



TERAPIA CELULAR MEDIANTE PRECURSORES GABAÉRGICOS Y SU APLICACIÓN EN ENCEFALOPATÍAS INFANTILES

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Ldo. Daniel Rodríguez Martínez

Para optar al grado de Doctor en Biología

Director: Dr. Manuel Álvarez Dolado





TERAPIA CELULAR MEDIANTE PRECURSORES GABAÉRGICOS Y SU APLICACIÓN EN ENCEFALOPATÍA INFANTILES.

Tesis presentada por DANIEL RODRÍGUEZ MARTÍNEZ para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad de Sevilla, en el programa de doctorado de Biología Molecular y Biomedicina en la línea de investigación de Investigaciones Biomédicas (Departamento de Fisiología Médica y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla).

Trabajo realizado gracias a la beca predoctoral PFIS (FI 08) del Instituto de Salud Carlos III en el laboratorio de Terapia celular en Neuropatologías del Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER) de Sevilla, así como sendas estancias en el Children's Hospital of Philadelphia en Filadelfia, Estados Unidos, y en el "National Institute for Medical Research" de Londres, Reino Unido.

Este trabajo ha contado con la supervisión del Dr. Manuel Álvarez Dolado como director de Tesis y el Dr. Ricardo Pardal Redondo como tutor.



Dr. Manuel Álvarez Dolado, Titular Científico del CSIC en el Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER).

Dr. Ricardo Pardal Redondo, Profesor titular del Departamento de Fisiología Médica y Biofísica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla.

INFORMAN:

Que el trabajo titulado **TERAPIA CELULAR MEDIANTE PRECURSORES GABAÉRGICOS Y SU APLICACIÓN EN ENCEFALOPATÍA INFANTILES** ha sido realizado íntegramente por D. Daniel Rodríguez Martínez bajo nuestra dirección. Dicha memoria está concluida y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos la presente en Sevilla 24., Octubre de 2013.

Fdo: Dr. Manuel Álvarez Dolado

Fdo: Dr. Ricardo Pardal Redondo

*A mi mujer Lole por todo su apoyo y
cariño, y a mi hija Julia.*

*A mis Padres y Hermano, por
enseñarme que todo esfuerzo tiene
su recompensa.*

Agradecimientos:

Agradecer al Instituto de Salud Carlos III, por haberme otorgado la beca predoctoral PFIS (FI 08) para la realización de esta Tesis Doctoral.

A la Organización Europea de Biología Molecular (EMBO) por otorgarme una beca (short-term Fellowships) para la realización de mi estancia formativa en Estados Unidos

*Agradecer la presente Tesis Doctoral a mi Director de Tesis, el **Dr. Manuel Álvarez Dolado**, por su confianza, consejos y enseñanzas durante la realización de la presente Tesis Doctoral.*

*A mi tutor **Dr. Ricardo Pardal Redondo**, por haber confiado en el proyecto de Tesis.*

*Agradecer al laboratorio del **Dr. Jeffrey Golden** del Children's Hospital of Philadelphia en Filadelfia, Estados Unidos por su amabilidad y cercanía durante mi estancia y haberme dado la oportunidad de realizar una estancia en su laboratorio. Y en especial al **Dr. Eric Marsh** por enseñarme a realizar, analizar y comprender los registros de Electroencefalogramas.*

*Agradecer al laboratorio del **Dr. Vassilis Pachnis** del "National Institute for Medical Research" de Londres, Reino Unido, por darme la oportunidad hacerme formar parte de su grupo durante mi estancia en su laboratorio, en especial agradecer al **Dr. Guilherme Neves** quien hizo de mi estancia en Londres una experiencia muy gratificante.*

*Agradecer a todos los técnicos del Centro Andaluz en Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER), en especial a **Lole** y a **Cindy**.*

*Y por último agradecer a todos mis compañeros de laboratorio, con los que he compartido horas de sacrificio y trabajo. En especial a **Marina**, y a **Marina Inês** quienes además de compañeras, se han convertido con el paso de los años en amigas fuera del laboratorio*

Índice

Abreviaturas

Introducción

1. Encefalopatías Infantiles

1.1 Clasificación de las Encefalopatías Epilépticas Infantiles

1.2 Encefalopatía catastrófica infantil, Síndrome de West

1.2.1 Clasificación y epidemiología del SW

1.2.2 Etiología del SW: genes implicados y epileptogénesis

1.3 Modelos animales de Encefalopatías Epilépticas Infantiles

1.3.1 Modelos animales de SW:

Líneas mutantes para *Arx*

1.3.2 Otros modelos de Encefalopatías Infantiles:

Líneas transgénicas Hipomórficas para *Lhx6*

1.4 Tratamientos para las EEI y el SW

3 Posibles Terapias basadas en Células para las EEI y el SW

2.1 Medicina Regenerativa y Células Madres

2.2 Terapia Celular y epilepsia.

2.3 Tratamientos mediante Precursores GABAérgicos: antecedentes.

3. Criopreservación para Terapias Celulares.

3.1 Antecedentes

3.2 Criopreservación de Progenitores Nerviosos

Hipótesis

Objetivos

Material y Métodos

1. Animales de Experimentación
 - 1.1 Condiciones de estabulación y manipulación
 - 1.2 Modelos animales y mantenimiento de las colonias
 - 1.3 Genotipado
 - 1.4 Distribución y número de animales experimentales usados
2. Aislamiento y Trasplante de Precursores Neuronales GABAérgicos
 - 2.1 Disección de la MGE
 - 2.2 Disociación y resuspensión celular
 - 2.3 Recuento de viabilidad celular
 - 2.4 Inyección y trasplante intracerebral
 - 2.4.1 Micropipetas, carga de micropipetas y Microinyector
 - 2.4.2 Cirugía esterotáxica y microinyección
 - 2.4.3 Anestesia
 - 2.4.4 Trasplante en el cerebro adulto
 - 2.4.5 Trasplante en el cerebro neonatal
 - 2.4.6 Tratamiento post-operatorio
3. Pruebas de Comportamiento
 - 3.1. Campo Abierto (Open Field)
 - 3.2. Objeto Nuevo (Novel Object)
 - 3.3. Laberinto Elevado en Cruz (Elevated Plus Maze)
 - 3.4. Rotarod
 - 3.5. Grip strength
4. Electrofisiología
 - 4.1 Preparación de electrodos
 - 4.2 Cirugía de implante de electrodos
 - 4.3 Electroencefalogramas (EEGs)
 - 4.4 Análisis de registros
5. Técnicas Histológicas
 - 5.1 Preparación de Muestras
 - 5.2 Técnicas de inmunofluorescencia e Inmunohistoquímica
 - 5.3 Contajes celulares
6. Análisis de Imágenes de Microscopia: Image J
 - 6.1 Cuantificación de marcadores de poblaciones
 - 6.2 Análisis de Inmunoreactividad y densidad
 - 6.3 Análisis de la morfología celular: Análisis de Sholl

7. Criopreservación Celular

- 7.1 Aislamiento y criopreservación de células de la MGE
- 7.2 Descongelación de MGE criopreservada para su trasplante
- 7.3 Cultivo de MGE criopreservadas
- 7.4 Medio de cultivo primario de neuroesferas
- 7.5 Descongelación de MGE criopreservada para su trasplante

Resultados

- 1 Efectos de trasplante de precursores GABAérgicos derivados de la MGE en un Modelo animal de Síndrome de West.
 - 1.1 Evaluación de comportamiento en animales de modelo de West trasplantados con precursores neuronales derivados de la MGE
 - 1.2 Estudio de Electroencefalogramas en modelo del Síndrome de West trasplantado con precursores neuronales derivados de la MGE
 - 1.3 Análisis histopatológico del modelo síndrome de West después del trasplante
 - 1.4 Análisis de las células trasplantadas
- 2 Efectos de trasplantes Efectos de trasplante de precursores GABAérgicos derivados de la MGE en un Modelo animal con déficit en *Lhx6*.
 - 2.1 Evaluación del comportamiento en modelo hipomórfico para *Lhx6*
 - 2.2 Análisis histopatológicos de modelos con déficit en *Lhx6* después del Trasplante.
 - 2.3 Análisis de las células trasplantadas
- 3 Criopreservación de precursores GABAérgicos derivados de la MGE.
 - 3.1 Metodología, variables y grupos de criopreservación
 - 3.2 Rendimiento y viabilidad celular tras la criopreservación
 - 3.3 Evaluación *in vitro* de la funcionalidad y diferenciación celular post-congelación
 - 3.4 Trasplante de precursores neuronales derivados de la MGE y criopreservados.
 - 3.5 Evaluación histopatológica después del trasplante

Discusión

1. Trasplante de precursores GABAérgicos en modelos animales de EEI.

- 1.1 Supervivencia y migración de los precursores neuronales derivados de la MGE trasplantado
- 1.2 Diferenciación hacia interneuronas maduras
- 1.3 Estudio morfológico de las células trasplantadas
- 1.4 Efectos sobre el comportamiento
- 1.5 Efectos sobre la actividad electrofisiológica (EEG)

2. Desarrollo de Protocolo de criopreservación

- 2.1. Protocolo de Criopreservación
- 2.2 Trasplantes en ratones de Células procedentes de la MGE criopreservadas

3. Aplicabilidad clínica de los resultados

Conclusiones

Bibliografía

Abreviaturas

Ach: Acetilcolina

ACTH: hormona adenocorticotropa

ARX: Aristaless-related homeobox

CB: Calbindina

CGC (Caudal Ganglionic Eminence): Eminencia ganglionar caudal

CR: Calretinina

DCX: Doblecortina

DMSO: DiMetil-Sulfóxido

EEG: Electroencefalograma

EEl: Encefalopatías epilépticas infantiles

EE: Encefalopatías epilépticas

ESC (embryonic stem cell): Células Madres Embrionarias

FFT: Transformada de Fourier

GABA: Ácido gamma-aminobutírico

GAD67: Enzima Glutamato descarboxilasa

GE: Eminencia Ganglionar

HES: Hidroxi-etil-almidón

ILAE (International League Against Epilepsy) : Liga Internacional contra la epilepsia

IPSC (Inhibitory postsynaptic current) : Corrientes inhibitorias postsinápticas

LGE (Lateral ganglionic Eminence): Eminencia ganglionar lateral

MGE (Medial ganglionic Eminence): Eminencia ganglionar medial

NE: Neuroesferas

NLS: Motivos de localización nuclear

NpY: Neuropeptido Y

ORF (“Open Reading Frame”): Marco abierto de lectura

PCP: Clohidrato de feniclidina

PL: leucina

PR: arginina

PROH: Propanodiol

PTZ: Pentilentetrazol

PV: Parvalbumina

PVP: Polivinil pirrolidona

SHAM: Control Operado y No trasplantado

SSH: Sonic Hedgehog

SNC: Sistema Nervioso Central

SST: Somastotatina

SW: Síndrome de West

TAC (*transient amplifying cells*): células amplificadoras transitorias.

UTR (“3’ untranslated region”): Región no traducida

VGB: Vigabratina

YPR : Dominio tirosina-prolina-ácido aspártico

Introducción

1. Encefalopatías infantiles (EI)

La encefalopatía es una denominación general para varias enfermedades que causan alteraciones en la función cerebral y en el estado mental de la persona. Puede ser debida a enfermedades crónicas o neurodegenerativas, que cursan con alteraciones anatómicas graves y variadas, o bien por enfermedades tóxicas, anóxicas o vasomotoras, en las cuales no predomina el elemento inflamatorio. Existen muy diferentes tipos de encefalopatías, como son las encefalopatías alcohólicas, bilirrubinémica, bismútica, esponjiforme subaguda por virus, hepáticas, reaccional, hiperuricémica, mioclónica de la infancia y finalmente la encefalopatía epiléptica infantil (EEI).

En concreto, las Encefalopatías infantiles (EI) suelen estar asociadas, por lo general, a episodios de epilepsia, siendo los deterioros de las funciones congénitas, sensoriales y/o motoras resultados de la propia actividad epiléptica en la EI. La epilepsia infantil se estima que afecta aproximadamente a 10,5 millones de niños en todo el mundo, lo que representa una cuarta parte de la población total con epilepsia. Aproximadamente el 40% de ellas se producen durante los 3 primeros años de vida. Existe una gran variedad de síndromes infantiles que afecta de muy diversas forma, desde los más graves a los que desaparecen con el crecimiento. Otra de las características propias de las epilepsias infantiles es la capacidad de evolucionar y transformarse, produciéndose una alta resistencia a los fármacos.

1.1 Clasificación de las Encefalopatías Epilépticas Infantiles

Las epilepsias que se producen durante la infancia son muy variadas. La Liga Internacional contra la Epilepsia (*ILAE*; de sus siglas en Ingles) las clasifica de manera general en síndrome epiléptico idiopático (No asociadas con daños cerebrales, u otro signo neurológico que curse únicamente con crisis epilépticas. Presumiblemente con implicaciones genéticas y dependientes de la edad), Síndrome Epiléptico sintomático (Las crisis cursan por daños previos cerebrales), Síndrome Epiléptico Criptogenético (Ausencia de daños cerebrales previos, pero que probablemente sean sintomáticas y cuya etiología no ha sido aún identificada), y Encefalopatías Epilépticas (Condición en la cual la propia epilepsia contribuye a la perturbación de la función cerebral) [1]

Las encefalopatías epilépticas infantiles (EEIs) se encuadran en las llamadas epilepsias catastróficas. Los niños con EEIs suelen presentar problemas congénitos, sensoriales, y posibles problemas motores como resultado de la actividad epiléptica, tal como dijimos anteriormente, ya que las frecuentes convulsiones que se producen, o la actividad interictal paroxismal causa daños celulares, siendo además ciertas características de la EEIs dependiente de la edad de aparición de la encefalopatía.[2] [3](Tabla1).

Tabla 1: Etiología de las principales Encefalopatías epilépticas (Modificado de Depienne et al.)		
Encefalopatía Infantil Edad de remisión/Pronóstico:	Edad de Aparición	Etiología
Síndrome de Tourette No remisión/Adverso	<i>Recién Nacidos-Infancia</i>	<i>Daños Cerebrales:</i> Malformaciones; evento isquémico-anóxico perinatal <i>Enfermedades Metabólicas:</i> Convulsiones piridoxina o piridoxina-fosfato dependiente, Hiperglicemia con cetosis, Déficit de la Sulfato oxidasa, Mitocondriopatías. <i>Causas Genéticas:</i> Genes <i>ARX</i> (♂), <i>CGI</i> y <i>STXBP1</i>
Encefalopatías mioclónicas tempranas No remisión/ Adverso		
Migración parcial de las crisis No remisión/ Adverso		
Síndrome de West Variable/Variable	<i><1 año</i>	<i>Daños Cerebrales:</i> Adquiridos en periodo pre-, peri, o postnatal en el 60-90% de los casos; infarto vascular, Trauma craneal o infección.
Síndrome de Rett Variable/Variable	<i>2-4 años</i>	<i>Enfermedades metabólicas:</i> Mitocondriopatías, Déficit de PDH, Fenilcetonuria. <i>Causas Genéticas:</i>
Síndrome de Lennox-Gastaut No remisión/ Severo	<i>3-10 años</i>	Gen <i>ARX</i> (♂), <i>CDKL5</i> , Síndrome de Down (Trisomía 21); gen <i>STK9</i> (incidencia ♀>♂), Deleción 1p36, Inv-Dup Cromosoma 15. Gen de la proteína 2 de unión a metil-CpG(MeCpG)(♀)
Síndrome de Aicardi No remisión/ Adverso	<i>3-5 meses</i>	<i>Daños Cerebrales:</i> Ausencia parcial o completa del cuerpo calloso <i>Causas Genéticas:</i> Genes <i>TREX1</i> , <i>RNASEH2A/B/C</i> y <i>SAMHD1</i> (♀)
Síndrome de Landau-Kleffner 8-12 años de edad/Reservado	<i>3-6 años</i>	<i>Daños Cerebrales:</i> Infarto vascular (Porencefálico), Leucomalacia, Polimicrogiria, Displasia cortical
Síndrome de Dravet (Epilepsia mioclónica Severa) No remisión/ Severo	<i>Infancia</i>	<i>Causas Genéticas:</i> Genes <i>SCN1A</i> , <i>PCDH19</i> y <i>GABRG2</i>
Síndrome de Doose (Epilepsia mioclónica astática) Variable/variable	<i>1-5 años</i>	<i>Causas Genéticas:</i> Genes <i>SCN1A</i> y <i>GABRG2</i>
Encefalitis de Rasmussen No remisión/ Severo	<i>3-12 años</i>	Posibles mecanismos inmunes

La mayoría de estas EEIs, presentan algún familiar con epilepsia en su historial clínico o bien son debidos a la mutación en un único gen. Las mutaciones que se han observado en los diferentes síndromes son variadas, desde mutaciones producidas por errores de lecturas, mutaciones puntuales que conllevan una terminación prematura del condón, reordenamiento intragénicos, hasta amplificaciones de codones. Todas estas mutaciones suelen ser esporádicas autosómicas dominantes, cuando son mutaciones originadas de novo, y mutaciones autosómicas recesivas o ligadas al sexo (normalmente ligada al cromosoma X)

De las mutaciones autosómicas dominantes existen ejemplos tales como la mutación en el gen *STXBPI*, que codifica la proteína 1 de unión a syntaxina, que forma un complejo con la proteína SNARE-syntaxina1, las cuales median la fusión de la vesículas sinápticas. Este gen lo tienen afectados niños con el síndrome Tourette. [2, 4] Otro ejemplo es la mutación del gen *SPTANI* que codifica la proteína hemidimérica alpha-espectrina II involucrada en la proliferación celular y en la mielinización de los nervios motores. Este gen se ha descrito que puede estar relacionado con individuos que presentan el SW de comienzo temprano.

