col., 2004). Brevemente, animales de los tres genotipos: normales, heterocigotos y

deficientes de Ikaros se sacrifican por dislocación cervical y sus cerebros son disecados. La zona subventricular de ambos hemisferios es extraída y cortada en 4 o 5 piezas que se incuban en una solución enzimática de papaína que contiene: 900 µg/ml papaína (Worthington-DBA), 170 µg/ml, L-Cisteína y 170 µg/ml EDTA (ambos de Sigma) en EBSS (Gibco-BRL), durante 30 minutos a 37°C con el fin de digerir el tejido. Cada animal se procesa por separado. Pasado este tiempo la papaína se inactiva mediante la adición de 4 ml de medio de cultivo control compuesto por DMEM/F12 (Gibco-BRL) suplementado con: 0,6% glucosa, 0,1% NaHCO₃, 5 mM HEPES (todos obtenidos de Sigma), 2 mM L-Gln, 50 U/ml penicilina/estreptomicina (ambos de Gibco-BRL) y un 10% de mezcla hormonal (mezcla hormonal 10X: DMEM/F12 suplementado con: 0,6% glucosa, 0,1% NaHCO₃, 5 mM HEPES, 0,8 mg/ml apo-transferrina, 0,02 mg/ml insulina bovina, 90 µg/ml putrescina, 160 nM progesterona y 240 nM Na₂SeO₃ (todos los productos se obtienen de Sigma). El tejido se centrifuga a 200 x g durante 5 minutos. Y los sobrenadantes se eliminan y se añaden 3 ml de medio control nuevo para proceder a disgregar el tejido pipeteando unas 10-20 veces con una pipeta pasteur con los bordes redondeados. Se añaden 3 ml más de medio de cultivo control y la suspensión celular se centrifuga a 200 x g durante 10 minutos. El pellet se resuspende en 1 ml de medio de crecimiento compuesto por: medio de cultivo control suplementado con: 4 mg/ml albúmina de suero bovino, 0,7 U/ml heparina (ambos de Sigma), 20 ng/ml EGF (natural de ratón, Gibco-BRL) y 10 ng/ml FGF2 (recombinante humana, Sigma), y se siembra en un pocillo de una placa de 24 pocillos. Las células se incuban en un incubador a 37°C/5%CO₂ y con el paso de los días estas forman neuroesferas primarias.

Las neuroesferas se dejan crecer durante 10 días y pasado este tiempo se pasan. Para ello se recogen y se disocian pipeteando unas 50 veces con una micropipeta de 200 µl. Una vez disociadas las células viables se cuentan por el método de exclusión de azul de tripano en una cámara de Neubauer y se siembran a una densidad de aproximadamente 2.600 células/ml. Se pueden realizar sucesivos pases que nos van a dar lugar a la formación de neuroesferas secundarias y terciarias.

2.5. Cultivo de la línea de NSC: C17.2

La línea de NSC C17.2 utilizada para llevar a cabo los estudios de sobre-expresión del factor de transcripción Ikaros se cultivan tal y como describe Akerud y colaboradores (2001). Las células se mantienen y expanden en medio de cultivo compuesto por DMEM suplementado con: 10% suero fetal bovino, 5% suero de caballo y 2 mM glutamina (todos obtenidos de Gibco-BRL) en condiciones estándar de temperatura y humedad (37°C/5%CO₂). El medio se cambia cada dos días y cuando las células alcanzan un 80-90% de confluencia se pasan realizando una dilución 1:10.

2.5.1. Transfección de la línea C17.2

Para llevar a cabo el estudio de sobre-expresión de Ikaros se procede a la transfección de la línea de NSC C17.2 con el plásmido pMX-IK1-IRES-GFP o el plásmido control pmax-EGFP que codifica para (EGFP). La transfección se lleva a cabo pasando las células el día antes a placas de 6 pocillos tratados con poly-D-lysine (Sigma) realizando una dilución celular 1:5. Cuando las células llegan a un 70-80% de confluencia se transfectan con lipofectamina (lipofectamina 2000 reagent, Gibco-BRL) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para transfectar un pocillo se utilizan 4 µg de plásmido (Ikaros o EGFP) y 20 µl de lipofectamina en un volumen final de 500 µl de medio N2 compuesto por: DMEM-F12 (1:1) (ambos de Gibco-BRL) suplementado con: 10 ng/ml insulina, 100 µg/ml transferrina, 100 mM putrescina, 20 nM progesterona, 30 nM selenito, 6 mg/ml glucosa y 1 mg/ml albúmina de suero bovino, (todos obtenidos de Sigma). Estos 500 µl se añaden a los 1,5 ml de medio N2 que hay en los pocillos donde se encuentran las células y se incuba durante 5 horas. Pasado este tiempo se aspiran los pocillos, se realizan dos lavados con PBS y se añade medio nuevo N2 para permitir que las células se diferencien. 24, 48, 72 y 120 horas después de la transfección las células se tripsinizan, centrifugan y procesan para ser analizadas por PCR cuantitativa.