En cuanto a las mutaciones autosómicas recesivas un ejemplo de gen mutado es el *CG1/SLC25A22* (también llamado *SLC25A22*), que codifica para uno de los Transportadores de H⁺/Glutamato mitocondriales.

Una parte importante de mutaciones que producen EEIs son las recesivas ligadas al sexo, normalmente en el cromosoma X. En estos tipos de enfermedades existe una diferencia fenotípica ligada al sexo debido a la heredabilidad y/o silenciamiento del cromosoma X, dándose diferentes posibilidades: los varones suelen mostrar la afección mientras que las hembras son simples portadoras y no muestran la enfermedad. Mientras que en otras ocasiones, las mujeres pueden mostrar un amplio espectro de anomalía según se haya producido la inactivación del cromosoma X. Algunos ejemplos son:

- Mutaciones en el gen *SRPX2*, localizado en el cromosoma Xq, cuya proteína mutada es secretada con un exceso de glicosilación, produciendo las epilepsias rolándicas. *SRPX2* se cree que controla la migración de las neuronas hacia la corteza.

- Mutaciones en el gen *CDKL5/STK9*: Principalmente afecta a niñas, con retraso severo del desarrollo y comienzo temprano de las crisis. La mutación en el gen de la Ciclina dependiente de Kinasas 5 (*CDKL5*) o Kinasa serina-treonina 9 (*STK9*), localizado en el cromosoma Xp22.3, suele afectar al dominio catalítico de la proteína, por lo que la actividad enzimática de *CDKL5* es necesaria para un correcto desarrollo neurológico. Se asocia al Síndrome de Rett y SW.
- Mutaciones en el gen *SCN1A*: Codifica el canal de sodio dependiente de voltaje tipo I Na_v 1.1.[3] Mutaciones en este gen, ya sean *de novo* o mutaciones conocidas, producen el Síndrome de Dravet, también conocido como epilepsia mioclónica severa infantil.
- Mutaciones en el gen *PCDH19*: Codifica para la Protocadherina 19, una proteína transmembrana de 1148 aminoácidos pertenecientes a la superfamilia de las cadherinas de la subclase delta 2. La función de la proteína es desconocida. Alrededor de un 7 % de niños con síndrome de Dravet presentan mutaciones en el gen *PCDH1*, que afecta principalmente a niñas.
- Mutaciones en el gen *ARX*. Este es el primer gen descrito asociado a EEIs, principalmente en niños, ya que las niñas son solo portadoras. Ratones deficientes en *ARX* tiene una diferenciación y migración tangencial deficiente de las interneuronas GABAérgicas procedentes de la eminencia media, así como una diferenciación anormal testicular [5, 6]. Esta relacionado con los llamados espasmos infantiles o SW. Esta mutación la tratamos en el siguiente apartado en mayor profundidad, dado que es objetivo principal de la presente Tesis.

1.2 Encefalopatía catastrófica Infantil, Síndrome de West (SW),

El SW se encuadra entre los llamados espasmos infantiles, los cuales suelen producirse durante el primer año de vida. Estos espasmos son un tipo de EEI, dependiente de la edad y altamente asociados a deterioro cognitivo, autismo y problemas de movimientos. El nombre de SW es debido al físico inglés William James West, quien describió la enfermedad a través de la historia clínica de su hijo en 1841 [7]. Se caracteriza por la llamada triada sintomática: Espasmos infantiles, alteración del desarrollo psicomotor e hipsarritmias en los registros de electroencefalogramas (EEG).

A lo largo de los años las crisis generadas en el SW han sido denominadas como espasmos infantiles o espasmos epilépticos, cuyo patrón característico de EEG, la hipsarritmia, fue descrito en el año 1952 por el Dr. Gibbs. Esta se caracteriza por puntas y ondas lentas de una gran amplitud, desordenadas y que varían de un momento a otro tanto en duración como en localización. Los espasmos se caracterizan por una contracción brusca, generalmente bilateral y simétrica, acompañada por pérdidas de conciencia.

El pronóstico general de la enfermedad es considerado grave, con un 90 % de los casos asociado con retraso mental, problemas motores, conductas y rasgos autísticos y baja respuesta a medicación o alta farmacorresistencia.

1.1.1 Clasificación y epidemiología del SW

El síndrome de West puede ser dividido en dos tipos o formas: Criptogénico y Sintomático[8]

- Sintomático, se caracteriza por presentar signos de daños cerebrales previos o por algún otro problema etiológico conocido. Engloba otros síndromes donde se encuentran mutados una serie de genes como *LIS1* y *DobleCortina (DCX)*.
- Criptogénico, está caracterizado por la ausencia de daños previos en el cerebro. Existe dos genes espacialmente implicados que se han identificado y relacionado con dicho síndrome, así como con los espasmos infantiles ligado al cromosoma X; son *ARX* y *CDKL5* [6]

En general el SW presenta una prevalencia de 3,7 casos por cada 100.000 nacimientos [9]. Apareciendo en el 90% de los casos antes del primer año de vida, observándose la máxima distribución de casos entre el cuarto y el séptimo mes de vida, lo que coincide con el periodo crítico de formación de dendritas y de la mielinización.

1.1.2 Etiología del SW: genes implicados y epileptogénesis

El SW sintomático es el más frecuente, entre un 45,7 % a 67% de todos los casos según diferentes autores. Pueden coexistir factores que conlleven su aparición, los cuales van desde prenatales, como la displasia cortical, peri-natales, como las encefalopatías hipóxico-isquémicas y lesiones focales entre las 28 semanas de embarazo y los 7 días de nacimiento, hasta los postnatales, como meningitis, hemorragia intracraneal y encefalitis aguda, siendo estas últimas las causas menos probables. El pronóstico en todos estos casos de SW sintomático es poco favorable.

En el caso del SW criptogénico la proporción con la que se da varía entre el 9% y el 30% de todos los casos de SW, según diferentes autores. El SW criptogénico tiene un pronóstico algo más favorable que en los casos sintomáticos, existiendo dos genes estrechamente relacionados con ellos; *CDKL5* y *ARX*.

El gen *CDKL5* está localizado en el cromosoma Xp22.3, además de causar algunos de los llamados espasmos infantiles ligados a cromosoma X también está relacionado con una variante del síndrome de Rett. Se cree que existe cierta relación con *Mecp2*, gen relacionado con la maduración neuronal y la formación de los contactos sinápticos, estando su expresión solapada con *CDKL5* en el cerebro de ratón. Se ha observado que un 80% de los casos de síndrome de Rett también presentan mutaciones en *Mecp2*. Otros fenotipos asociados a la mutación en *CDKL5* son la discapacidad intelectual severa, movimientos de manos estereotipados y un desarrollo motor interrumpido.

El otro gen que está muy estrechamente relacionado con el SW y los espasmos infantiles es *ARX*, cuya heredabilidad se encuentra ligada al sexo, encuadrándose en las encefalopatías epilépticas recesivas ligadas al sexo, donde existe una diferencia fenotípica en las cuales solo los varones mostraran la enfermedad de manera más severa, y las hembras son simples portadoras o adquieren síntomas menos severos que en los varones. Se han descrito numerosos procesos del desarrollo en los cuales está implicado *ARX*, tales como la proliferación celular, regionalización, así como la diferenciación y migración neuronal, tanto radial como tangencial.

ARX es un gen relativamente pequeño de un tamaño aproximado de 12,5 kb, de la clase Homeobox similar a *Aristaless*, localizado en el cromosoma Xp22.13 en humano. Codifica para un factor de transcripción de unas 2,8 kb, que juega un importante papel en el desarrollo del prosencefalo, páncreas y testículos; además de haberse identificado diferentes isoformas en el músculo esquelético y en el corazón.

ARX consiste en una proteína de 562 aminoácidos codificada por 5 exones. Contienen 4 extensiones de polialanina codificadas por el exon 2, siendo las extensiones 2 y 4 puntos calientes de mutaciones (Hot Spots), las cuales causan retardo mental y epilepsia, afectando principalmente a varones. Se han descrito en *ARX* diferentes tipos de regiones características como son las regiones no traducidas o 3'-UTR (del inglés "3' untranslated region") que explicarían las existencias de las distintas isoformas encontradas, además de encontrarse regiones de marco abierto de lectura o ORF (del inglés "Open Reading Frame") de aproximadamente 1686pb con un inusual alto contenido en GC (72,5%). Por otro lado, en la proteína *ARX* se han descrito unos dominios funcionales muy importantes, como son: el homeodominio pareado Q10 (aa 328-387), el *Aristaless* (aa 527- 542), el ultraconservado octapeptídico (aa 27-34), el ácido (aa 224-255), 4 expansiones de polialanina (Ala1, aa 100-115; Ala2, aa 144-155; Ala3, aa 275-281; y Ala4, aa 432-440), y tres motivos de localización nuclear o NLS (del inglés "nuclear localizations sequence").

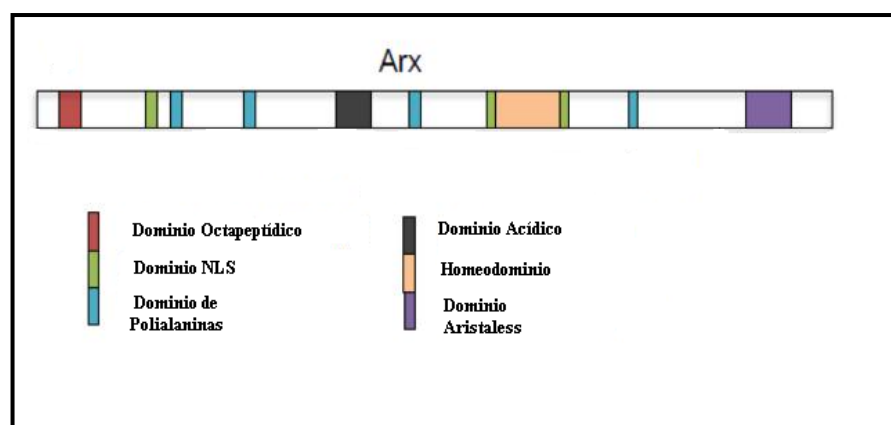


Figura 1: Diagrama esquemático de la estructura y los dominios del gen *ARX*. (Modificado de Chao et al. *Neurogenetics* (2012) 13:23-29)

El dominio homeobox de *ARX* es un sitio de unión a ADN, cuya especificidad se cree que está determinada por la secuencia de aminoácidos adyacente a él [10]. Mutaciones en dicho dominio producen una pérdida de su capacidad de unión a ADN. Se considera como un dominio represor. Por el contrario, el dominio *Aristaless* se cree que actúa como activador, con una clara importancia en el normal desarrollo del prosencéfalo. El dominio octopeptídico se encuentra localizado en la zona N-terminal de la proteína *ARX* y es también considerado un dominio con una función represora, y que al igual que ocurre con *Aristaless*, su mutación afecta a la regulación transcripcional mediada por *ARX*. Por último, expansiones de polialanina en *ARX* se cree que juegan un papel fundamental en la regulación de la transcripción.

Se han encontrado diferentes tipos de mutaciones que afectan al gen *ARX*, tales como errores de plegamiento, mutaciones sin sentido, mutaciones de cambio de sentido, deleciones, inserciones y duplicaciones [11]. La gran mayoría de las mutaciones se encuentran localizadas en el exon 2, como es el caso de muchas de las duplicaciones e inserciones que se producen en el gen *ARX*. Se han identificado diferentes mutaciones que afectan directamente a las distintas expansiones de polialanina, que también afectan al exon 2 en la región de $(GCG)_{10}$, siendo estas las mutaciones que muestran una mayor prevalencia (46 % de los casos descritos hasta la fecha). Se han encontrado distintos tipos de inserción, tales como $(GCG)_7, (GCG)_3, (GCG)_2$ y $(GCG)_1$. Estas extensiones de Polialanina producen agregados intracelulares, encontrándose en el citoplasma en el caso de las inserciones, mientras que cuando se dan duplicaciones extras los agregados se suelen producir en el núcleo.

De este modo, según el tipo de mutación que se produce en el gen *ARX* se originan distintos tipos de síndromes, como la hidrocefalia con genitales anormales debido a deleciones en el gen *ARX*; Lisencefalia ligada al sexo con genitales ambiguos donde se produce errores en el ensamblaje del ARNm, mutaciones de pérdida de sentido y sin sentido, deleciones, etc.; Síndrome de Proud o angeogénesis del cuerpo calloso con genitales anormales y retraso mental, producido por mutaciones de pérdida de sentido; Síndrome de Partington, por duplicaciones de 24pb en el gen *ARX* que conllevan retraso mental y movimientos distónicos de las manos; Epilepsias mioclónicas, por mutaciones sin sentido; Síndrome de Otahara, cuya mutación se produce por una expansión de 27 polialaninas en el exon 2 y también producida por proteínas truncadas [8, 12], y SW o

espasmos infantiles ligados al cromosoma X, donde se producen inserciones de polialaninas o duplicaciones que afectan al exon 2 .

El gen *ARX* se agrupa en la familia de genes que se encuentran involucrados en la regulación de procesos esenciales que tienen lugar durante la embriogénesis en vertebrados, incluyendo el desarrollo del sistema nervioso central y periférico. Se ha demostrado su implicación en la regulación del ciclo celular de los progenitores neurales, de la migración radial y tangencial, así como en la diferenciación celular, siendo la regulación de la migración tangencial una de las funciones más importantes desempeñadas por *ARX*.

ARX se expresa en los progenitores GABAérgicos del subpalio. La actividad de *Arx* se ha demostrado estar estrechamente relacionada al factor de transcripción *Dlx* el cual juega un papel crítico en la regulación de la diferenciación y migración de las neuronas GABAérgicas, de modo que *Arx* es un diana de *Dlx* contribuyendo a una correcta migración de dichos progenitores neuronales desde el subpalio hasta la corteza. Por lo que mutaciones que afectan a *Arx* producen deficiencias en estos progenitores tanto en diferenciación como en migración y localización a lo largo de la corteza. [13-15]. Este déficit en la migración, sobre todo en la migración tangencial, está íntimamente relacionado con los mecanismos regulatorios que se producen con otros factores de transcripción, como son *Nkx 2.1, Dlx1, Dlx2* y *Lhx6*. Además, se ha sugerido que *Arx* está implicado en la especificación de al menos un subtipo de interneuronas GABAérgica como son las positivas para Neuropéptido Y (NpY) , ya sea solo o en combinación con otros factores de transcripción como *Dlx*, llegándose a expresar incluso en adultos y conservado funciones de especificación en neuronas maduras.[5, 15-17].

1.3 Modelos animales de Encefalopatías Infantiles

1.3.1 Modelos Animales del SW: Líneas mutantes para *Arx*

Desde que se describió el gen *ARX* y su relación con el síndrome de West, numerosos modelos animales se han ido desarrollando en diferentes laboratorios, de forma que recapitulasen las principales características de la enfermedad.

Los primeros modelos se generaron por inactivación de *Arx*. El primer modelo de la enfermedad se desarrolló en el laboratorio de Kitamura [5], en donde se suprimió la expresión de *Arx* mediante la disrupción del exon 2, por medio de una inserción del gen

LacZ, produciendo un alelo mutado de *Arx* que produce una proteína truncada. Estos mutantes nacen prematuramente a 19.5 días de gestación y mueren dentro de las 12 horas del nacimiento. Los animales mutantes tienen características morfológicas muy marcadas, como son cerebro, bulbos olfatorios y testículos más pequeños, así como una hipoplasia en las vesículas seminales y deficiencias en las comisuras del hipocampo. Durante el desarrollo cerebral se observa una migración y diferenciación aberrantes de las interneuronas GABAérgicas de la eminencia ganglionar y la corteza. Características que recapitulan, en gran parte, las características clínicas que se observan en humanos con esta enfermedad.