3. Ensayos de PCR cuantitativa

El RNA total se obtiene de diferentes muestras como:

- ESC a diferentes tiempos del protocolo de diferenciación
- tejido estriatal a diferentes estadios del desarrollo (E14,5, E16,5, E18,5, P3, P7 y P15)
- C17.2 diferenciadas

La extracción se realiza utilizando el kit comercial: *Total RNA Isolation Nucleospin® RNA II Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany)*. Este RNA total (500 ng) se utiliza para sintetizar cDNA utilizando *primers* aleatorios y el kit comercial: *StrataScript® First Strand cDNA Synthesis System (STRATAGENE®, Amsterdam, The Netherlands)*. La síntesis de cDNA se realiza siguiendo las instrucciones del fabricante a 42°C durante 60 minutos en un volumen final de 20 µl. Una vez sintetizado el cDNA se analiza mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR) utilizando los ensayos de expresión génica comerciales TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA) que se detallan en la **tabla 1**. La RT-PCR se realiza en placas de 96 pocillos utilizando un volumen final de 25 µl. El tampón de reacción utilizado contiene 12,5 µl Brilliant® QPCR Master Mix (STRATAGENE®), 1,25 µl TaqMan® Gene Expression Assays y 10–20 ng de cDNA. La reacción se realiza con los siguientes parámetros: desnaturalización inicial realizada a 95°C durante 10 minutos seguida de 40 ciclos de una PCR de dos pasos: 95°C durante 30 segundos y 60°C durante 1 minuto.

El análisis de los datos obtenidos de las PCRs cuantitativas se lleva a cabo utilizando la versión 3.0 del software de análisis MxPro™ QPCR (STRATAGENE®). La cuantificación se realiza mediante un análisis cuantitativo comparativo que lo hemos expresado como: n veces la diferencia de expresión relativa respecto al control utilizado en cada caso y siempre normalizado respecto al gene control 18s.

Todos los ensayos de PCR cuantitativa se repiten un mínimo de 3 veces y únicamente las muestras que muestran resultados consistentes son utilizadas para análisis subsecuentes. Los controles negativos utilizados con el fin de excluir la contaminación por DNA genómico se obtienen omitiendo la

transcriptasa reversa en el paso de la síntesis del cDNA. Estas muestras son sujetas a la reacción de PCR de la misma manera con cada una de las sondas TaqMan® analizadas.

Gen	Sonda TaqMan®
18s	Hs99999901_s1
Oct3/4 (Pou5f1)	Mm00658129_gH
Nestina	Mm00450205_m1
beta-III-tubulin	Mm00727586_s1
GFAP	Mm00546086_m1
Sox-1	Mm00486299_s1
Brachyury	Mm00436877_m1
Olig1	Mm00497537_s1
RARα	Mm00436264_m1
RARβ	Mm01319674_m1
RARγ	Mm00441083_m1
Vimentin	Mm00449208_m1
DARPP-32 (Ppp1r1b)	Mm00454892_m1
Preproenkephalin	Mm01212875_m1
Substance P (Tachykinin-1)	Mm00436880_m1
Ikaros 1 (Zfpn1a1)	Mm01187878_m1

Tabla 1. Listado de sondas TaqMan® utilizadas con el nombre del gen y la sonda a la que corresponde.

4. Western blot

Dos tipos de muestras son sometidas al análisis de la cuantificación proteica mediante la técnica de western blot:

- Cuerpos embrioides formados durante 6 días para la cuantificación de Oct3/4 y β -III-tubulina
- Muestras estriatales correspondientes a E18,5 y P15 para la cuantificación de Ikaros.

En ambos casos, las muestras se centrifugan y el pellet obtenido se homogeniza mediante la sonicación en 300 μ l de tampón RIPA (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 1% Triton X-100, 0,1% dodecil sulfato sódico, 0,5% deoxicholato de sodio, 1mM PMSF, 10 μ g/ml aprotinina, 1 μ g/ml leupeptina). Tras la homogenización, las muestras se

centrifugan dos veces a 12000 x g durante 10 minutos y una vez recuperado el sobrenadante se cuantifica. 30 µg de proteínas del sobrenadante se cargan en un gel de electroforesis de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 7,5% y este gel se transfiere a membranas de Immobilon-P (Millipore, Bedford, MA). Estas membranas se bloquean con una solución de TBS-T (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,05% tween-20) conteniendo un 3% de leche en polvo libre de grasas y una vez bloqueadas se incuban durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario [que fue para los cuerpos embrioides, Oct3/4 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) y β-III-tubulina (Tuj1; 1:500; Sigma) y para las muestras estriatales Ikaros (1:2000; amablemente cedido por Dra. Katia Georgopoulos, Harvard Medical School, Massachusetts)]. Al día siguiente y tras tres lavados en TBS-T, las membranas se incuban con el anticuerpo secundario contra ratón IgG HRP-conjugado (Promega, Mannheim, Germany) en una dilución 1:1000 durante una hora y después se procede al revelado mediante el sistema de análisis de western blots ECL (Bioscience Europe GmbH, Freiburg, Germany). Para realizar el control de carga las membranas se reincuban con un anticuerpo monoclonal contra actina (1:10000; MP Biomedicals, Inc. Illkirch, France), y se revela igual que antes.

Los geles de western blots se escanean y cuantifican utilizando el programa Phoretix 1D Gel Analysis (Phoretix International Ltd., Newcastle, UK).

5. Transducción retroviral de ESC

Las ESC de ratón son transducidas como describe previamente (Pineda y col., 2007) con algunas modificaciones. Brevemente, antes de la transducción las células se pasan las ESC a placas tratadas con gelatina en las mismas condiciones descritas anteriormente (ver apartado 2.1). Cuando las células se encuentran en un 75% de confluencia, se tripsinizan, se siembran en placas de 12 pocillos pre-tratados con gelatina en el mismo medio de cultivo de ESC (ver apartado 2.1) y se transducen con retrovirus que permite la expresión de EGFP (Pineda y col., 2007). Para llevar a cabo la transducción, sobrenadantes virales se

añaden a las células 8 horas diarias durante tres días consecutivos desde el día después de haber sido sembradas. Las células con mayores niveles de expresión de EGFP se purifican por el método Fluorescent-Activated Cell Sorting (FACS; MoFlo Flow Cytometer; Cytomation Inc., Fort Collins, USA). Las células resultantes se expanden como clones y se cultivan sobre fibroblastos inactivados mitóticamente, tal y como se describe en las condiciones de mantenimiento (ver apartado 2.1).