El siguiente modelo donde se produce la pérdida de expresión de *Arx* fue desarrollado por Collobat en 2003 [18]. En este modelo se produce una pérdida de función del gen *Arx* mediante eliminación de los dos primeros exones del extremo N-terminal que codifican para el dominio octopéptido y para la α -hélice 1 y la mitad de la α -hélice 2 del homeobox. Inicialmente, este modelo se desarrolló para el estudio del desarrollo pancreático, aunque posteriormente fue utilizado por Broccoli et al. [17] como modelo de Lisencefalia asociada al cromosoma X, en donde se producen problemas de migración neuronal y diferenciación desde el telencefalo basal y ventral.

Otro modelo de *Arx* fue desarrollado en el laboratorio de Jeffrey Golden. Se trata de un modelo condicionado knockout [19]. Se obtuvo por una delección condicionada de *Arx* en las células procedente de la eminencia media ganglionar en ratón. Para ello, se utilizó hembras con el gen *Arx* floxeado que se cruzaron con machos DIX5/6^{CIG (cre-IRES-GFP)} de forma que se obtuvieron animales knockout de *Arx* (*ARX*^{-Y}), junto con hembras heterocigotas con una única copia funcional, y animales controles. Este modelo recapitula características de los fenotipos que se producen en humanos en ambos sexos, como por ejemplo la pérdida específica de interneuronas, y que los ratones machos con la mutación desarrollan epilepsia, mientras que las hembras con pérdida heterocigota de *Arx* sólo las mitad de ellas aproximadamente la desarrollan, debido seguramente al proceso aleatorio de inactivación cromosómica en el cerebro.

Posteriormente se han ido generando modelos donde no se produce delección del gen *Arx* o una supresión de su expresión, sino que se trata de inserciones o expansiones en el dominio de polialaninas, las cuales afectan al nivel de expresión y la función de *ARX*.

El primer modelo de este tipo se desarrolló en el laboratorio del Dr. Noebels [20], que generó una inserción en la primera expansión de polialaninas, incrementando el tamaño de la repetición de 16 aminoácidos a 23 aminoácidos. En este modelo los autores describen cómo se producen diferentes tipos de espasmos a lo largo de la vida de los animales, desde espasmos mioclónicos a episodios epilépticos tónico-clónicos en una edad más adulta. Además, estos animales presentan ansiedad, problemas de aprendizaje y de interacción social. A nivel del sistema nervioso presentan una reducción de la población de interneuronas que expresan *ARX*, disminuyendo alrededor de un 50% en el hilus del hipocampo y el estriado, y hasta un 68% en la corteza. Esta reducción es selectiva en aquellas interneuronas que expresan Calbindina (CB) observándose una reducción en todas las capas de la corteza, en el hipocampo y el estriado, así como una reducción de Interneuronas que expresan NpY en el estriado. Mientras que no se observó una reducción en la densidad de interneuronas positivas para Parvalbumina (PV) y Calretinina (CR), ni tampoco cambios en su localización. Por otra parte, a nivel celular se produce una alteración de la localización de la proteína desde el núcleo al citoplasma. Este modelo presenta unas características muy similares a las descritas en el modelo del Dr. Golden [19, 21].

Por último, el laboratorio del Dr. Kitamura [22] desarrollo otros tres modelos con mutaciones en el gen *Arx* que causan lisencefalia, SW y retraso mental, provocando unos fenotipos pleiotrópicos en los ratones. Los dos primeros modelos son mutaciones en el homeodominio de *ARX*. En concreto, se producen sustituyendo la prolina (residuo 355 en ratón y 353 en humanos) del dominio YPR (tirosina-prolina-ácido aspártico) por leucina (PL) en un primer modelo, o arginina (PR) en el segundo .

La tercera línea generada por Kitamura et al. Se produce por una repetición de 7 alaninas en la primera expansión de polialaninas (*Arx* CGC7), de forma similar al modelo del grupo de Noebels. Solo dos de las tres líneas son viables a más de 3 meses, ya que el modelo donde se inserta una arginina por la prolina muere un día después del nacimiento. En el caso de las dos líneas viables desarrolladas por Kitamura (PL y GCG7) ambas presentan características comunes. En ambos casos se produce una reducción de los transcritos, así como de la proteína *ARX*. En cuanto al comportamiento, ambos modelo muestran un aumento de la ansiedad, hiperactividad, y una coordinación motora alterada. También se ha descrito que en ambas líneas se producen episodios epilépticos, siendo mas frecuente en la línea con la expansión de 7 alaninas. Además, se produce en el

estriado una reducción de interneuronas GABAérgicas que expresan somastotatina,(SST) NpY y PV, llegando hasta de un 50% en el caso de las SST y algo menos acusado en PV. Así mismo, se producen una ligera reducción de interneuronas GABAérgicas en la corteza y amígdala basolateral.

Gracias a estos modelos se ha conseguido un mayor conocimiento de cómo se desarrolla la enfermedad y las posibles dianas terapéuticas para su tratamiento. En la presente Tesis Doctoral hemos usado el modelo portador de la expansión de 7 alaninas desarrollado por el laboratorio de Kitamura cuyas defectos principales, como hemos mencionado anteriormente, recapitulan las características fenotípicas más importantes que se producen en el SW en humanos:

- Desarrollo de neuronas GABAérgicas y Colinérgicas anómalo, produciéndose fallos en la migración de los progenitores GABAérgicos, lo que supone que solo el $84,4 \% \pm 11,4\%$ de estos alcanzan la zona cortical a día P0.
- Pérdidas de Interneuronas GABAérgicas en el estriado, sugiriendo una inhibición de la migración radial y tangencial desde la Eminencia ganglionar media (MGE) y lateral (LGE) de los progenitores GABAérgicos
- Una ligera reducción de PV en la corteza de en torno al 10%, y de un 30% en el estriado.
- El número de SST y NpY en el estriado se ve drásticamente disminuido, con una reducción de aproximadamente el 50% en ambos casos, mientras que no hay disminución en la corteza.
- Una actividad anormal en el patrón de los EEGs, asemejándose a la hipsarritmias que se producen en humanos.
- Un comportamiento anómalo, con aumento de la actividad motora (hiperactividad), ansiedad y problemas de aprendizaje.

1.3.2 Otros modelos de Encefalopatías Infantiles: Líneas transgénicas Hipomórficas para *Lhx6*

Estos modelos se pueden encuadrar dentro de las epilepsias, tanto adultas como infantiles, en las cuales no existe un genotipo conocido, del tipo de síndrome epiléptico idiopático. Encajan en aquellas encefalopatías que cursan con crisis epilépticas debidas a la existencia de problemas en las redes corticales de interneuronas GABAérgicas o

alteraciones en la migración de los precursores GABAérgicos hacia la corteza e hipocampo [23]. En la migración de estos precursores están implicados una serie de factores de transcripción que funcionan en forma de cascada, como son *Nkx2.1* y *Lhx6*. Estos componentes se han mostrado críticos para el desarrollo de interneuronas corticales derivadas de la MGE, produciéndose en los últimos años el desarrollo de dos modelos en ratón que desarrollan epilepsia y que tiene afectado el homeodominio LIM del gen *Lhx6* [24, 25].

El homeodominio LIM [26] está presente en la familia de genes *Lhx* que codifican factores de transcripción críticos en la regulación de la especificidad y diferenciación celular durante el desarrollo. Se ha demostrado cómo el gen *Lhx6*, junto con *Lhx7* (o *Lhx8*), regula la generación de neuronas GABAérgicas y colinérgicas en la MGE, uniformando parte de la compleja regulación entre los diferentes factores de transcripción que controlan la migración y diferenciación de los progenitores neuronales. *Lhx6* y *Lhx7* se cree que previenen la expresión de *Nkx2.1*, el cual juega un papel central en el mantenimiento de la identidad de la MGE. [27](Figura 2). Por otra parte, *Lhx6* y *Lhx8* inducen la expresión de Sonic Hedgehog (SSH), que controla la generación de los progenitores de interneuronas. De esta forma, una continua actividad de *Lhx6* en las neuronas que se dirigen hacia el estriado provoca que maduren hacia los diferentes subtipos de interneuronas GABAérgicas, mientras que la combinación de la actividades de *Lhx7* y *Isl1* (otro factor de transcripción del homeodominio LIM) provoca una diferenciación hacia neuronas colinérgicas maduras en el estriado [27].

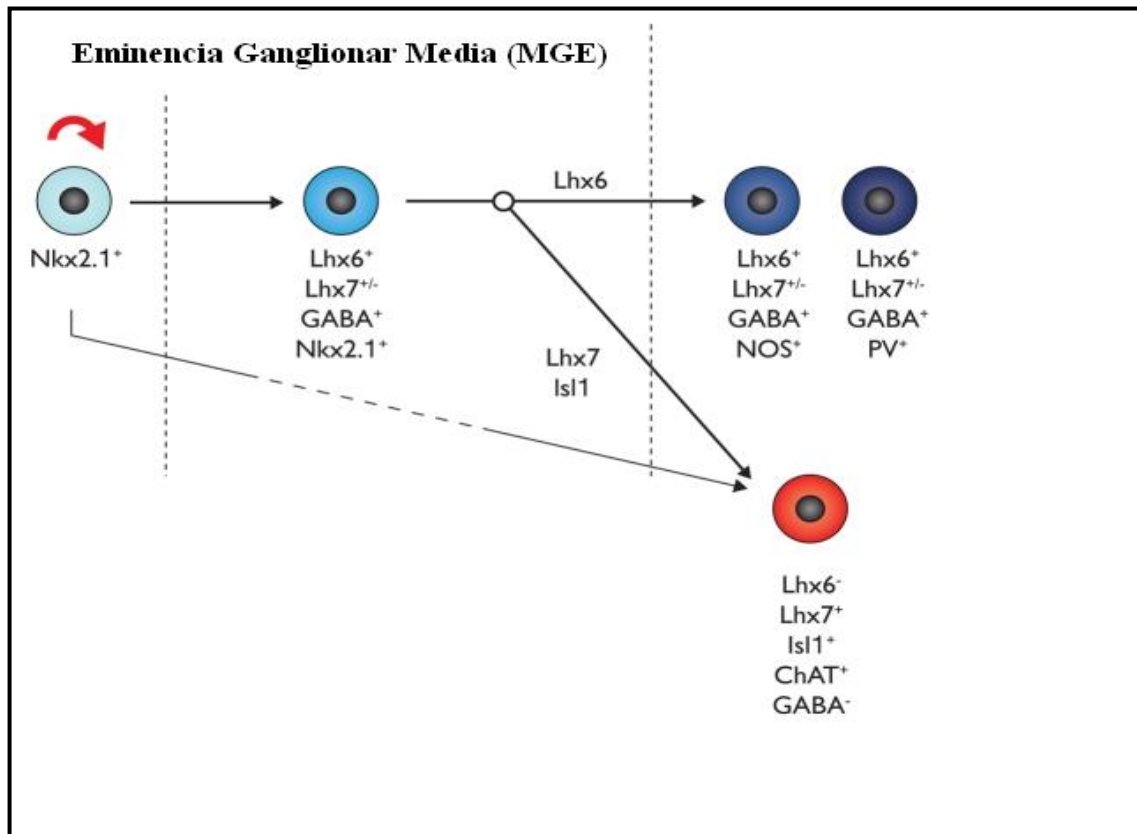


Figura 2: Esquema de generación interneuronas GABAérgicas y Colinérgicas desde la Eminencia Ganglionar Media (MEG). (Modificado desde Fragkouli A et al. *Development* 2009;136:3841-3851)

Por otro lado, se ha comprobado como *Lhx6* también es necesario para que se produzca una correcta migración y especificidad de los diferentes subtipos de interneuronas corticales [24], además de ser requerido para una correcta integración funcional de las interneuronas corticales dentro del circuito neuronal de la corteza cerebral [25]. Por último, también se ha implicado a *Lhx6* y *Lhx7* en el correcto desarrollo craneoencefálico y dentición en los mamíferos.

Como se ha dicho anteriormente, se han desarrollado modelos en ratón relacionados con *Lhx6*. Estos modelos presentan déficit en algunos de los subtipos de interneuronas GABAérgicas y desarrollan crisis epilépticas; por lo que nos son útiles como posibles modelos de encefalopatías que cursan con epilepsia y de las que no se conoce el genotipo o el motivo genético. Por otro lado, también se ha reportado que *Lhx6* puede ser un gen implicado en el origen del síndrome de Tourette, que suele aparecer al inicio de la infancia y es considerado como una enfermedad neuropsíquica caracterizada por

problemas motores y con desordenes obsesivos compulsivos, así como hiperactividad y déficit de atención. [4]

El primer modelo que se desarrolló fue un ratón knock-out para *Lhx6*. [24]. En este modelo se produce una distribución anormal en corteza e hipocampo de interneuronas GABAérgicas, si bien su número, cuantificado por la expresión de GAD67, es similar. Sin embargo, se produce una drástica reducción de ciertas subpoblaciones de interneuronas, en concreto de aquellas que expresan PV y SST [24, 28]. Además, se produce un retraso en la migración tangencial y una distribución anormal en las láminas corticales de los progenitores neuronales procedentes de la MGE. También parecen tener afectados la expresión de ciertos genes como *Cxcr4*, *Cxcr7* y *ErbB4*, y los factores de transcripción como *Arx*, *Cux2* y *Mafb*, que controlan el posicionamiento y la migración de las interneuronas desde la MGE hasta la corteza y el hipocampo. Con este modelo se demostró cómo la actividad de *Lhx6* es necesaria para una correcta migración y especificación de los diferentes subtipos corticales. En estos animales no se observó actividad epiléptica debido a que su fallecimiento se produce a una edad muy temprana, en torno a las cuatro semanas de desde el nacimiento, pero los autores creen que es muy probable el desarrollo de crisis epilépticas si los animales sobrevivieran durante un mayor tiempo.

En cuanto al segundo modelo denominado *Lhx6*-hipomórfico, en el que la expresión de *Lhx6* está reducida [25], se ha demostrado un déficit selectivo en la diferenciación en ciertos subtipos de interneuronas, especialmente una reducción muy significativa en las interneuronas que expresan SST. Se ha descrito una alteración de la inhibición dendrítica que conlleva el desarrollo de crisis epilépticas espontáneas, siendo una demostración directa de que la ausencia de la actividad de *Lhx6* provoca el desarrollo de crisis tónico-clónicas en los animales donde se produce un déficit de interneuronas corticales derivadas de la MGE [25]. Estos datos se correlacionan con análisis electrofisiológicos en donde se observan cambios característicos en frecuencia y cinética de las mIPSCs en las dendritas de las células granulares del giro dentado del hipocampo. Lo que sugiere cambios en las propiedades presinápticas y postsinápticas de los compartimentos inhibitorios de la sinapsis.

Este modelo proporciona información de los mecanismos moleculares y fisiológicos de la diferenciación de las interneuronas así como de la epileptogénesis, sirviendo como un nuevo modelo animal de epileptogénesis temprana. Además nos sirve para ensayar

nuevas terapias contra la epilepsia, cuyo posible éxito en este modelo animal nos dará una idea de cómo se podría interpolar a otras IIE, las cuales no se conocen su causa genética. Estos resultados nos servirán de base para en un futuro llevar a cabo su aplicación en humanos, teniendo en cuenta que una estrategia terapéutica exitosa en animales necesita un tiempo de maduración y posteriores ensayos clínicos para verificar su eficacia en humanos.

1.4 Tratamiento para las EEI y el SW

El tratamiento de personas con EEI y SW se ha basado tradicionalmente en fármacos, cuya eficacia a lo largo del tiempo disminuye, presentan farmacorresistencias y pueden presentar efectos secundarios severos. También se ha recurrido a la cirugía de resección o funcional cuando los tratamientos con fármacos no se han mostrado eficaces.

Las drogas más eficaces y de elección para paliar el SW son habitualmente la Vigabatrina (VGB) y el tratamiento hormonal con la hormona adenocorticotropa (ACTH)

ACTH fue el primer tratamiento en mostrarse eficaz con dosis muy variables [29]. Sin embargo, se han descrito efectos secundarios nocivos y de toxicidad, tales como infecciones reiteradas debido a la supresión de la respuesta inmune, hipertensión arterial, cardiomiopatía hipertrófica, insuficiencias renales, que incluso pueden llegar a una mortalidad del 5% asociable al tratamiento con este fármaco. Además, el mecanismo por el que media su acción es desconocido.

VGB es un inhibidor irreversible de la enzima GABA transaminasa, responsable de degradar el GABA en el cerebro [30]. Es un fármaco similar en eficacia a la ACTH, pero con una aparente toxicidad menor a largo plazo. Aun así, se ha descrito en numerosos estudios que su uso provoca daños en la visión. En concreto defectos en el campo visual por acumulación de GABA en células horizontales y amacrinas de la retina, lo que provoca cambios en los transportadores locales de iones.

En cuanto a las EEI se han usado otros fármacos para tratar de frenar las crisis, tales como el **ácido valproico**, que aunque se ha mostrado eficaz en el control de las convulsiones, no se puede administrar a pacientes con ciertos problemas que suelen ser inherentes a estas enfermedades, como los problemas en el metabolismo de los aminoácidos y ácidos grasos o disfunciones hepáticas ; **Prednisona**, la cual se muestra eficaz contra las convulsiones pero tiene efectos secundarios muy frecuentes, como el

aumento de la tensión arterial, azúcar elevado y potasio en sangre disminuido; **Buccolam**, uno de los últimos medicamento que se han aprobado su comercialización, cuyo principio activo es el midazolam [31], y que se utiliza para frenar las crisis convulsivas agudas y prolongadas de los niños y adolescentes (desde los 3 meses a los 18 años), pero que tiene también efectos secundarios adversos que hay que tener en cuenta.

El segundo modo de tratamiento que existe en la actualidad es el quirúrgico, que se ha comprobado que es eficaz en el control de las convulsiones, pero que no frenan otras características de la enfermedad y presenta un alto riesgo para la vida durante la operación, junto con sus efectos traumáticos posteriores de posible pérdida en ciertas funciones cognitivas.

Por consiguiente, aunque tanto en el tratamiento con fármacos como con el tratamiento quirúrgicos hay datos de su eficacia parcial en el control de la crisis, hay que tener en cuenta que parece no existir una gran influencia en la mejora psicomotora de los niños. Además, recordar que existe una fuerte farmacoresistencia en estos pacientes, como en el caso de la VGB con la que se produce una remisión del 83 % de los casos criptogénicos, pero tan sólo un 52 % de los sintomáticos, o en el tratamiento con ACTH donde se presentaron efectos adversos en relación con la terapia hormonal en el 34,6 % de los pacientes como son neumonías, infecciones de tracto urinario, hipertensión arterial y trastornos de la frecuencia cardíaca.[32]. Por último, hay que tener en cuenta la plasticidad cerebral que tienen los niños, que hace que sea necesario evitar los efectos tóxicos del uso de medicación y la influencia de estas drogas sobre ella. De modo que se hace necesario buscar alternativas que sean capaces de controlar las crisis y mejorar aspectos psicomotores de los niños afectados con la enfermedad sin efectos no deseados secundarios. Una alternativa ideal sería el uso de la terapia celular para este tipo de enfermedades, en las que se hace necesario un control eficaz de la crisis, a través del control de la actividad cerebral, consiguiendo incluso revertir o aplacar los comportamientos anómalos que se producen en una persona con SW o alguna EEI. Hasta la fecha se ha realizado terapia celular en diversos modelos animales de epilepsias, consiguiéndose resultados muy positivo y esperanzadores [33-36], lo que nos hace pensar que la terapia celular se puede convertir en una alternativa real al uso de fármacos o de la cirugía resectiva-funcional evitando los problemas subyacente que derivan de su uso.

2. Posibles Terapias Celular en Encefalopatías Infantiles

2.1 Medicina Regenerativa y Células Madres

La medicina regenerativa es un área del conocimiento relativamente nueva. Clásicamente el término “Regeneración” se ha usado para definir el proceso por el cual se reemplazan tejidos o células dañadas por otros sanos, de forma directa o indirectamente mediante proliferación de estas. Este proceso está presente naturalmente en algunos tejidos, como la epidermis o mucosa intestinal. Sin embargo, existen otros tejidos o células que no tienen dichas propiedades. En este punto es donde entra la medicina regenerativa, cuyo principio es la regeneración de un tejido mediante la provisión de células capaces de diferenciarse hacia aquellas células especializadas que se necesitan por medio, mayormente, de las células madres o troncales.

La célula madre (CM) se puede definir como una célula inmadura que es capaz de dividirse, tanto simétricamente como asimétricamente, de forma que una de las células hijas mantiene sus propiedades progenitoras. Una segunda característica fundamental de las CM es que pueden diferenciarse hacia diferentes tipos de células especializadas de un organismo maduro, en condiciones apropiadas y con los estímulos correctos. Es lo que se conoce como la potencialidad de las CM, que dependerá tanto del estadio de desarrollo en que se encuentre como de la zona del organismo donde resida [37]. Las CM se pueden clasificar según su potencialidad, que es una clasificación puramente funcional y no morfológica:

- Totipotente: Es capaz de generar todas las células del embrión y del tejido extraembrionario. Solo los cigotos poseen este potencial
- Pluripotente: Es capaz de generar todos los tipos celulares que forman parte del embrión, son las llamadas CM embrionarias.
- Multipotentes: Solo son capaces de generar los tipos celulares del tejido del cual provienen. Son las CM adultas.
- Unipotentes o progenitores simples: solo son capaces de generar un solo tipo celular.

Las CM existen en todas las etapas del desarrollo de un organismo, desde el cigoto hasta la muerte de un organismo adulto, siendo en el primero donde se encuentran las CM totipotentes, a partir de las cuales se desarrollan todos los tipos celulares que formarán el

nuevo organismo. Las CM se dividen, migran y diferencian durante el desarrollo para formar los diferentes tipos celulares especializados que formaran parte de los distintos tejidos y órganos del nuevo organismo [38, 39].

Las CM se pueden aislar y cultivarse *in vitro*, y dependiendo del origen de donde la obtengamos podemos obtener CM con diferentes propiedades. En la actualidad se están utilizando en investigación y la clínica como herramienta terapéutica contra diversas enfermedades intratables, incluidas aquellas del sistema nervioso, debido a sus propiedades biológicas y claro potencial. Dependiendo del origen durante el desarrollo existen varios tipos de CM con posible aplicabilidad terapéutica:

- Células Madre Embrionarias.

Las células madre embrionarias (ESC, del inglés Embryonic Stem Cell), aisladas de la masa celular interna de un embrión pre-implantacional en el estadio de blastocisto. Son células pluripotentes que generan cualquier tipo celular incluido células germinales, excepto las placentarias.

En 1981 las ESCs de ratón fueron aisladas y cultivadas por primera vez [40, 41]. Estas células han mostrado tener una gran capacidad de proliferación y autorrenovación *in vitro*, pudiéndose cultivar indefinidamente sobre una capa de células de soporte, normalmente fibroblastos, conocida como feeder; o en flotación en forma de cuerpos embrioides. Han mostrado un gran potencial, diferenciándose hacia todos los fenotipos posibles [37, 42]. Sin embargo, debemos tener cautela con estas células, ya que puede existir rechazo inmunológico y llegar a formarse teratomas a partir de ellas, si son usadas en su estado proliferativo al realizar el trasplante. [43, 44].

- Células Madre Embrionarias Germinales.

Las células madre embrionarias germinales (EGC, del inglés Embryonic Germ Cell) provienen de un embrión en un estado de desarrollo más avanzado, aislándose de los precursores germinales extraídos de los primordios de las gónadas, aunque también se ha llegado a extraer EGCs de las gónadas de un ratón recién nacido [45]. Son las células que en adultos dan lugar a los gametos, las cuales pueden generar cualquier tipo celular, excepto extraembrionarias, debido a su pluripotencialidad. Tienen una gran capacidad proliferativa y diferenciadora, pero a diferencia de las ESCs no suelen desarrollar teratomas cuando se implanta en ratones inmunodeprimidos. [46].

- Células Madre Fetales; Precursores neuronales:

Las CM pueden aislarse de organismos fetales en desarrollo, pero su capacidad de expansión y diferenciación están ya más reducidas. Son células multipotentes que pueden generar solo los tipos celulares propios del órgano o tejido al que pertenecen. Estas células son las que generan los llamados precursores o progenitores celulares. Estos pueden dividirse, pero no ilimitadamente, y suelen diferenciarse a unos pocos tipos celulares especializados [38].

Si nos limitamos al cerebro, estas células multipotentes son las denominadas células madre neuronales (NSC, del inglés Neural Stem Cell). Las NSC se pueden obtener de cerebro en desarrollo, pero también en adulto, pudiéndose expandir en cultivo en lo que se conoce como neuroesferas, un agregado celular esférico en flotación. Las NSC pueden diferenciarse hacia los tres subtipos de células del linaje neural: Neuronas, Astroцитos y Oligodendrocitos.[38, 39]. Siendo a partir de las NSC desde las que se generan los progenitores neuronales, cuyo potencial está dirigido hacia un tipo único y especializado de célula neuronal. Por lo tanto, estos precursores son la herramienta terapéutica ideal para el tratamiento de enfermedades del Sistema Nervioso Central (SNC). Precisamente, los progenitores neuronales especializados que dan lugar a interneuronas van a ser objeto de estudio en la presente Tesis. Estos precursores GABAérgicos han demostrado su eficacia en el tratamiento de trastornos relacionados con la epilepsia en modelos animales[33]. Por ello les vamos a dedicar más adelante un capítulo de esta introducción dando más detalles.

- Células Madre del Adulto.

Las células madre adultas son células indiferenciadas de órganos o sistemas completamente desarrollados en el estadio adulto. Son multipotentes o unipotentes, y están encargadas de la imprescindible auto-renovación y mantenimiento de la homeostasis celular. En el caso del cerebro, se han detectado tres nichos en donde se encuentran las CM adultas y se produce la neurogénesis [47]. La primera es la capa subgranular (SGZ, del inglés Subgranular zone) del Giro dentado (GD), la segunda es la zona subventricular (SVZ, del inglés Subventricular zone) y la tercera los bulbos olfatorios adultos [48-50]. En los últimos años se han empleado células procedentes de estas regiones en ensayos de terapia celular para diversas neuropatologías [36, 51-57].

- Células Madre Pluripotentes Inducidas

Por último, recientemente se han desarrollado las denominadas Células Madre Pluripotentes Inducidas o iPSC (del inglés induce Pluripotent Stem Cells), que son el

resultado de la reprogramación de células somáticas hasta un estadio cuasi-embionario por medio de la expresión de 4 factores de transcripción (OCT2, SOX2, KLF4 y MYC-C). El grupo del Dr. Yamanaka fue el primero en describir la metodología para la obtención de iPSC a partir de fibroblasto murinos [58].

Actualmente la metodología se ha ido normalizando y es posible generar iPSC desde fibroblastos humanos para su aplicación en terapia celular y como modelado de enfermedades. Esto ha supuesto una revolución en biomedicina, ya que se podría obtener desde el mismo paciente fibroblastos y generar a partir de las iPSC cualquier tipo celular, permitiéndonos evitar el rechazo inmunológico así como problemas éticos.

2.2 Terapia Celular y epilepsia.

La terapia celular es el conjunto de estrategias que emplean células vivas como agente terapéutico y cuyo objetivo principal es reparar, reemplazar o recuperar la función biológica de un tejido u órgano dañado. Se basa en la utilización principalmente de las CM, que como hemos señalado son capaces de autorrenovarse y diferenciarse hacia células somáticas especializadas. Estas propiedades hacen de ellas la herramienta primordial en la medicina regenerativa y la bioingeniería de tejidos.

En los últimos años, la terapia celular surge como una posible alternativa terapéutica para no solo paliar, sino curar, diversas enfermedades que afectan al sistema nervioso [59-61]. En este caso, la terapia celular permite reemplazar las neuronas que degeneran progresivamente o bien reparar los circuitos neuronales dañados. Cualquier estrategia terapéutica de reemplazo en medicina regenerativa debe cumplir idealmente una serie de requisitos: Disponer de una fuente adecuada de células; Supervivencia a largo plazo de las células trasplantadas; Distribución apropiada de las mismas, abarcando las zonas afectadas por la enfermedad; Diferenciación hacia los tipos celulares que se desea reemplazar; Integración en la estructura tisular propia de cada órgano, que en el caso del cerebro conlleva la formación de nuevos circuitos neuronales y su interacción con los ya existentes; Plena funcionalidad y actividad de las células implantadas; Y por último, se debe contar con las máximas medidas de seguridad para evitar posibles rechazos inmunológicos o la generación de tumores.

En las últimas décadas se han realizado algunos intentos de terapia celular para la epilepsia usando distintos tipos celulares con resultados dispares[62-65]. Se han implantado en diversos modelos animales tanto CM embrionarias[64], como precursores neuronales fetales. Estos últimos procedentes de regiones como el hipocampo[65, 66] y estriado[67, 68], siendo además en algunos casos manipulados genéticamente para su inmortalización y/o sobre-expresión de GABA[69, 70]. Si bien algunos de estos trasplantes han logrado mejoras parciales en los modelos animales, sobre todo los de precursores procedentes del estriado[67], en su mayoría no han logrado cumplir en su totalidad los requisitos anteriormente citados. Así, por ejemplo, las CM embrionarias forman grandes agregados que provocan alteraciones morfológicas importantes y su falta de distribución adecuada hace necesario numerosos implantes[64]. Además, los niveles de diferenciación hacia interneuronas GABAérgicas son muy pobres y existe un alto riesgo asociado de formación de tumores[71]. En el caso del implante de precursores fetales, la diferenciación hacia interneuronas se ve mejorada, pero siguen subsistiendo problemas de distribución y de una expresión adecuada de GABA, que en algunos casos debe ser estimulada artificialmente mediante manipulaciones génicas[69, 70]. Además, su funcionalidad e integración electrofisiológica no se ha demostrado claramente[67].

Los trasplantes de interneuronas GABAérgicas inhibitorias como estrategia de supresión de crisis epilépticas ya fue contemplada hace más de 25 años [68, 72-74]. En los últimos años se viene pensando que los precursores GABAérgicos derivados de la MGE podrían llegar a ser útiles en la remisión de la epilepsia u otras enfermedades que cursen con epilepsia, como pueden ser las encefalopatías infantiles, ya que podrían ser empleados en trasplantes para suplir la ausencia de neuronas GABAérgicas o como fuente de GABA. Más recientemente, en nuestro laboratorio hemos trabajado en el desarrollo de la terapia celular como una alternativa terapéutica a la epilepsia y otras enfermedades neurodegenerativas mediante el uso de estos progenitores. Como veremos más adelante, hemos ido demostrando que estos progenitores si pueden cumplir con prácticamente todas estas las premisas que hemos descrito anteriormente para hacer una buena terapia celular. Vamos a conocerlos con más detalle.

2.3 Tratamientos mediante Precusores GABAérgicos: antecedentes

La principal fuente de precusores GABAérgicos de la corteza y del hipocampo durante el desarrollo cerebral es la Eminencia Ganglionar (GE, del ingles Ganglionic Eminence) y el neuroepitelio germinativo del área preóptica anterior (POA, del ingles Preoptic area) [75]. GE y POA forman una región localizada en el subpallium embrionario o telencéfalo ventral formando parte del primordio de los ganglios basales y que se distingue fácilmente entre los días 12 y 14 del desarrollo embrionario del ratón [76, 77]. La GE esta a su vez subdividida en tres zonas: Eminencia ganglionar medial (MGE, del inglés Medial Ganglionic Eminence), lateral (LGE, del inglés Lateral Ganglionic Eminence) y caudal (CGC, del inglés Caudal Ganglionic Eminence).

Cada una de las regiones de la GE pueden ser subdivididas a su vez según los factores de transcripción que expresan [78]. Además, cada una de estas regiones generan diferentes subpoblaciones de interneuronas, que se caracterizan por los factores de transcripción que expresan, la rutas de migración que emplean, así como los patrones de expresión de neuropéptidos y proteínas quelantes de calcio [72, 79]. La diversidad de interneuronas es consecuencia de la interacción entre los diferentes factores de transcripción existentes en estas regiones [79-84], describiéndose casi 20 dominios diferentes en el prosencéfalo basal en los embriones de los ratones [78]. Simplificando esta complejidad decir que las interneuronas que expresan PV y SST en la corteza e hipocampo se originan principalmente en la MGE, mientras que las CR se originan primordialmente desde la CGE. Por otro lado, desde la LGE se originan principalmente las interneuronas del estriado que expresan SST y Acetilcolina (ACh, del inglés Acetylcholine) [79, 80, 82-84]. Indicar que además estos precusores GABAérgicos tienen la propiedad de migran tangencialmente de forma natural desde la MGE guiados por gradientes de quimiotrofinas como *slit*, *Robo1* y *Robo2*, que forman corredores permisivos hacia el neocortex y el hipocampo, en donde completan su diferenciación a interneuronas GABAérgicas [76, 85].