6. Trasplantes celulares

Con el fin de minimizar el rechazo inmunológico, los trasplantes celulares se realizaron en ratones macho adultos inmunodeficientes (Nude mice Swiss nu/nu; 25-35 gr) obtenidos de Charles River Laboratories (Les Oncins, France). Para realizar el trasplante celular, los animales son anestesiados con pentobarbital (50 mg/kg; i.p.) y dispuestos en el aparato estereotáxico Stoelting (Wood Dale, IL).

Los cuerpos embrioides se forman durante 4 días en ausencia de LIF y se tratan durante los dos últimos días de formación con ácido retinóico a la concentración 10^{-8} M, excepto en la condición control, en la que este tratamiento final con ácido retinoico no se lleva a cabo. Una vez formados los cuerpos embrioides son adheridos a placas de cultivo (tal y como se describe en el apartado 2.1) y seis días después, el cultivo se tripsiniza, se disocia con una pipeta pasteur y se transfiere a un tubo cónico donde los cuerpos embrioides no disgregados se dejan depositar en el fondo del tubo durante 5 minutos. Pasado este tiempo se toman los sobrenadantes y se pasan a otro tubo para ser centrifugados. El pellet resultante se resuspende en medio ESC (ver apartado 2.1) que contiene 22 U/ml de DNAsa (Sigma) para conseguir una dilución final de 100.000 células/ μ l. Las ESC diferenciadas, así como las no diferenciadas (ESC en proliferación) se trasplantan en las siguientes coordinadas (en milímetros): anteroposterior (AP), + 0.5; lateral (L) \pm 2 del punto bregma y dorsoventral (DV), - 2.7 del punto dura. El trasplante celular se realiza bilateralmente; 100.000 células son trasplantadas en cada hemisferio a la

velocidad de 0,5 µl/min y la viabilidad celular es superior al 98% al inicio y superior al 90% al final de la sesión de trasplantes, lo cual es determinado por el método de exclusión de azul de tripano.

7. Estudio de proliferación celular: tratamiento con BrdU

Se han llevado a cabo diferentes estudios de proliferación celular tanto *in vitro* como *in vivo* los cuales se describen a continuación:

7.1. Estudio de proliferación de las ESC en diferenciación

Con el fin de analizar las poblaciones proliferantes en las diferentes condiciones de diferenciación de las ESC realizamos un pulso de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). El marcador mitótico se añade al cultivo 5 días después de haber adherido los cuerpos embrioides, a una concentración de 3 µg/ml. Veinticuatro horas después, las células se fijan con paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (PB; 0,1 M; pH 7,4), se lavan tres veces con PBS, se tratan con HCl 2 M durante 30 minutos y se lavan de nuevo cuatro veces más con PBS. Una vez realizados estos tratamientos y lavados, se procede a la detección inmunocitoquímica de BrdU tal y como se describe en el apartado 9.

7.2. Estudio de proliferación de las ESC diferenciadas y trasplantadas

Para hacer un seguimiento de la proliferación de las ESC diferenciadas y trasplantadas se inyecta BrdU (50 mg/kg; i.p.; Sigma) a los animales dos días después del trasplante. Veinticuatro horas después los animales se anestesian profundamente con pentobarbital (50 mg/kg; i.p.) y se perfunden transcardiacamente con una solución de paraformaldehído al 4% en PB 0,1 M, de pH 7,2. El tejido cerebral es postfijado durante 2 horas en la misma solución, crioprotegido con soluciones de concentraciones crecientes de sucrosa en PBS (10-30% sucrosa/PBS) y congelado en isopentano enfriado en CO₂ sólido. Las secciones coronales obtenidas de dichos cerebros son tratadas con HCl 2 M y

procesadas para la detección inmunohistoquímica de BrdU tal y como se describe previamente (Bosch y col., 2004).

7.3. Estudio de proliferación durante el desarrollo del núcleo estriado

Con el fin de estudiar si la falta de expresión de Ikaros está afectando a la diferenciación de neuronas estriatales a diferentes estadios del desarrollo, ratones heterocigotos de Ikaros gestantes son inyectados intraperitonealmente a diferentes días de gestación: E12,5, E14,5 y E16,5 con BrdU (50 mg/kg; i.p; Sigma) en una solución isotónica de NaCl 0,9%. Dichos embriones continúan su desarrollo hasta E18,5, momento en el cual son extraídos previa anestesia de las madres gestantes. De esta manera, conseguimos que las células que experimenten su última división en el momento de la inyección de BrdU lo incorporen y lo mantengan indefinidamente, mientras que las células que continúen proliferando, lo diluirán.

Por otro lado, con el fin de detectar las células que se encuentran proliferando en la LGE a E14,5, ratones heterocigotos de Ikaros gestantes son inyectados con BrdU (50 mg/kg; i.p; Sigma) en ese día gestacional y 30 minutos después son sacrificados con el fin de extraer los embriones. De esta manera, las células que se encuentren proliferando en el momento de la inyección de BrdU, lo incorporarán y lo mantendrán porque en media hora no les da tiempo a diluirlo.