En el año 2006 demostramos que los precusores derivados de la MGE se diferencian hacia interneuronas GABAérgicas tras ser implantados en el cerebro de ratones neonatos normales sanos [86]. Estos progenitores GABAérgicos fueron capaces de: 1) Migrar largas distancias, abarcando amplias zonas del la corteza cerebral, hipocampo y estriado; 2) Diferenciar, adquiriendo morfologías y marcadores moleculares característicos de interneuronas GABAérgicas maduras, sin que se produjesen crecimientos tumorales

anómalos; 3) Ser funcionales electrofisiológicamente, mostrando potenciales de acción y propiedades de membrana característicos de interneuronas GABAérgicas maduras. 4) Integrarse plenamente en los circuitos corticales existentes, ya que fueron capaces de modificar específicamente la actividad inhibitoria cortical en las regiones en donde se implantaron [86]. Estas propiedades les hacen únicos. Es uno de los pocos precursores conocido capaz de abarcar grandes zonas del cerebro, evitando las alteraciones provocadas por los grandes agregados que forman otros tipos celulares, como las ESC. Además, pueden ser ideales como vectores de distribución de moléculas terapéuticas. Aún más, posteriormente demostramos que estos precursores también se diferencian de forma natural a interneuronas GABAérgicas y forman contactos sinápticos en el cerebro adulto[87]. En él adquieren morfologías típicas de interneuronas maduras a las 3-4 semanas de su implante, expresando marcadores específicos de ellas, como PV y CR. Además, cerca de un 70 % de las células derivadas del trasplante expresan de forma natural GABA, y en un porcentaje inferior, SST y NP-Y[86]. Se ha llegado a observar la supervivencia de estas células más de 1 año después del trasplante y nunca se ha encontrado la formación de tumores. Por último, los análisis electrofisiológicos indican que la inhibición sináptica mediada por GABA en las zonas adyacentes al trasplante se incrementa significativamente, lo que demuestra que estas células pueden ser utilizadas para modificar selectivamente la actividad neuronal e incrementar la inhibición local[86]. Estos resultados sugieren que los precursores procedentes de la MGE podrían paliar algunos tipos de crisis epilépticas al incrementar selectivamente la inhibición local y frenar de ésta forma la hiperactividad cortical o en la zona del foco principal epileptogénico. Estudios mas recientes, realizados por nuestro grupo, han demostrado cómo el trasplante de estos precursores es capaz de restaurar la función inhibitoria del hipocampo en un modelo de susceptibilidad epiléptica. Este modelo se produce tras la ablación selectiva y localizada espacialmente de neuronas hipocampales que expresan los receptores de la sustancia P, una subpoblación de interneuronas GABAérgicas inhibitorias, mediante la inyección de una neurotoxina como es la saporina. Esta ablación provoca una fuerte desinhibición en el hipocampo asociada con hiperexcitabilidad y una mayor susceptibilidad a crisis epilépticas inducidas por Pentilentetrazol (PTZ). Las células trasplantadas mediaron efectos sobre la actividad sináptica local al observarse como las frecuencias y la amplitud de las corrientes inhibitorias postsinápticas (IPSC) en la células piramidales del hipocampo en CA1 en los animales tratados alcanzan valores

cercanos a los normales. Además, se redujo significativamente en los animales trasplantados la susceptibilidad a tener un ataque epiléptico [36].

Otro de los trabajos realizados por el grupo en un modelo de epilepsia aguda en ratón ha demostrado como el trasplante de precursores GABAérgicos derivados de la MGE es capaz de reducir la susceptibilidad a crisis epilépticas mediante la compensación de la actividad excitatoria al incrementarse selectivamente el número de interneuronas GABAérgicas[34, 35] . Por último, también ha sido demostrado por nuestro grupo cómo las progenitores GABAérgicos trasplantados en un modelo de choque electroconvulsivo muestran una actividad anticonvulsiva similar a la que presentan fármacos antiepileptogénicos convencionales. De forma que el trasplante postnatal de los precursores GABAérgicos incrementa el umbral epiléptico y/o bloquea la generalización de las crisis epilépticas [34, 36].

Por otra parte, diversos grupos también han utilizado la MGE en trasplantes en diferentes modelos animales con actividad epileptiforme. Precursores GABAérgicos procedentes de la MGE se han trasplantados en la corteza prefrontal en ratones neonatales a los que se suministra previamente Clohidrato de fenciclidina (PCP), droga disociativa antagonista de los receptores no-competitivo NMDA que provoca defectos cognitivos esquiziformes. Los defectos cognitivos inducidos por antagonistas de los receptores NMDA están asociados a alteraciones de las actividades rítmicas y alteraciones de la actividad de las proyecciones neuronales en la corteza prefrontal. Estas alteraciones de la actividad parecen estar precedidas por un descenso de la actividad inhibitoria de las interneuronas GABAérgicas positivas para PV en la corteza prefrontal, estando la mayoría involucradas en la ritmogénesis cortical; al igual que ocurre con las positivas para SST, las cuales secretan Reelina, proteína que regula la migración neuronal y su posicionamiento y que mejora la señal mediada por los receptores NMDA. De modo que un trasplante de precursores GABAérgicos en la corteza prefrontal procedente de la MGE, los cuales se diferencian en su mayoría en interneuronas positivas para PV y SST, incrementa la inhibición mediada por GABA en las proyecciones neuronales del huésped, modulando su actividad neuronal, por lo que el aumento de interneuronas GABAérgicas previene los efectos derivados del uso del PCP, pudiéndose deber a la modulación del circuito neuronal a través de la inhibición mediante GABA o a través del aumento de secreción de Reelina por estas células, previniendo la alteración de la actividad rítmicas y los defectos cognitivos provocados por el PCP [88].

También se ha observado como se produce una reducción de la actividad epileptogénica en animales modelos de epilepsia asociados a una iónico-canalopatía, al ser trasplantados con precursores procedentes de la MGE. Los animales neonatos trasplantados portaban una mutación de pérdida de función en un canal de potasio (*kv1.1/kcna1*), lo que les provoca a las 4-5 semanas de edad crisis epilépticas. El trasplante permitió la dispersión de los progenitores GABAérgicos a los 30 días a lo largo de toda la corteza postnatal, diferenciándose y expresando marcadores de interneuronas (PV, SST, CR, GAD67 y NpY) y produciendo además una reducción de la actividad epileptiforme, suprimiendo las características clínicas epilépticas de estos animales mutantes [89]. Las células tuvieron un claro efecto preventivo de las crisis al ser trasplantadas antes del inicio de los síntomas.

Por otra parte, Valente et al. Demostró que los trasplantes de precursores GABAérgicos derivado de la MGE tiene un efecto sobre el nivel de ansiedad en ratones trasplantados. El sistema GABAérgico es también crítico en la modulación de los niveles de ansiedad. Los efectos ansiolíticos de algunos fármacos que actúan contra los receptores de GABA o los trasplantes de células GABAérgicas en la amígdala constituyen grandes evidencias de cómo detrás de los estados de ansiedad hay una disfunción en el GABA. Los trasplantes de precursores GABAérgicos procedente de la MGE en animales neonatos mostraron un efecto ansiolítico en la edad adulta del animal trasplantado. El efecto de modulación de la ansiedad está en consonancia con lo observado en otros animales trasplantado donde las células procedente de la MGE secretarían GABA y actuarían controlando los niveles inhibitorios en la corteza [90].

En la misma línea, el grupo de Baraban ha demostrado como los trasplantes precursores GABAérgicos derivados de la MGE en un modelo de epilepsia crónica es capaz de reducir las crisis epilépticas, observación que se hizo mediante la monitorización por Electroencefalogramas (EEG) de los animales, en los cuales el 92% de los animales epilépticos trasplantados mostraron una reducción de las crisis, y en el 50% de esos animales no se observaron crisis epilépticas. También demostraron que estos precursores fueron capaces de revertir el comportamiento anormal asociado a la epilepsia. Los animales epilépticos (inducidos por pilocarpina) mostraron una mayor agresividad en comparación con los WT, que fue reducida al realizar los trasplantes con precursores procedentes de la MGE en hipocampo, pero no en la amígdala. Además, los animales epilépticos presentan una mayor actividad locomotora, que se puso de manifiesto al

realizar la prueba de open field donde recorrían una mayor distancia, que fue reducida en los animales trasplantados volviendo a niveles similares a un WT [91].

Por último, indicar que los precursores de la MGE también se han utilizado en otros tipos de patologías alejadas de la epilepsia, como son los dolores disestesicos centrales que se sufren al producirse una lesión medular. Estudios de electrofisiología han sugerido que en este tipo de lesiones se produce una disminución de la liberación de GABA, lo que explicaría la pérdida de inhibición GABAérgica en modelos de lesión medular, cuya pérdida del tono inhibitorio espinal contribuye al mantenimiento del dolor [92]. Los precursores GABAérgicos procedentes de la MGE prediferenciados en cultivo en células del tipo GABA-inmunoreactivas que se han trasplantado en la espina dorsal de ratas mediaron un alivio del dolor disestésico central que se produce al sufrir una lesión medular [93].

Finalmente, indicar que este mismo año se han publicado trabajos donde se indujeron células madres embrionarias [94], tanto humanas como de ratón, a diferenciarse en progenitores GABAérgicos similares a los procedentes de la MGE. Incluso se han trasplantado estas en ratones que presentaban una lesión generada por saponina, lo que les provoca pérdidas de memoria y aprendizaje. Tras el trasplante se observó como estas células derivadas de hESC producen una cierta corrección parcial de los déficit cognitivos [95].

Todos estos resultados previos señalan a las células de MGE como una fuente ideal de interneuronas GABAérgicas para el tratamiento de la epilepsia y otras enfermedades neuronales relacionadas con el sistema GABAérgico. Por lo que el uso de estos precursores GABAérgicos pueden ser una eficaz terapia contra las EEIs, especialmente el SW y otras encefalopatías relacionadas, por lo que esto se ha convertido en el objetivo primordial de la presente Tesis doctoral. Para ello contamos con una serie de líneas transgénicas modelo de SW y EI en los que hemos realizado una serie de trasplantes de células derivadas de la MGE para evaluar su potencial terapéutico.

Por otra parte, dado el interés y potencial de estos progenitores, su correcta criopreservación y cultivo para amplificar el número de células nos permitiría disponer de una fuente ilimitada de neuronas GABAérgicas. El mantenimiento de forma intacta de todas sus propiedades es muy interesante para su utilización en terapia celular, al ser el único tipo celular en donde se ha logrado un alto nivel de migración, integración y

funcionalidad tras ser transplantadas en el cerebro murino. Por lo expuesto anteriormente, es obvio que se hace necesaria la estandarización de un sistema de criopreservación para que en cualquier momento dispongamos de un alto número de precursores GABAérgicos para su trasplante. Sin embargo, aún no se conocen cuales son las condiciones más idóneas en las que llevar a cabo dicha criopreservación. Los sistemas y condiciones de preservación son múltiples y variados, por lo que en el presente trabajo hemos investigado diferentes procedimientos con el objetivo de establecer cuál es el más adecuado para las células derivadas de la MGE. Pero antes, vamos a saber un poco más sobre la criopreservación.

3. Criopreservación para Terapias Celulares

3.1 Antecedentes

La Criopreservación es el proceso por el cual células o tejidos son congelados a muy bajas temperaturas, generalmente entre -80°C y -196°C (el punto de ebullición del nitrógeno líquido), para disminuir las funciones vitales celulares y poderlo mantener en condiciones de *vida suspendida*. Es un proceso controlado de deshidratación celular que suspende de forma reversible la actividad enzimática celular[96-98]. Existen diferentes métodos de criopreservación que se basan en la velocidad de la congelación y la descongelación. Existen ciertos procesos comunes para todos los métodos de criopreservación cuya variación o modificación hace que sea un proceso de más adecuado para un tipo celular que para otro. Estas variables son fundamentalmente: la exposición inicial a crioprotectores; velocidad de enfriamiento a temperatura bajo cero; Almacenamiento; Descongelación; Dilución y eliminación del crioprotectores para retornar las células a las condiciones fisiológicas que permiten continuar con su normal desarrollo[96-98]. Los factores que más influyen son los tipos de crioprotectores y su concentración. Existen en la bibliografía numerosos crioprotectores como son[96]:

DiMetil-Sulfóxido (DMSO): Es muy tóxico a temperatura ambiente, pero si se aplica a baja temperatura es el que posee mejor resultado; **Polivinil pirrolidona (PVP):** La PVP no tiene un movimiento rápido tisular (a través de los tejidos), por lo que se utiliza mucho en embriones; **Hidroxi-etil-almidón (HES); Glicerol:** Muy utilizado para mantener enzimas entre los -5 a 4°C sin congelar; **Etilenglicol; Propanodiol (PROH); Criopreservantes Naturales:** Glucosa, Trehalosa y Glúcidos. Estos Crioprotectores actúan inhibiendo la formación de cristales intracelulares, que producirían una rotura de

la membrana plasmática, y disminuyendo el gradiente osmótico. Siendo por lo general el DMSO el criopreservante mas usado para la congelación de CM embrionarias.

3.2 Criopreservación de Progenitores Nerviosos

La criopreservación del tejido nervios es una técnica tradicional que se suele usar para un posterior trasplante o cultivo tisular [99]. La habilidad de criopreservar un tejido nervioso de la forma más correcta posible nos proporcionaría muchos beneficioso clínicos y en la propia actividad investigadora. Así por ejemplo, nos permitiría aumentar el tiempo del cual se dispone para testar la seguridad y funcionalidad de las células antes del trasplante; aumentar los tiempos de almacenaje. Poder usar siempre los mismo tipos de células para los ensayos; y disminuir la frecuencia de disección para obtener células suficientes con la que se puedan realizar los trasplantes [100].Teniendo en cuenta estos factores, y dado el interés que tienen los precursores GABAérgicos para su uso como tratamiento de diversas enfermedades, tales como las epilepsia y mas concretamente las EI, la criopreservación de estos precursores sería un gran avance en el ámbito de la terapia celular. Cabe recordar, como ya hemos dicho con anterioridad, que no existe ningún método, ni se conocen las condiciones necesarias para la criopreservación de los precursores GABérgicos de la MGE.

Actualmente existen dos métodos que son los más utilizados para la congelación de las CM embrionarias[98], las cuales cuentan con propiedades similares a los progenitores GABAérgicos. Estos son: la criopreservación por congelamiento lento, donde las células son criopreservadas como agrupaciones, o *in toto*, en donde se conservan las señales paracrinas que les ayuda a su mejor criopreservación, aunque tiene el inconveniente de que se puedan formar cristales intracelulares si la criopreservación no se realiza con un crioprotector; y por otro lado la criopreservación por vitrificación[97], que consiste en la solidificación de un líquido sin la formación de hielo ni cristalización, pero que presenta problemas de posible contaminación microbiológica, logísticos de almacenamiento y transporte, por lo que su aplicación para el congelamiento de CM embrionarias ha sido descartada. Otros parámetros que influyen en la viabilidad de las CM embrionarias han sido la velocidad de congelamiento y la temperatura final de almacenamiento, observándose que la mayor viabilidad se produce a temperaturas de almacenaje de -80°C

[100]. Los resultados obtenidos han mostrado que las células neuronales embrionarias son buenas candidatas para ser criopreservadas y que, aunque los resultados obtenidos por este grupo mostraron niveles de supervivencia muy bajas (aproximadamente 30% de supervivencia post-criopreservación), las células que sobrevivían tenían una morfología típicamente neuronal después de 48 horas en cultivos tras su descongelación [96-98, 100]. Por otro lado la autorrenovación in toto de neuronas GABAérgicas procedentes de la corteza han mostrado no influir en la adquisición de la misma morfología al descongelarse que las cultivadas in fresco [101].

Basándonos en los antecedentes descritos pretendemos en esta tesis obtener y poner a punto un procedimiento adecuado de criopreservación para las células procedentes de MGE, que nos permita tener células viables después de la criopreservación, manteniéndose las propiedades de migración, proliferación y diferenciación en los cultivos posteriores, y que puedan tener aplicación para terapia celular, ya que en la actualidad, no se conoce ningún tipo celular que haya sido capaz de llegar a semejante integración y funcionalidad al ser transplantado en el cerebro.

Hipótesis

Las encefalopatías infantiles, así como las enfermedades neurológicas y psicomotrices, que se dan en menores suelen presentar una alta resistencia a los fármacos, o bien las drogas empleadas conllevan numerosos efectos secundarios y una alta toxicidad. Por ello, se hace necesario otro tipo de estrategia que nos permita tratar este tipo de enfermedades de una manera más eficaz. En este punto es donde entra la terapia celular con precursores GABAérgicos procedentes de la MGE, y con la presente Tesis queremos transmitir un nuevo enfoque de cómo luchar contra estas enfermedades encefalopáticas con bases genéticas. Además con el presente trabajo queremos establecer un nuevo modo de trabajar con estas células mediante su criopreservación que nos permita tener disponibilidad de las células en el momento que nos sea necesario.