Los cerebros de los embriones son extraídos y fijados durante 24 horas en una solución de paraformaldehído al 4% en PB 0,1 M, de pH 7,4. Una vez fijados son crioprottegidos en soluciones de concentraciones crecientes de sucrosa en PBS (10-30% sucrosa/PBS) y congelados en isopentano enfriado en CO₂ sólido. Las secciones coronales obtenidas de dichos cerebros se incuban en HCl 2N durante 20 minutos a 37°C para desnaturalizar el DNA y se neutraliza la acción del HCl incubando las secciones durante 10 minutos en una solución de borato 0,1 M, pH 8,5, a temperatura ambiente. A continuación son procesadas para la detección inmunohistoquímica de BrdU tal y como se describe previamente (Bosch y col., 2004). Como mínimo tres embriones

normales y tres embriones deficientes de Ikaros fueron analizados para cada tiempo de administración de BrdU.

7.4. Estudio de proliferación en la zona subventricular adulta

Con el fin de determinar si la falta de expresión de Ikaros durante el desarrollo está afectando a la zona subventricular adulta se efectúa un estudio de proliferación en esta zona. Para ello se inyectan siete dosis de BrdU (50 mg/kg; i.p.; Sigma) cada dos horas, a animales de los tres genotipos: normales, heterocigotos y deficientes de Ikaros. Los animales se sacrifican 1 hora después de la última inyección, los cerebros son extraídos y fijados por inmersión en la solución de Carnoy durante toda la noche. Al día siguiente, el tejido es deshidratado secuencialmente en soluciones de etanol al 70%, 96% y 100% en las que se deja 3 horas en cada una y a continuación se realiza un lavado de 20 minutos en tolueno tras el cual el tejido se transfiere a una solución mixta que contiene tolueno:parafina (1:1) durante 1 hora a 60°C. Se lava en parafina líquida y se coloca en un molde. Para la inmunodetección fluorescente de BrdU las secciones se rehidratan en tolueno y en soluciones de concentraciones decrecientes de alcohol (100%, 96% y 70%) seguidas por un lavado de 10 minutos de agua. A continuación las secciones se incuban en HCl 2N durante 20 minutos a 37°C para desnaturalizar el DNA y se neutraliza la acción del HCl incubando las secciones durante 10 minutos en una solución de borato 0,1 M pH 8,5 a temperatura ambiente. La inmunohistoquímica contra BrdU se realiza tal y como se describe en el apartado 9.

7.5. Estudio de proliferación de neuroesferas embrionarias

Para estudiar el efecto de la sobre-expresión de Ikaros en la proliferación de neuroesferas embrionarias, dos días después de la transfección las neuroesferas se adhieren a placas de 24 pocillos tratadas con matrigel. Una hora después de la adhesión se realiza un pulso de cinco minutos con BrdU (3 µg/ml; Sigma) . A continuación las células se fijan con paraformaldehído al 4% en PB 0,1 M, pH 7,4 durante 20 minutos, se lavan tres veces con PBS, se incuban

en HCl 2N durante 20 minutos a 37°C para desnaturalizar el DNA y se neutraliza la acción del HCl incubando las células durante 10 minutos en una solución de borato 0,1 M, pH 8,5, a temperatura ambiente y finalmente se lavan de nuevo cuatro veces más con PBS. Una vez realizados estos tratamientos y lavados, las células son procesadas para la detección inmunocitoquímica de BrdU tal y como se describe en el apartado 9.

8. Citometría de flujo

El análisis del ciclo celular de los cuerpos embrioides a los seis días de formación se realiza por citometría de flujo y para ello los cuerpos embrioides son inicialmente disgregados hasta conseguir una suspensión de células individuales tal y como se describe a continuación. Los cuerpos embrioides son incubados con tripsina al 0,25% (Gibco-BRL) durante 15 minutos a 37°C. Tras la adición de un 10% de suero fetal bovino (Gibco-BRL), las células son tratadas con DNasa I (10 µg/ml; Sigma) durante 10 minutos antes de proceder a la disgregación mecánica. Una vez disgregadas, las células son purificadas de la posible presencia de algún agregado pasándolas a través de un filtro de 40 µm. Las células que pasan a través del filtro se lavan dos veces con PBS y son fijadas en metanol durante toda la noche a -20°C. Tras dos lavados en PBS, las células se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente con una solución de yoduro de propidio a 20 µg/ml (Molecular Probes. Invitrogen) y 0,2 mg/ml de RNasa A (DNase-free) en 0,1% Triton X-100-PBS (ambos productos obtenidos de Sigma). Finalmente el porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular es detectado y cuantificado por citometría de flujo.

9. Procedimientos de inmunotinción

Los anticuerpos usados en los ensayos de inmunotinción se detallan en la **Tabla 2.**

9.1. Inmunocitoquímica

Los diferentes tipos de cultivos sometidos a detección inmunocitoquímica son los siguientes:

- Cuerpos embrioides a los 6 DIV de la fase de selección de precursores neurales
- Cultivos primarios de LGE a E14,5 a los 5 DIV en cultivo
- Neuroesferas embrionarias

Para la detección de antígenos específicos en las células en cultivo se procede de la siguiente forma. Los cultivos son fijados, en los días establecidos para cada tipo de cultivo, con paraformaldehído al 4% en PB 0,1 M de pH 7,4 durante 20 minutos. Después de una incubación de 30 minutos en PBS + Tritón X-100 (0,3%) + suero normal de caballo (30%), los cultivos son incubados toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios adecuados disueltos en PBS + Tritón X-100 (0,3%) + suero normal de caballo (5%). Seguidamente se someten a tres lavados con PBS y se incuban con el anticuerpo secundario apropiado durante 2 horas a temperatura ambiente. Para la inmunodetección por fluorescencia se ha usado el anticuerpo contra-conejo conjugado a Fluoresceína (1:100; Vector laboratories, Burlingame, CA), o bien el anticuerpo contra-ratón conjugado con Texas-Red (1:200; Jackson Immunoresearch Laboratories Inc., West Grove, PE). Alternativamente se han usado anticuerpos secundarios biotinilados contra los mismos antígenos, en cuyo caso se han visualizado mediante el método de la avidina-biotina (ABC; Pierce, Rockford, IL), y finalmente revelado con 3,3'-diaminobenzidina (DAB). Los procedimientos inmunocitoquímicos se han realizado usando los mismos tiempos de revelado para todas las condiciones de cultivo para así realizar las comparaciones de forma adecuada.

Los cuerpos embrioides formados en suspensión durante 4 ó 6 días son fijados con paraformaldehído al 4% en PB 0,1 M de pH 7,4 durante 1 hora, crioprottegidos en PBS conteniendo un 20% de sucrosa y congelados inmersos en OCT (Tissue-Tek, Sakura Finetek Europe) con isopentano enfriado en CO₂ sólido. Secciones de 10 µm de grosor son recolectadas en serie en portaobjetos pretratados con silane (Sigma) y procesadas para detección inmunocitoquímica fluorescente de β-III-tubulina junto con la contratinción nuclear de 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma) siguiendo el mismo protocolo descrito a continuación para la detección de antígenos en tejido.

9.2. Inmunohistoquímica

Para la detección de antígenos específicos en tejido cerebral por inmunohistoquímica se han procesado las siguientes muestras.

- cerebros trasplantados con células ESC diferenciadas (3 ó 14 días después del trasplante)
- cerebros de animales normales y deficientes de Ikaros a P3 y adultos (1 mes) para análisis del núcleo estriado
- cerebros de animales normales y deficientes de Ikaros a E14,5 y E18,5 así como animales deficientes de Ebf-1 a la edad de E18,5
- cerebros de animales normales y deficientes de Ikaros a edad adulta (2 meses) para análisis de la zona subventricular

Para llevar a cabo la detección de antígenos específicos en las dos primeras muestras los ratones son perfundidos transcardíacamente con paraformaldehído al 4% en PB 0,1 M de pH 7,4 a los tiempos citados para cada muestra. Los cerebros son extraídos, postfijados durante 2 horas a 4°C en la misma solución y criopreservados en soluciones de concentraciones crecientes de sucrosa en PBS (10-30% sucrosa/PBS). Se congelan en isopentano enfriado en CO₂ sólido y se cortan secciones de 30 µm de espesor en el criostato (Leica Microsystems GMBH, Wetzlar, Germany) las cuales se recogen en flotación en PBS. Para el bloqueo de la autofluorescencia se incuban las secciones con 50 mM de cloruro amónico. El tejido se permeabiliza y se bloquea con PBS + Tritón X-100 (0,3%) + suero normal de caballo (1,5%) + suero bovino de albúmina (1%) a temperatura ambiente durante 1 hora. La incubación con los anticuerpos primarios se lleva a cabo a 4°C durante toda la noche en la misma solución. Después de los lavados se incuban las secciones con los anticuerpos secundarios fluorescentes adecuados durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, las secciones se montan con Mowiol (Merck Chemicals Ltd., Nottingham). Alternativamente se han usado anticuerpos secundarios biotinilados contra los mismos antígenos, en cuyo caso se han visualizado mediante el método del ABC (Pierce), y finalmente revelado con DAB. Los procedimientos immuno-

ORIGEN	ANTIGENO	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL
<i>ratón</i>	BrdU	1:50	Dako A/S, Glostrup, Germany
<i>conejo</i>	BrdU	1:1500	Megabase Research Products, Lincoln, Nebraska
<i>ratón</i>	NeuN	1:100	Chemicon, Temecula, CA
<i>ratón</i>	Nestin	1:50	Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa
<i>ratón</i>	Tuj1	1:400	Sigma Chemical Co., St Louis, MO
<i>conejo</i>	Tuj1	1:200	Sigma Chemical Co., St Louis, MO
<i>ratón</i>	Oct3/4	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)
<i>ratón</i>	MAP-2	1:200	Sternberger Monoclonals, Lutherville, MD, USA
<i>conejo</i>	TH	1:4000	Diasorin Saluggia, Italy
<i>conejo</i>	GFAP	1:1000	Dako A/S, Glostrup, Germany
<i>ratón</i>	GFAP	1:500	Sigma Chemical Co., St Louis, MO
<i>ratón</i>	GABA	1:100	Sigma Chemical Co., St Louis, MO
<i>ratón</i>	GAD 65/67	1:5000	Sigma Chemical Co., St Louis, MO
<i>conejo</i>	DARPP-32	1:500	Chemicon, Temecula, CA
<i>conejo</i>	Encefalina	1:2000	ImmunoStar, Inc.
<i>conejo</i>	Sustancia P	1:2000	ImmunoStar, Inc.
<i>ratón</i>	Parvalbúmina	1:1250	Sigma Chemical Co., St Louis, MO
<i>conejo</i>	ChAT	1:4000	Chemicon, Temecula, CA
<i>ratón</i>	Ikaros	1:1000	Cedido por Dra. K. Georgopoulos
<i>conejo</i>	EGFP	1:200	Abcam Ltd, Cambridge, UK
<i>ratón</i>	PSA-NCAM	1:250	AbCyS, France
<i>ratón</i>	Actina	1:10000	MP Biomedicals Inc., Illkirch, France

Tabla 2. *Lista de anticuerpos usados, con su origen, su nombre comercial o antígeno que reconoce, la dilución a la que se ha usado y su casa comercial.*

histoquímicos se han realizado usando los mismos tiempos de revelado para todas las secciones para así realizar las comparaciones de forma adecuada.