Por lo que nuestras hipótesis de partida en la presente Tesis, basándonos en los trabajos previos realizados por el grupo y otros laboratorios son:

- A) Los precursores GABAérgicos trasplantados en modelos de EEIs serán capaces de revertir total o parcialmente el fenotipo mutante causados por las mutaciones presentes en los modelos
- B) La Criopreservación *in toto* de las células procedentes de la MGE no afectará negativamente a las características intrínsecas de los precursores GABAérgicos.

Objetivos

Los objetivos principales de la presente Tesis son:

- **Validar la eficacia de los precursores neuronales GABAérgicos procedentes de la MGE como posible tratamiento de diferentes Encefalopatías Epilépticas Infantiles.**
- **Desarrollar sistemas de criopreservación estandarizados que nos permitan disponer de una fuente de estos precursores para su posterior amplificación y uso en la clínica.**

Para la consecución de estos objetivos, se establecieron las siguientes metas:

1) Analizar la capacidad de los precursores GABAérgicos derivados de la MGE para modificar la actividad neuronal y recuperar los perfiles normales de actividad electrofisiológica reduciendo el grado, frecuencia de las crisis y espasmos epilépticos en diferentes modelos animales de EEI.

a) Estudiar los efectos de las células aisladas de la MGE tras su implante en un modelo de Síndrome de West, enfermedad perteneciente a las encefalopatías epilépticas catastróficas infantiles.

b) Estudiar los efectos de las células de MGE trasplantadas en un modelo hipomórfico para *Lhx6*, como animal modelo de encefalopatía epiléptica.

1.1) Estudiar la distribución, supervivencia y diferenciación de las células derivadas del trasplante en un ambiente mutante epileptogénico.

1.2) Analizar el efecto de los trasplantes sobre las alteraciones del comportamiento que presentan estos modelos animales

2) Desarrollar protocolos estandarizados de criopreservación que nos permitan una alta viabilidad celular y preservar las propiedades intrínsecas de los precursores neuronales derivadas de la MGE.

2.1 Realizar ensayos *in vitro* de viabilidad, rendimiento y proliferación celular.

2.2 Analizar los precursores GABAérgicos criopreservados *in vivo* mediante su trasplante intracerebral para verificar el mantenimiento de sus propiedades intrínsecas.

Material y Métodos

1 Animales de Experimentación

Los animales de experimentación usados en esta Tesis Doctoral han sido varias líneas congénitas y transgénicas de *Mus musculus* (*Muridae*, *Rodentia*, *Mammalia*). Los ensayos se realizaron en tres laboratorios distintos, siendo el principal el Laboratorio de Terapia Celular para Neuropatologías del Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa, en adelante CABIMER. Los otros dos laboratorios, en los que se realizaron sendas estancias de formación, fueron The Children's Hospital of Philadelphia, en adelante CHOP, y National Institute for Medical Research, Londres. Las cepas utilizadas son las que ha continuación nombramos:

CD1

C57/Black6

129sv Hembras

GFP⁺ en fondo CDA1 o C57/Black6

Dlx5/6-cre-Ires-GFP⁺

GAD67-GFP⁺

ARX^{GCG7} en fondo C57/Bl6:

Lhx6^{LacZ} en fondo C57/Bl6

Lhx6⁻ en fondo C57/Bl6

1.1 Condiciones de estabulación y manipulación

Los animales utilizados en los tres laboratorios se estabularon en zona de barrera bajo Condiciones Libres de Patógenos Específicos (SPF, del inglés Specimen Pathogen Free). con las condiciones ambientales constantes: temperatura (22±1°C) y humedad (55±10%), en grupos de máximo 4 ratones por jaula de polieteramida (435cm³) ventiladas individualmente, con presión positiva y filtro HEPA, situadas en un rack o estantería con motores de impulsión y extracción del aire, con 15-20 ciclos de renovación de aire por hora. El ciclo de luz/oscuridad se estableció en 12h y los animales tenían libre acceso al agua y la comida. Con el fin de garantizar las condiciones sanitarias, los dos animalarios disponían de un programa de centinela y control medio-ambiental.

Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo con la legislación vigente en cada país. En España se siguió el RD 1201/05 y las directrices del Comité de Experimentación Animal del CABIMER. En el Reino Unido se siguió el Animal (Scientific Procedure) Act1986 (ASPA) revisado recientemente para adecuarse a la directiva Europea 2010/63/EU. En los procedimientos experimentales realizados en Estados Unidos se siguió las directrices marcadas por la Agencia estatal de Bienestar de los Animales y Plantas (APHIS del inglés The Animal and Plant Health Inspection Service), aprobado todos los procedimientos bajo el Comité de Experimentación Animal de CHOP.

1.2 Modelos Animales y mantenimiento de las colonias

A) Modelo animal de Síndrome de West

La colonia de este modelo fue mantenida mediante cruces de machos silvestres CD57/B16 y hembras heterocigotas para la mutación ARX^{CGC7}/X en fondo CD57/B16. De estos cruces obtenemos todos los genotipos necesarios para experimentación. (figura 3)

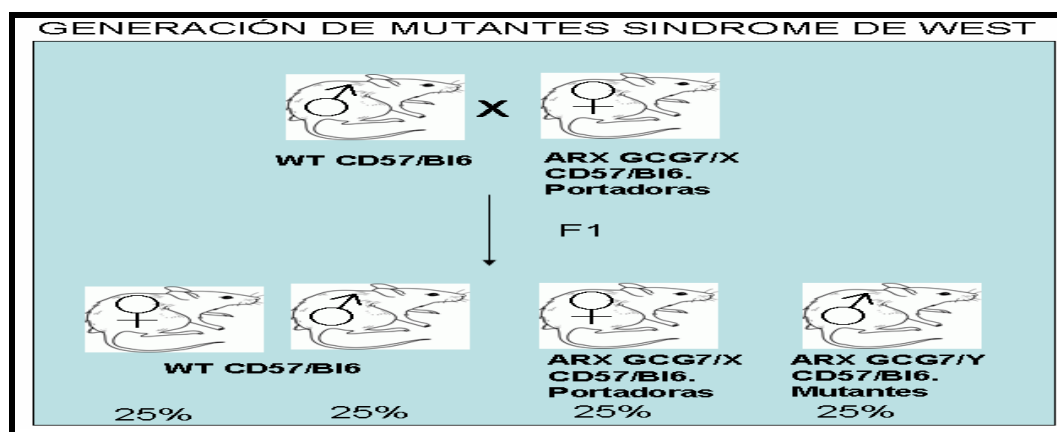


Figura 3: Cruces generación mutantes para el Síndrome de West

B) Animales hipomórficos y nulos para *Lhx6* como Modelo de Encefalopatía Infantil Epiléptica

En estos modelos de Encefalopatía tenemos que distinguir entre cruces para el mantenimiento de la colonia y cruces para la generación de los mutantes con los que hemos experimentado, tal como indico en los cuadros inferiores:

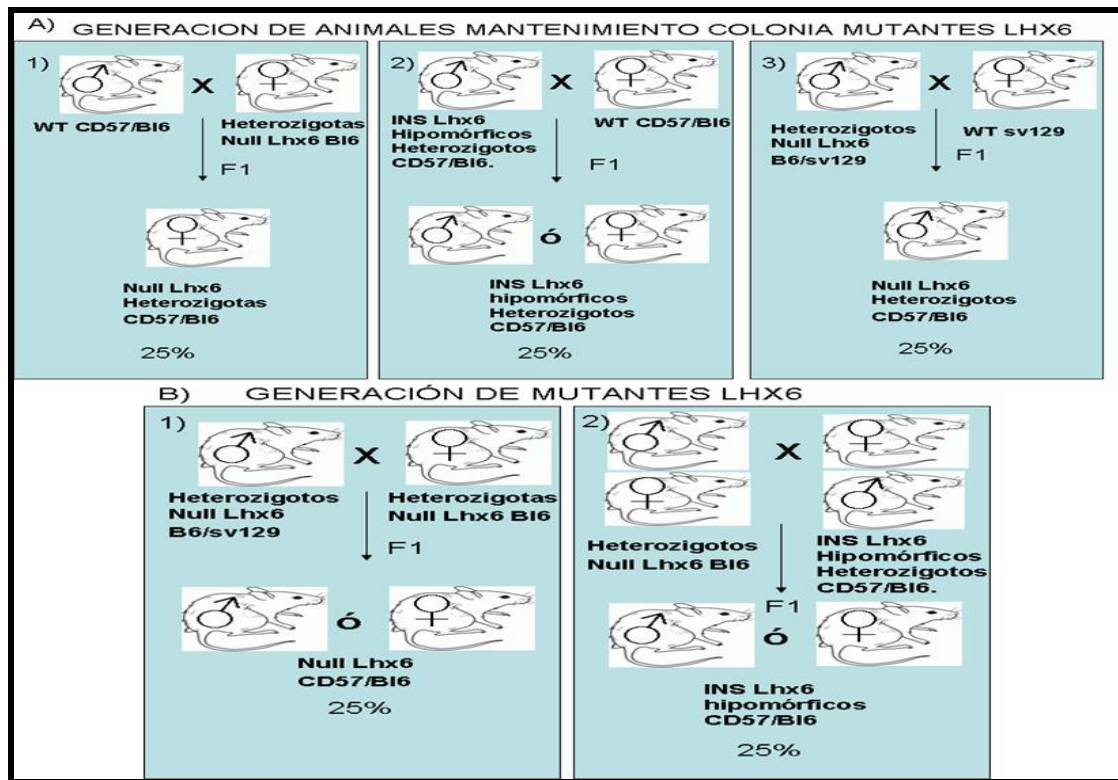


Figura 4: A) Cruces mantenimiento colonias de mutantes *Lhx6*. 1. Cruce generación heterocigotos hembras para *Null Lhx6*. 2. Cruce generación Heterocigotos para Hipomórficos *Lhx6* 3. Cruces generación heterocigotos machos para *Null Lhx*; B) 1. Cruces generación mutantes *Null Lhx6*. 2. Cruces generación mutantes hipomórficos *Lhx6*

1.3 Genotipado

El genotipado de los animales se realizó siguiendo protocolos establecido para cada uno de los modelos. La extracción de ADN a partir de las colas de los ratones se realizó mediante protocolo estándar de precipitación mediante alcoholes. Una vez extraído el ADN fue cuantificado y aproximadamente 20 ng se usaron en cada ensayo de genotipado por PCR.

Genotipado de la expansión de *Arx* (GCG7), modelo del Síndrome de West:

Se usaron la siguiente combinación de cebadores para la identificación de todos los genotipos potenciales, G7Fwd (GCG7 Forward): 5'- AAA GGC GAA AAG GAC GAG GAG GAA AGG-3'; G7 Rev (gcg7 Reverse): 5'- CTT TAG CTC CCC TTC GCA CAC-3', y Kita-Neo: 5'- TGT TCA ATG GCC GAT CCC AT 3'-

Las condiciones de PCR fueron:

Etapa 1, 1 ciclo: 94 °C , 5 minutos

Etapa 2, 35 ciclos: 94 °C, 30 segundos
61°C, 3 minutos

Etapa 3, 1 ciclo: 72°C , 10 minutos
4°C , ∞

Genotipaje de animales mutantes para *Lhx6*

Para el genotipaje de los animales NULL *Lhx6* e identificación de todos sus posibles genotipos, la PCR fue realizada mediante el uso combinado de los siguientes cebadores específico para la detección del alelo wild-type (*Lhx6*-F- 5'- AGGCGCTCTGGACAAGGACGAA-3' y *Lhx6*-R-5'- TGGAACCGGGGCAAAGGAGAC-3'), La segunda pareja de cebadores fue usada para la detección del alelo mutante NULL (GFP-F- 5'GTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTG-3' y GFP-R-5'- GGCAGATTGTGTGGACAGGTAATGG-3')

Para el genotipado de los animales hipomórficos para *Lhx6* (*LacZ*), se realizó una PCR para detectar la presencia del alelo *LacZ* (*LacZ*-F- 5'- CCGACGGCACGCTGATTGA-3' y *LacZ*-R- 5'-GCTCCGCCGCTTCATACTG-3') y la presencia del alelo mutante NULL anteriormente nombrado

Las condiciones de PCR fueron:

Etapa 1, 1 ciclo: 94 °C , 5 minutos

Etapa 2, 35 ciclos: 94 °C, 30 segundos
55°C, 30 segundos
72°C . 30 segundos

Etapa 3, 1 ciclo: 72°C, 10 minutos
4°C, ∞

1.4 Distribución y número de animales experimentales

En cada experimento y laboratorio se utilizaron machos y hembras, según el experimento que se fuera a realizar, y según laboratorio en el cual se realizaron:

A) Síndrome de West.

Los experimentos llevados a cabo en este modelos fueron realizados en el Laboratorio de Patología Médica del The Children's Hospital of Philadelphia (CHOP) y en el CABIMER.

En el CHOP, como animales donantes de precursores GABAérgicos se utilizaron embriones en edad de gestación de 13.5E, procedentes del cruce de una hembra de la cepa CD1 con macho Dlx5/6-cre-IRES GFP. Se utilizaron 4 hembras de las que se obtuvo un número de 54 embriones. Mientras que en el CABIMER, los embriones donantes se obtuvieron por el cruce de hembras CD1 con machos GFP+/CD1, utilizando alrededor de otros 54 embriones

Para la obtención de los animales receptores se utilizó hembras Heterozigotas para la mutación ARX^{CGC7}/X cruzándose con machos CD57/Bl6, de donde obtuvimos 5 camadas con un total 43 crías, con todos los genotipos posibles: ARX^{CGC7}/X , ARX^{CGC7}/Y , y los correspondientes hembras y machos wild-types., quedando los grupos de experimentación de siguiente forma:

- | | | |
|---|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • $ARX^{CGC7} + MGE$ • Wild-types + MGE | } | Animales Trasplantados con precursores procedentes de MGE |
| <ul style="list-style-type: none"> • $ARX^{CGC7} + L15$ • Wild-types + L15 | } | Animales Controles, a los que solo se les introduce medio L-15. |

Un total de 20 animales fueron trasplantados (MGE o L15), n=5 por grupo de animales.

B) Modelo de Encefalopatía epiléptica en animales hipomórficos para *Lhx6*

Todos los experimentos llevados a cabo en estos modelos fueron realizados en “National Institute for Medical Research, Londres”, a excepción de los estudios inmunológicos y los análisis posteriores.

Como animales donantes se usaron hembras que expresan GFP bajo el promotor GAD67 utilizándose aproximadamente 10 hembras correspondiendo a un número de 54 embriones, en edad de gestación de 13.5E, quedando los grupos experimentales:

- Hipomórficos *Lhx6* + MGE
 - WT + MGE
- Animales Trasplantados con precursores procedentes de MGE
-
- Hipomórficos *Lhx6* + L15
 - WT + L15
- Animales Controles, a los que solo se les introduce medio L-15.

Un total de 20 animales fueron usados para los experimentos, n=5 por grupo de animales

C) Ensayos de Criopreservación

Para llevar a cabo los experimentos de criopreservación y verificación in vivo de la viabilidad de las células criopreservadas se utilizaron animales de la cepa CD1 y GFP⁺/CD1. Estos animales fueron divididos en dos grupos experimentales: Trasplantes en animales neonatos y Trasplantes en individuos adultos.

Los animales donantes usados fueron embriones de 12.5 a 13.5 días de gestación procedentes del cruce de hembras CD1 con machos GFP⁺/CD1. Se utilizaron aproximadamente 40 embriones GFP como donantes de células para su trasplante en adultos, y otros 40 embriones para los trasplantes en cerebro de ratones neonatos.

Los animales receptores neonatos de 3-5 días de edad (P3-5) y adultos de aproximadamente 2 meses de edad fueron de la cepa CD1. En el grupo de animales adultos usamos un total de 10 animales, mientras que en el grupo de neonatos un total de 20 animales.

2. Aislamiento y Trasplante de los Precursores neuronales

La MGE de ratón se distingue fácilmente del resto de estructuras prosencefálicas, entre los días 12 y 14 del desarrollo gracias al surco formado en la zona subpalial intermedia, que separa la MGE y la LGE. Siendo además esta edad gestacional la idónea por encontrarse los precursores GABAérgicos en su máximo desarrollo.

2.1 Disección de los Precursores Neuronales (MGE)

La MGE de ratón se distingue fácilmente del resto de estructuras prosencefálicas, entre los días 12 y 14 del desarrollo gracias al surco formado en la zona subpalial intermedia, que separa la MGE y la LGE. Siendo además esta edad gestacional la idónea por encontrarse los precursores GABAérgicos en su máximo desarrollo.