Los cerebros de animales normales y deficientes de Ikaros utilizados para el estudio de la zona subventricular adulta se procesan tal y como se describe a continuación. Los cerebros se lavan en parafina líquida y se colocan en un molde para proceder a cortarlos en un microtomo (Leica Microsystems GmbH) en secciones seriadas consecutivas de 7 μm de grosor, realizando series paralelas de diez portas conteniendo 10 secciones cada uno. Para la determinación específica de anticuerpos por inmunohistoquímica se procede tal y como se ha descrito anteriormente. Los anticuerpos secundarios utilizados en este caso han sido Cy3-conjugado contra ratón (1:500; Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Suffolk, UK), Alexa 488 contra ratón IgG (1:600), Alexa 647 contra conejo (1:600; ambos de Molecular Probes). Las secciones se montan en Fluorsave (Merck).

También se ha llevado a cabo la detección de antígenos específicos en tejido cerebral embrionario de E14,5 y E18,5. Para ello se extraen los embriones de sus madres previa anestesia de éstas y se disecan sus cerebros para después fijarlos en paraformaldehído al 4% en PB 0,1 M de pH 7,4 y criopreservarlos en soluciones de concentraciones crecientes de sucrosa en PBS (10-30% sucrosa/PBS). Se congelan con isopentano enfriado en CO₂ sólido y se cortan secciones coronales de 14 μm en un criostato (Leica Microsystems GmbH) que son recogidas serialmente sobre portaobjetos previamente tratados con silane (Sigma). Las secciones son postfijadas durante 15 minutos con paraformaldehído al 4% en PB 0,1 M de pH 7,4, excepto en la detección inmunohistoquímica de BrdU, en la cual después de dos lavados se procede tal y como se describe en el apartado 7.3. A continuación, en ambos casos se realizan tres lavados con PBS, se permeabiliza y se bloquea con PBS + Tritón X-100 (0,3%) + suero bovino de albúmina (1%) a temperatura ambiente durante 1 hora y las secciones son incubadas con los anticuerpos primarios a 4°C durante

toda la noche. Después de dos lavados se incuban las secciones con los anticuerpos secundarios (contra-conejo Cy2, 1:150 y contra-ratón Cy3, 1:200, (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.) durante dos horas a temperatura ambiente. Finalmente las secciones se montaron con Mowiol (Merck).

Algunos cultivos o secciones de tejido son contrateñidos con DAPI (Sigma) para visualizar y contar el número total de células. En las inmunocitoquímicas dobles ambos anticuerpos primarios y secundarios fueron incubados al mismo tiempo. No se ha observado ninguna señal en ensayos control en los que no se ha añadido el anticuerpo primario. Microscopía confocal se ha utilizado para tomar las fotomicrografías fluorescentes.

10. Ensayo de TUNEL para la detección de muerte celular

Para la detección de células en proceso de muerte celular, principalmente a través de apoptosis, se ha utilizado el Sistema de Detección de Apoptosis *in situ* (Promega). La técnica del TUNEL (*TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling*) permite la detección del DNA fragmentado mediante el marcaje con dUTP marcado con un fluorocromo que se une covalentemente a los extremos libres de DNA.

Las muestras procesadas para dicho ensayo son:

- animales trasplantados con ESC diferenciadas, tres días después del trasplante
- embriones normales y deficientes de Ikaros de 18,5 días de gestación.

En ambos casos los cerebros son disecados y congelados directamente en isopentano enfriado en CO₂ sólido. Secciones coronales de 14 µm son recogidas serialmente sobre portaobjetos previamente tratados con silane (Sigma) y procesadas tal y como indica el fabricante para la detección de muerte celular. Posteriormente, las secciones correspondientes a tejido cerebral de animales trasplantados con ESC diferenciadas son procesadas para la inmunodetección de EGFP, siguiendo el protocolo que se detalla en el apartado anterior.

11. Hibridación *in situ*

Se han llevado a cabo varias hibridaciones *in situ* para el análisis de la expresión de diferentes mRNAs como el de Ikaros, encefalina y sustancia P, Dlx-2, Dlx-5 y Ebf-1. A continuación se describe cada uno de ellos.

11.1. Hibridación *in situ* para la detección de la expresión de Ikaros

11.1.1. Detección de Ikaros durante el desarrollo estriatal

Para analizar la expresión de Ikaros en el sistema nervioso central en desarrollo, secciones de 14 μm de animales de las siguientes edades E12,5, E14,5, E16,5, E18,5, P3, P7 y P15 son recogidas serialmente sobre portaobjetos tratados con silane (Sigma) y procesadas mediante hibridación *in situ* radioactiva tal y como se describe previamente (Marco y col., 2002b). La sonda utilizada se obtuvo de la siguiente manera: la sonda de Ikaros es complementaria a las bases 93-137 de la secuencia de Ikaros (GenBank accession number MN_009578 [GenBank]) y fue sintetizada comercialmente mediante el sintetizador de OPERON (OPERON Biotechnologies, Germany.)