Embriones de 12.5 a 13.5 días de gestación procedentes de hembras CD1-GFP fueron utilizadas para la obtención de la MGE, de manera que nos fuera mas fácil su seguimiento después del trasplante. El procedimiento de disección lo explicamos paso a paso a continuación:

- 1) Las hembras donantes son sacrificadas por dislocación cervical. Para la extracción de los embriones y con ayudada de tijeras y pinzas de precisión se abre la hembra por el útero dejando las crías en la bolsa placentaria. Posteriormente se corta por la pared del útero y la matriz, sujetando por uno de los extremos de la bolsa placentaria todo los embriones. Los embriones se colocan en una placa de petri que contiene medio L-15 fresco (Gibco-Invitron).
- 2) Una vez los embriones se encuentra en la placa de petri, se procede a sacarlo de las bolsas embrionarias con la ayuda de unas tijeras y pinzas finas. Se coloca los embriones sobre la base diascopica de la placa de petri con medio Fresco L-15. A partir de este momento se intenta que lo embriones estén en hielo el mayor tiempo posible para evitar la muerte celular durante el proceso de disección y que no se vea reducida la viabilidad celular.
- 3) Una vez colocados los embriones, procedemos a cortar la cabeza de los mismos, cuya fluorescencia es detectada mediante el XENOGEN (IVIS: in vivo Imaging system). Los embriones que no sean GFP+ se descartan.

- 4) Colocamos las cabezas de los embriones bajo la lupa, y con ayuda de dos pinzas finas idénticas de microdissección curvas procedemos a sacar el cerebro de los embriones. La cabeza es colocada por su lado ventral y sujeta por el lado más posterior con una de las pinzas, mientras que con las otras, a la altura de λ , se tira de la piel y el cráneo hacia los bulbos olfatorios con un movimiento suave y continuo, de esa forma logramos descubrir el cerebro. El cerebro es extirpado con ayuda de las pinzas curvas, colocándola por debajo de los dos hemisferios, cerrándolas y tirando hacia arriba. Los cerebros son colocados en una nueva placa de petri con medio fresco que se encuentra situada en hielo.
- 5) Para la extracción de la MGE, colocamos los cerebros en una placa de cerámica rellena de silicona en cada pocillo. Para este proceso se utilizan las pinzas de microdissección y un microbisturí de oftalmología con la punta de la hoja de 30° . Todo bajo lupa con fuente de luz fría. En los pocillos se coloca medio fresco, y procedemos a la disección. Los cerebros se dividen en cada uno de sus hemisferios mediante una incisión longitudinal en la línea media. Una vez tenemos los hemisferios separados, los giramos 90° y realizamos unos cortes laterales entre el bulbo olfatorio y las GE, se realiza el mismo corte en la zona posterior; lo que nos permite que la apertura del neocórtex y nos muestre la GE que se presenta en forma de dos bulbos, separadas entre ellas por el surco subpalial intermedio. Se realiza un nuevo corte entre las dos eminencias, separándolas. Una vez tenemos la MGE aparte, se gira 90° y cortamos la zona subventricular de la MGE. El corte es recogido y puesto en un tubo eppendorf de 1,5 ml que contiene medio fresco y se encuentra en hielo. Todo este proceso se repite con cada uno de los embriones.

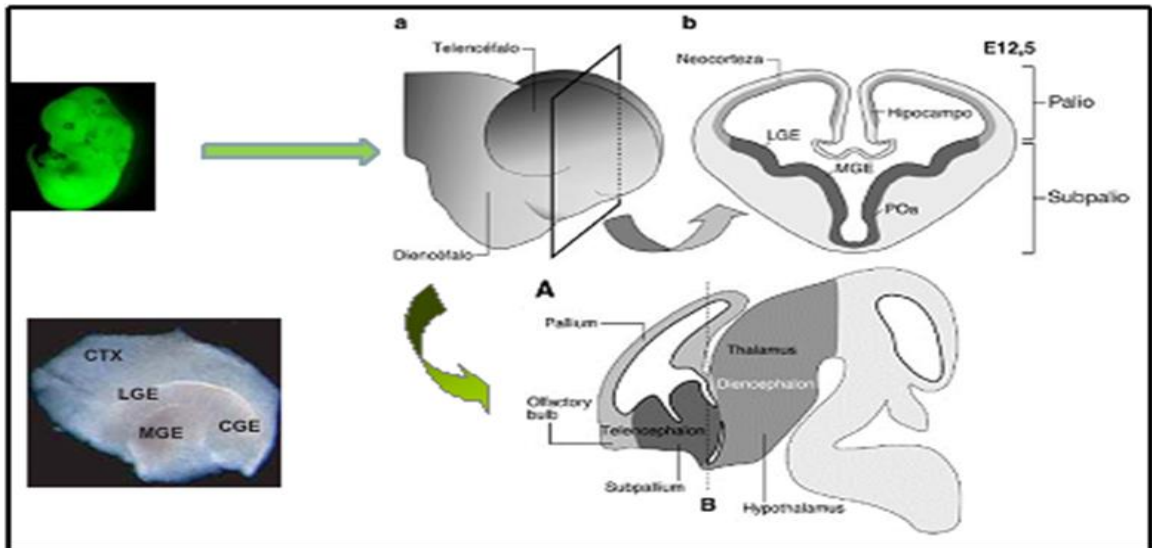


Figura 5: Disección de MGE Esquema donde se muestra la localización de la MGE

Una vez obtenido el tejido de cada embrión se recolecto en placas P-35 con medio L-12. Para llevar a cabo las condiciones de criopreservación preestablecidas, el tejido se congeló directamente *In toto* en medio definido completo con un 10% de DMSO, mientras que otros tejidos se congelaron disociados mecánicamente en presencia de Dnasa (1µg/ml). La suspensión celular fue lavada y centrifugada con medio control para resuspenderla a una densidad de aproximadamente $0.5-1 \times 10^6$ células/ml en medio definido completo con un 10% de DMSO para su congelación.

En el caso de las células procedentes de la MGE que fueron inicialmente cultivadas y posteriormente congeladas se procedió de siguiente forma. La suspensión celular obtenida tras la disociación mecánica en presencia de DNasa se sembró a una densidad de $0.5-1 \times 10^6$ células/ml en placas P60 especiales para cultivos en suspensión, en medio definido completo. Las placas se incubaron a 37 °C en atmósfera de 5% CO₂. Durante los 3 días siguientes a la siembra se añadieron 0,5 ml de medio completo y se verificó la formación y morfología de las NE, tras lo cual se realizó un pase 1:1, en el que una parte de las NE fueron disgregadas mecánicamente y congeladas en Medio definido Completo con 10% DMSO y otra parte se congeló directamente en forma de NE en Medio definido Completo con 10% DMSO.

2.2 Disociación y Resuspensión Celular

Una vez tenemos todo el tejido procedente de la MGE pasamos a su procesamiento para llevar a cabo el trasplante. Añadimos enzima DNAsa I a una concentración de 1 μ /ml (1000 U/ml Roche, USA) que digiere el ADN de las células muertas o dañadas el cual puede obstruir la punta de las micropipetas durante el trasplante. La disociación que se efectúa es mecánica, mediante la subida y bajada del émbolo de las micropipetas P1000 y P200 (puntas azules y amarillas), en el correspondiente orden, hasta su completa disociación. La suspensión celular es lavada y centrifugada 2 veces para resuspenderla a una densidad de $\approx 10^5$ células/ μ l.

2.3 Recuento de Viabilidad Celular

El recuento celular se lleva a cabo mediante la incubación de las células con Azul de Tripano al 0,2 %, (Gibco-Invitrogen, USA), y la cámara de Neubauer. Utilizando dicho colorante somos capaces de valorar la viabilidad celular, ya que éste solo es capaz de entrar en las células que están muertas o que tienen dañadas sus membranas plasmáticas.

2.4 Inyección y trasplante intracerebral

2.4.1 Micropipetas, Carga de micropipetas y Microinyector

La administración intracerebral de los progenitores neuronales GABAérgicos, tanto frescos como criopreservados, fue llevada a cabo mediante el uso de unas micropipetas fabricadas expresamente para esta finalidad. Las pipetas se fabrican a partir de capilares de cristal Wiretrol II green (5-000-2100) Drummond Scientific, USA. La elaboración consistió en 2 fases: 1) estiramiento del capilar, 2) biselado y pulido de la punta de la pipeta. El estiramiento se efectuó en un estirador vertical, semiautomático de hilo incandescente (PC-10, Narishige, Japan). Este paso determina el diámetro de apertura de la punta, que en el caso de las micropipetas para el trasplante celular fue de 50-70 μ m, para permitir una suave salida de las células a través de la punta. Con el biselador de micropipetas (Glass Micropipette Beveler 1300M, WPI, USA) se alisaron los bordes de

la punta con un ángulo de 35°, todo para permitir una penetración y descarga más fácil con el fin de reducir el daño colateral en el cerebro.

Una vez se ha terminado de preparar las micropipetas, ya biseladas y pulidas, se procede a cargar con aceite mineral, de modo que ejerza de líquido hidráulico entre el pistón y la micropipeta. Una vez tenemos la pipeta con el aceite mineral y el pistón, procedemos al acoplamiento de la micropipeta al microinyector mecánico (MO-10, Narishige, Japan) que consiste en una rueda graduada conectada a un sistema en forma de lápiz cuya parte extraíble se conecta con el pistón de la micropipeta. El microinyector funciona de manera que moviendo la rueda en una dirección u en otra somos capaces de inyectar o succionar volúmenes pequeños (según el diámetro de la pipeta desde 2nl en adelante). Con la micropipeta acoplada al microinyector, empezamos a cargar las células con las que vamos a realizar el trasplante. Antes de cargar las células se procede a introducir medio L-15, de modo que actúe de barrera entre el aceite mineral y las células.

2.4.2 Anestesia

Para la anestesia se empleo los protocolos anestésicos recomendados en cada centro de trabajo en los cuales se han llevado a cabo la Tesis. Estos protocolos de anestesia implica la utilización de una combinación Xilaxina/Ketamina. Rompun Inject Solution 2% de Bayer tiene como ingrediente activo la xilaxina que es un sedante agonista $\alpha 2$ adrenérgico (medetomidina), y como anestésico disociativo la ketamina (Imalgene® 1000). Todos los fármacos fueron diluidos en solución salina estéril (NaCl 0.9%).

Anestesia para neonatos en hielo.

Los ratones neonatos (P2-P3) se anestesiaron mediante hipotermia. La hipotermia se consiguió exponiéndolos al hielo hasta abolición del reflejo motor (aproximadamente 2 minutos) y sucesivamente se colocaron en un molde de silicona (Silicone Elastomer Clear, RS, USA) previamente preparado. Con un trozo de esparadrapo quirúrgico se estira la piel del cráneo e inmoviliza el animal

2.4.3 Cirugía esterotáctica y microinyección

Los ratones anestesiados (ver apartado 2.4.2) a los que se les efectuó los trasplantes se les cortó previamente el pelo de la parte dorsal de la cabeza, mediante maquinilla eléctrica o aplicación de crema depilatoria según cada laboratorio. Los animales fueron colocados en el esterotáxico al que previamente se había acoplado el correspondiente microinyector. Una vez posicionados se realizó una incisión mediante bisturí en la zona media del cráneo, de manera que expusimos el cráneo. Se desinfectó la herida con un bastoncillo de algodón embebido en alcohol al 70%. Una vez desinfectado, procedimos a trepanar el cráneo según la coordenadas estereotáxicas de interés con la ayuda de un mini-taladro (RT650 Black&Decker, Hong Kong), hasta exponer la meninges.

La micropipeta se introdujo por el trepano hasta la coordenadas deseada superándola unos $\approx 0.2\text{mm}$ de forma que podamos crear una especie del bolsillo en donde se alojara el líquido inyectado, de modo que evitemos la rotura del parénquima por sobrepresión, así como evitemos la subida de líquido y células cuando sacamos la pipeta después de la inyección.

En el caso de los trasplante en Neonatos, no necesitamos realizar una incisión en el cráneo, ya que la micropipeta es capaz de atravesar la piel y el cráneo sin romperse. Los animales neonatales se colocaron sobre una base de silicona (Silicone Elastomer Clear, RS, USA) hecha para dicha finalidad de manera que se inmoviliza al animal, el cual ha sido anestesiado mediante hipotermia.

2.4.4 Trasplante de Precursores Neuronales en el cerebro adulto

Los trasplantes de precursores Neuronales en Adultos se realizaron para los experimentos de Criopreservación.

En ambos casos las micropipetas fueron cargadas con una suspensión celular altamente concentrada ($\approx 10^5$ células/ μl) de células GFP+ procedentes de la MGE.

Los trasplantes en los animales se hicieron bilateralmente, en 2 puntos por hipocampo, uno en el hipocampo anterior y otro en el hipocampo posterior (“the mouse brain in stereotaxic coordinates” autores: G. Paxinosy Keith B.J. Franklin)). Las coordenadas que se siguieron fueron:

Hipocampo Anterior: Bregma -1,82. Interaural 1,98

X: +/- 1

Y: -1,8

Z: -2,3/-2,2/-2,1/-2,0/-1,9

Hipocampo Posterior: Bregma -2,54. Interaural 1,26

X: +/- 1,7

Y:-2,5

Z:-2,4/-2,3/-2,1/-2,0/-1,8

El volumen de inyección puede variar ligeramente de acuerdo con la concentración celular pero suele rondar los 40nl por cada punto de inyección, que al final resulta en $5 \times 40 \text{nl} = 200 \text{nl}$, de modo que inyectamos $1-2 \times 10^4$ células por punto. Una vez realizado el trasplante se pega la piel que recubre el cráneo mediante pegamento quirúrgico.

2.4.5 Trasplantes de Precusores Neuronales en el cerebro neonatal

Los animales neonatos fueron trasplantados a P3-P4. La anestesia fue llevada a cabo mediante hipotermia. Se colocaron en un molde de silicona (Silicone Elastomer Clear, RS, USA) previamente preparado para dicho fin y se inmovilizaron mediante esparadrapo quirúrgico, de manera que se estirara la piel para realizar el trasplante. Debido a que tanto la piel como el cráneo de los neonatos es muy débil, las micropipetas previamente biseladas y pulidas son capaces de atravesarla sin ningún tipo de problema. Las micropipetas fueron cargadas tal como se describe en el apartado anterior (apartado 2.4). Estos trasplantes se realizaron en los experimentos de Criopreservación como en los modelos de encefalopatías epilépticas estudiadas en la presente Tesis. Los trasplantes se hicieron en las siguientes coordenadas (Atlas of Developing Mouse Brains E17,5, P0 and P6. Paxino, George/Halliday)

Hipocampo Anterior: Figura 60 P0 #19 2,79mm

X: +/- 1

Y: -1,5

Z: -1,5/ -1

Hipocampo Posterior: Figura 68 P0 #27 3,75mm

X: +/- 1,7

Y:-2

Z:-1,5/-1

2.4.6 Tratamiento post-operatorio

Todos los tratamientos post-operatorios fueron recogidos en los CEEA de procedimientos. (CEEA 9/2009). Después de la operación se situaban los animales en su jaula bajo un luz roja o manta de calor (según laboratorio) para evitar la hipotermia debida a la anestesia. Los animales se observaban hasta su completa recuperación de la anestesia antes de devolverlos al rack ventilado. Durante los días siguientes de la operación se proseguía con el tratamiento post-operatorio a más largo plazo, consistente en la desinfección de la herida, e inyecciones de analgésicos y antibióticos durante dos días, según supervisión del veterinario. Los animales fueron vigilados para evitar en la medida de lo posible todas las infecciones post-operatorias. Los animales presentaron signos de sufrimiento que no fueron posibles de aliviar con los tratamientos post-operatorios, se procedió a su inmediata eutanasia mediante dislocación cervical.

3. Pruebas de Comportamiento.

3.1. Campo Abierto o Open Field

Prueba en donde se midió la movilidad, así como la ansiedad de los animales. Para ello se usó una caja rectangular de fondo negro dividida en 15 cuadrículas, que llamamos Arena, divididos en dos zonas: Periferia y Centro. Las medidas del campo abierto fue de 50cm x 30cm x 20 cm, cuyas cuadrículas son de 10cm x 10cm. El ensayo consistió en dejar a los animales durante 10 minutos en el campo abierto y medir el tiempo que paso en los animales en cada zona de la arena, la velocidad de movimiento y distancia recorrida total.