11.1.2. Detección de Ikaros en ratones deficientes para Dlx-1/2

Embriones de E18,5 deficientes de Dlx-1/2 son utilizados para analizar la expresión de Ikaros. Como no se han observado diferencias entre los fenotipos de los ratones Dlx-1/2 +/+ y los ratones Dlx-1/2 +/- se han utilizado ambos como controles. Los embriones son anestesiados mediante enfriamiento, diseccionados y fijados por inmersión en una solución de paraformaldehído al 4% en PBS durante 4-12 horas. Las muestras son crioprotegidas mediante inmersión en un gradiente de sucrose (10-30%), congeladas embebidas en OCT (Tissue-Tek) y cortadas en secciones de 20 μm utilizando un criostato. La hibridación *in situ* se realiza utilizando ribosondas de digoxigenina en secciones congeladas de 20 μm tal y como se describe previamente (Schaeren-Wiemers y Gerfin-Moser, 1993). El cDNA de Ikaros fue amablemente cedido por la Dra. Katia Georgopoulos (Georgopoulos y col., 1994).

11.2. Hibridación *in situ* para la detección de la expresión de encefalina y sustancia P

Para analizar la expresión de encefalina y sustancia P, secciones coronales y sagitales de animales normales y deficientes de Ikaros a la edad postnatal de P3 y P7 fueron procesados por hibridación *in situ* radioactiva tal y como se ha descrito previamente (Marco y col., 2002b). Para este análisis las sondas de oligodesoxiribonucleótidos utilizadas se obtuvieron de la siguiente manera: la sonda de encefalina es complementaria a las bases 513-542 de la secuencia de encefalina (GenBank accession number K02807 [GenBank]) y fue sintetizada mediante el sintetizador de DNA 380 de Applied Biosystem (Foster City Biosystem, Foster City, CA) y la sonda de sustancia P es complementaria a las bases 223-270 de la secuencia de preprotaquiquina A (GenBank accession number M34183 [GenBank]) y fue sintetizada mediante Isogen Bioscience BV (Maarsse n, The Netherlands).

Cuantificación de la expresión de encefalina y sustancia P. Los niveles de expresión de encefalina y sustancia P se cuantifican sobre las películas de la hibridación *in situ* (n=4) como se describe previamente en (Pineda y col., 2005). Secciones consecutivas (23-29 secciones por animal) se escanean, y los niveles de mRNA se analizan utilizando el programa ImageJ (National Institute of Mental Health, Bethesda, MD). La intensidad se cuantifica en un área cuadrada de 152.4 μm^2 y la señal de fondo de la misma área adyacente fuera del cerebro es sustraída. Los resultados son expresados como la media de varios animales, y las barras de error representan el error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se hace utilizando el *test t de Student*.

11.3. Hibridación *in situ* para la detección de la expresión de *Dlx-2*, *Dlx-5* y *Ebf-1*

Para analizar la expresión de *Dlx-2*, *Dlx-5* y *Ebf-1* se utilizan embriones de E15,5 mutantes para Ikaros y salvajes que se utilizan como control. Los embriones son anestesiado mediante enfriamiento, diseccionados y fijados por inmersión en una solución de paraformaldehído al 4% en PBS durante toda la

noche a 4°C. Las muestras son crioprotegidas mediante inmersión en un gradiente de sucrosa al 30%, congeladas embebidas en OCT (Tissue-Tek) y cortadas en secciones de 20 µm utilizando un criostato (Leica microsystems). La hibridación *in situ* se realiza utilizando ribosondas de digoxigenina en secciones congeladas de 20 µm tal y como se describe previamente (Flames y col., 2004).

12. Recuentos celulares

Todos los recuentos celulares se realizan a ciegas (n= 4-7 para cada grupo y/o condición y antígeno), es decir sin saber a que muestra pertenecen, para evitar desviaciones subjetivas por parte del investigador.

12.1 Recuentos celulares en los experimentos de diferenciación y trasplante de ESC

En los cultivos de ESC diferenciadas, a los 6 DIV de la fase de selección celular se cuentan las células positivas para BrdU, Nestina y β-III-tubulina en campo claro y el número obtenido se relativiza al número total de células presente en el mismo campo contadas por contraste de fases. Campos aleatorios que comprenden el 5% del pocillo son analizados para contar el número de células positivas para cada anticuerpo de un mínimo de tres experimentos independientes.

Núcleos teñidos con DAPI se cuentan para estimar el número total de células en cada condición de diferenciación de ESC a los seis días de la fase de selección celular. Tanto el número total de células como las células positivas para BrdU se cuentan en tres pocillos de tres cultivos independientes.

El número total de cuerpos embrioides positivos para Oct3/4 por pocillo se cuentan en campo claro y el número obtenido se relativiza al número total de cuerpos embrioides por pocillo que se cuentan por contraste de fases. Todos los recuentos se realizan al menos de tres experimentos independientes.

Para el recuento de células ESC diferenciadas positivas para BrdU tras el trasplante, una de cada diez secciones coronales se procesa para la inmunohistoquímica contra BrdU. El número total de células positivas para BrdU por sección se cuenta y el número total por núcleo estriado se estima

utilizando el método de Cavalieri y corregido con el método Abercrombie (Abercrombie, 1946). Los números finales son expresados como la media de tres animales por condición \pm SEM.

12.2. Recuentos para la evaluación de la capacidad de auto-renovación y proliferación de neuroesferas embrionarias

Con el fin de evaluar la capacidad de auto-renovación de las NSC embrionarias se cuenta por contraste de fases el número de neuroesferas primarias formadas a partir del cerebro de animales normales, heterocigotos y deficientes de Ikaros a los 5 días después de haber realizado el cultivo primario. El número de neuroesferas es expresado de dos maneras, como el número total de neuroesferas por cerebro para cada genotipo y como el número de neuroesferas formadas por cada 10^6 células para evitar un efecto debido al tamaño del cerebro (ya que los ratones deficientes de Ikaros son más pequeños). A partir de estos experimentos también se analiza la capacidad de proliferación de las NSC embrionarias. Para ello se cuenta el número de neuroesferas, éstas se disgregan y se procede a contar el número total de células que contenían dichas neuroesferas con la cámara de Neubauer. Relativizando el número total de células al número total de neuroesferas tendremos una estimación del número de células que hay por neuroesfera y esto se expresa como el porcentaje medio de cada genotipo respecto al control (considerado el 100%) de un mínimo de tres experimentos independientes.

Estos mismos parámetros se analizan en las neuroesferas embrionarias que sobre-expresan Ikaros. La auto-renovación se evalúa contando el número de neuroesferas cinco días después de la transfección y el resultado es expresado como el porcentaje medio de neuroesferas transfectadas con Ikaros respecto al control EGFP (considerado el 100%). El estudio de proliferación en este caso se realiza mediante un ensayo de BrdU descrito anteriormente (ver apartado 7.4). El recuento de las células BrdU positivas nos permite estimar el número de células que se encuentran en proliferación, respecto al número total de células que se determina por recuento de núcleos teñidos con DAPI. El

resultado se expresa como el porcentaje medio de células BrdU respecto al total de células en el cultivo, de un mínimo de tres experimentos independientes.

12.3. Recuentos para la evaluación de la capacidad de auto-renovación y proliferación de neuroesferas adultas

También se evalúa la capacidad de auto-renovación de las NSC adultas, para lo cual se cuenta por contraste de fases el número de neuroesferas primarias formadas a partir de la zona subventricular de animales normales, heterocigotos y deficientes de Ikaros a los 6 días después de haber realizado el cultivo primario. Para evaluar la formación de neuroesferas secundarias tras el primer pase se siembran 500 células por pocillo en una placa de 96 en 200 μ l de medio de cultivo y a los 6 días se cuenta el número de neuroesferas por contraste de fases. El resultado se expresa como el porcentaje medio de neuroesferas primarias y secundarias de cada genotipo respecto al control (considerado el 100%) de cómo mínimo tres experimentos independientes. A partir de estos experimentos también se analiza la capacidad de proliferación de las NSC adultas. Para ello se procede tal y como se ha descrito anteriormente para las neuroesferas embrionarias.

12.4. Recuentos de los diferentes tipos de células presentes en la zona subventricular adulta

El recuento de células B, positivas para GFAP, de células A positivas para PSA-NCAM y células C en la zona subventricular adulta, así como el recuento del número total de células BrdU positivas de animales normales y deficientes de Ikaros se ha realizado como describe (Ferron y col., 2007). Brevemente, cinco secciones alternativas de cada porta comprendiendo series de la zona subventricular son procesadas para las inmunohistoquímicas correspondientes y contadas utilizando microscopio fluorescente. Debido a la falta de anticuerpos específicos para las células C, el recuento de este tipo celular se realiza indirectamente contando las células no positivas para GFAP ni para PSA-NCAM. Los resultados son expresados como el número total medio de células B, Células C y BrdU positivas presentes en la zona germinal de un mínimo de tres animales de cada genotipo. En dichas secciones también se

realiza el recuento de células B/BrdU positivas, células C/BrdU positivas y células A/BrdU positivas por microscopia confocal. El resultado se expresa como el porcentaje medio de células B/BrdU positivas, células C/BrdU positivas y células A/BrdU positivas respecto al número total de células B, células C y células A respectivamente, de un mínimo de tres animales por genotipo.

12.5. Recuentos estereológicos

- ✓ **Volúmenes:** Los volúmenes del cerebro, bulbo olfativo, zona germinal y núcleo estriado de animales normales y deficientes de Ikaros se determinan utilizando una herramienta informática estereológica asistida por ordenador (CAST) que se encuentra acoplado a un microscopio Olympus (Olympus Danmark A/S, Ballerup, Denmark). Secciones consecutivas (14-16 secciones por animal) son visualizadas, y los bordes de la estructura anatómica marcadas. Los volúmenes son calculados multiplicando la suma de todas las áreas de las diferentes secciones (milímetros cuadrados) por la distancia entre secciones sucesivas (0.3 mm para adultos y 0.14 mm para embriones o animales postnatales) tal y como ha descrito previamente (Canals y col., 2004).
- ✓ **Recuentos celulares:** Recuentos estereológicos se han realizado para las inmunohistoquímicas contra NeuN, DARPP-32, Parvalbúmina y ChAT en el núcleo estriado de animales normales y deficientes de Ikaros, así como para las células positivas para BrdU en la zona germinal y el primordio estriatal de embriones de animales normales y deficientes de Ikaros. Para realizar estos recuentos se ha utilizado un software con herramientas estereológicas asistidas por ordenador (Olympus). Este método de recuento se ha utilizado para analizar secciones coronales separadas 300 μm entre ellas para adultos y 140 μm embriones. Los marcos de recuento son escogidos al azar. La metodología concreta se ha llevado a cabo tal y como se ha descrito previamente (Canals y col., 2004).

13. Estadística

Todos los resultados se expresan como la media de diferentes experimentos independientes \pm SEM. Para el análisis estadístico se ha realizado el test *t* de *Student* o una ANOVA de una vía seguida del test *post-hoc* de *Bonferroni*.