3.2. Objeto Nuevo o Novel Object

Prueba de Memoria, en esta prueba se estableció la memoria a corto y largo plazo mediante la presentación de objetos a los animales. La prueba de objeto nuevo se realizó en la misma Arena, dividiéndola en dos zona. En la primera parte del ensayo pusimos dos objetos iguales en ambas zonas durante 15 minutos, posteriormente cambiamos uno de los objetos por otro que difiere en forma, tamaño y color, y volvimos a dejar a los

animales durante 15 minutos con los dos objetos diferentes, pero siempre dejando 15 minutos de retención de memoria.

3.3. Prueba del laberinto de Brazo en cruz o Elevated Plus Maze:

Mediante esta prueba medimos la ansiedad y el miedo de los animales, cuando el animal se encuentra en una zona abierta y otra cerrada.

Los animales fueron puestos en la prueba del laberinto durante 5 minutos, midiéndose le tiempo que pasaban en cada uno de las zonas

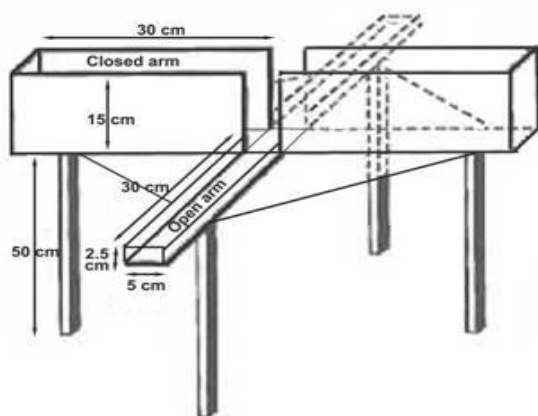


Figura 6: Esquema representativo de prueba del laberinto de Brazo en cruz elevado

3.4. Rotarod

Prueba de coordinación motora en la que comprobamos el estado locomotor de los animales. Esta prueba consiste en un eje que va acelerando gradualmente de revoluciones hasta un máximo de 40rpm durante 5 minutos que dura la prueba. Los animales fueron puestos en el Rotarod durante 3 días consecutivos y cada día se les hizo pasar la prueba tres veces, anotando el tiempo de latencia hasta su caída y las revoluciones a las que se precipitaron.

3.5 Prueba de fuerza o Grip Streght

Prueba de fuerza en la que se midió la función neuromuscular y la fuerza muscular mediante la medición del pico de fuerza que fue necesario para que el ratón se suelte de la zona de agarre o barra. Esta prueba está basada a la tendencia natural de los ratones de agarrarse a una barra cuando son suspendidos por la cola. La fuerza fue medida como fuerza de tensión.

Todas la pruebas fueron grabadas con cámara de video acoplada a un trípode, y posteriormente los videos analizados por medio del software libre “Ratón Time 1.0 Estadística de Comportamiento, Copyright Luís N Coll Fixma S.L” desarrollado por la Universidad de Psicología de Valencia”

4. Electrofisiología. Estudios de Electroencefalogramas (EEGs)

Los electroencefalogramas son medidas de la actividad eléctrica cerebral, de manera que mediante el implante de electrodos somos capaces de detectar la actividad eléctrica de regiones específicas del cerebro.

4.1 Preparación de electrodos

Se utilizó un amplificador (Texas Instruments) de 10 canales que fue preparado en laboratorio, al cual mediante un soldador se sueldan los electrodos usándose 8 canales correspondientes (Figura 7)

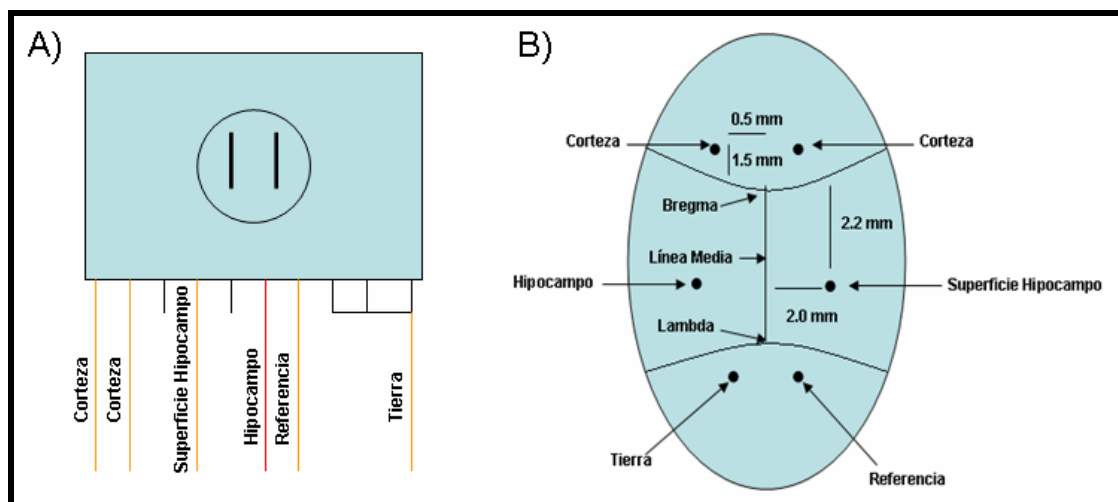


Figura 7: A) Esquema amplificador con electrodos. B) Coordenadas estereotáxicas de implantación de los electrodos en el ratón

Los electrodos fueron construidos mediante la utilización de cable de micromo y plata para la corteza y el hipocampo (A-M Systems, USA).

Una vez los electrodos fueron soldado al preamplificador se recubren mediante Resina Epoxi (Epoxy, Devcon) .Una vez secada la Resina, se lava para eliminar todo resto de resina y de soldadura, de modo que se encuentra lista para su implantación en los animales.

4.2 Cirugía de implante de electrodos

Los animales fueron anestesiado mediante mezcla Xilaxina/Ketamina, y fueron mantenido bajo condiciones de anestesia mediante la inhalación de Isoflurano en el estereotáxico. A los animales colocados en el estereotáxico se le aplico 50 µl de Atropina intradermicamente, antes de abrir la piel del cráneo para reducir el dolor durante la operación. Se trepana el cráneo según las coordenadas de interés. Al animal se le colocan una serie de tornillos (Small Part Inc, USA) a donde se unen los electrodos correspondientes, excepto los electrodos de hipocampo, referencia y Tierra que van directamente insertados dentro del cerebro.

Una vez tenemos todos los electrodos en sus lugares correspondientes, el pre-amplificador con los electrodos se fijan al animal mediante el uso de Cemento de Dentista (A-M Systems, USA). El animal se deja que se recupere en una manta de calor, y se vigila durante la siguiente 24-72 horas, para poder empezar hacer las grabaciones.

4.3 Electroencefalogramas (EEGs)

Las Grabaciones de los Electroencefalogramas se realizaron durante 24 a72 horas mediante sistema de Adquisición de EEGs Stellate en jaulas especiales para dichos análisis

4.4 Análisis de Grabaciones

Los Análisis de las distintas grabaciones se realizaron mediante el software Sirenia ® Seizure Pro (Pinnacle Technology Inc) y LabChart 7.2 (PowerLab Software,AD, Instruments, Castle Hill, Australia). Los registros de EGG fueron filtrado mediante filtro Notch a las frecuencia de 5-15Hz previos a su análisis. El comportamiento durante el registro fue clasificado entre, a) activo/explorando la jaula, y b) relajado/inmovil.

La frecuencia de disparos o spikes fueron cuantificados en intervalos de 24 horas y analizado mediante patrones de disparos (ver figura 16B), por medio del Sirenia ® Seizure Pro (Pinnacle Technology Inc). La actividad basal y el espectro de ondas fue analizada offline mediante LabChart 7.2 para obtener el porcentaje de potencia y las frecuencias de los diferentes ritmos de ondas características de los EEG (Delta, Theta, Alpha, Beta y Gamma). Mediante el cálculo de la transformada de Fourier (FFT) en 512 puntos, de al menos 10 intervalos de 2-4 minutos de duración seleccionados al azar a lo largo de 24 horas en los correspondientes estadios de actividad y relajación. De igual modo, se procedió al análisis de las frecuencias. El análisis del espectro de ondas fue calculado en las frecuencias de bandas seleccionadas: Delta (0,5-4 Hz); Theta (4-10 Hz); Alpha (10-13Hz); Beta (13-20 Hz) y Gamma (30-50Hz). El valor obtenido se expresa en porcentajes de potencia o power, que representa el sumatorio de todos los valores de potencia en una banda relativo a la potencia total en el EEG ((Potencia o Power absoluto en una banda/ potencia o power total en el EEG)*100)) [102-104]

Para comparar la significancia de los resultados entre los espectros y frecuencias de los diferentes grupos de animales, usamos one-way ANOVA y análisis de correspondencia de Tukey con el nivel de significancia del $p < 0.05$.

5. Técnicas Histológicas

Se denomina **técnica histológica** al conjunto de operaciones a que se somete una materia organizada, a fin de que sea posible su estudio por medio del microscopio, posibilitando la observación de estructuras no visibles al ojo humano. Es un proceso largo que conlleva la realización de unas series de pasos para su correcta visualización al microscopio.

5.1 Preparación de la Muestras.

5.1.1 Fijación

El proceso de fijación es aquel proceso por el cual una muestra, mediante un compuesto químico, conserva todos sus componentes tisulares, intracelulares y químicos, de modo que permanezcan del mismo modo que cuando se encontraban vivas, evitando todo el

proceso de degradación tras la muerte celular. Los procesos de fijación se pueden realizar de manera distinta, según el tejido, la finalidad de uso así como de la técnica histológica que queramos usar para su visualización en el microscopio. En el caso de las muestras utilizadas en esta Tesis, se utilizó una perfusión intracardiaca con una solución fijadora de Paraformaldehído al 4% (PFA 4%) que produce una conservación de la estructura tisular y celular en el cerebro.

5.1.1.1 Fundamento del proceso de perfusión in vivo

El proceso de perfusión es un proceso altamente tóxico debido a la utilización de PFA, de modo que todo el proceso, tanto de preparación del PFA al 4% en PB 0.1M como la perfusión se realiza dentro de una cabina de extracción de gases.

Los pasos de perfusión son los que se indican a continuación:

- 1) Los animales son anestesiados (apartado 2.4.2) hasta que presentan ausencia del reflejo pedal. Los animales se colocaron sobre una superficie de corcho blanco y se inmovilizaron de espaldas al corcho, de manera que las extremidades superiores e inferiores queden estiradas e inmovilizadas.
- 2) Los animales se inmovilizaron y a la altura del esternón se realiza un corte de 1-2 cm de largo, se agarra el esternón con unas pinzas, y se corta la piel y el diafragma junto con las costillas, todo en paralelo a los pulmones.
- 3) El esternón se sujeta con unas pinzas quirúrgicas y se levanta hacia la cabeza de manera que podamos exponer el corazón. Desde este momento hay que tardar lo menos posible para que el animal no se muera antes de que se pueda terminar la perfusión.
- 4) Se elimina el pericardio con las tijeras quirúrgicas y con ayuda de unas pinzas. La cánula se introduce a través del ventrículo izquierdo hacia la aorta ascendente. Con ayuda de unas tijeras se realiza una pequeña incisión en la aurícula derecha de manera que bajemos la presión existente en el corazón mediante la salida de la sangre de retorno.
- 5) La solución fijadora (PFA 4%) se hace fluir mediante la utilización de una bomba peristáltica de perfusión de ratón (Masterflex, Cole-Palmer, USA) de manera continua a una velocidad de 5,4 ml/minuto hasta hacer pasar unos 40-50

ml en ratones adultos. Una fuerte contracción muscular durante el proceso de perfusión nos indica una correcta fijación del animal.

- 6) Una vez el animal se ha terminado de fijar, se retira la cánula del corazón y se procede a la decapitación del animal para extraer el cerebro. Una vez tenemos extraído el cerebro se deposita en un tubo de Falcón de 15 ml que con tiene solución fijadora (PFA 4%), dejándose toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se continua con el procesamiento de la muestra o se pasa a otro falcón que contiene tampón fosfato (PB 0.1M, pH 7.4) con azida sódica al 0,05%.

5.1.2 Cortes Histológicos en Vibratomo

La realización de cortes histológicos para su observación bajo el microscopio se realizo mediante vibratomo (VT1000S, Leica Microsystems, Germany) con el cual obtenemos secciones finas adecuadas para su estudio y observación de las muestras. Los cerebros fijados se lavan con PB 0.1M pH 7,4 de manera que se elimina los restos de fijador. El cerebro se coloca en un molde para poder eliminar el cerebelo y los bulbos olfatorios. El telencéfalo se corto con el vibratomo, realizándose secciones de 50 µm dividiéndolas en 6 series de manera que exista una separación de unas 300 µm entre cada serie, destinándose cada serie a los análisis histológicos.

5.2 Técnicas de Inmunohistoquímicas

Las Técnicas Inmunohistoquímicas son técnicas de histológicas basadas en la interacción de un antígeno-anticuerpo, de manera que podamos detectar componentes intracelulares/tisulares de interés, como pueden ser neurotransmisores en el caso de sistema nervioso. Las Técnicas de Inmunohistoquímicas se basan en la utilización de anticuerpos con enzimas acopladas o fluorocromos acoplados, de manera que puedan ser visualizadas al microscopio óptico en el caso de utilizar anticuerpos acoplados a una enzima de manera que observemos el precipitado de la reacción enzimática, o mediante visualización al microscopio de fluorescencia cuando utilizamos si utilizamos un anticuerpo acoplado a un fluorocromo (Inmunofluorescencia). En el cuadro inferior se puede ver los anticuerpos, tanto primarios como secundarios, que se han utilizados para la elaboración de la Tesis.

TABLA 2	Animal de Origen	Fabricante	Referencia	Dilución de trabajo
Anticuerpos Primarios				
Anti-Parvalbumina	Ratón	Swant	235	1/1000
Anti-Somastotatina28	Conejo	Millipore	AB1752	1/400
Anti-Neuropéptido Y	Conejo	Sigma	N9528	1/500
Anti-Calbindina 28K	Conejo	Swant	CB-38 ^a	1/2000
Anti-doblecortina	Cabra	Santa Cruz	C-18	1/200
Anti-BrdU	Ratón	Sigma		1/100
Anti-Calretinina	Conejo	Swant	7699/4	1/200
Anti-ChAT	Cabra	Millipore	AB144P	1/100
Anti-GAD67	Ratón	Millipore	MAB5406	1/350
Anti-GFP	Ratón	Millipore	MAB2510	1/1000
Anti-GFP	Conejo	Abcam	Ab290	1/3000
Anticuerpos Secundarios				
Rodamina Red anti-conejo	Cabra	Jackson ImmunoResearch	111-295-144	1/400
Rodamina Red anti-Ratón	Cabra	Jackson ImmunoResearch	115-295-062	1/400
Fluoresceína anti-conejo	Cabra	Jackson ImmunoResearch	111-095-144	1/400
Fluoresceína anti-ratón	Cabra	Jackson ImmunoResearch	115-095-062	1/400
Alexa Fluor® 488 anti-Cabra	Mono	Jackson ImmunoResearch	705-546-147	1/400
Biotinilado anti-ratón	Cabra	Vector Laboratories	BA-9200	1/400
Biotinilado anti-cabra	Conejo	Vector Laboratories	BA-5000	1/400
Biotinilado anti-conejo	Cabra	Vector Laboratories	BA-1000	1/400

A continuación pasamos a explicar detalladamente los protocolos utilizados:

- 1) Las muestras se someten a tres lavados en PB 0.1 M a temperatura ambiente, para lavar los restos de azida del tejido.
- 2) Bloqueo de la Peroxidasas Endógenas: Mediante la adición de una solución con 10 % de metanol (Pareac, Spain) y 3 % de H₂O₂ (Pareac, Spain) en agua durante 15 minutos en tejidos adultos y 30 minutos en neonatos, debido a la mayor presencia de peroxidasas endógenas, a temperatura ambiente. Este proceso nos sirve para evitar que el sustrato que añadimos a la reacción, reaccione con las peroxidasas endógenas, y nos de falsos positivos. Este paso no es necesario realizarlo en la inmunofluorescencias.
- 3) 1 o 2 Lavados de 5 minutos en PB 0.1, a temperatura ambiente.
- 4) Bloqueo del fondo inespecífico: las secciones se dejan en agitación durante una hora en tampón bloqueo, que contiene 10% de suero normal de cabra (NGS, del inglés *Normal*

Goat Serum) y 0.01 % Tritón X-100 (Panreac, Spain). El uso del tampón de bloqueo con adicción del suero pretende bloquear los sitios de afinidad de las inmunoglobulinas, limitando las reacciones cruzadas que pudieran producirse entre nuestro anticuerpo y sitios de afinidad inespecífica, reduciendo el fondo inespecífico. Por otro lado, la adición del detergente Tritón, nos permite la permeabilización de las membranas celulares para que se pueda producir una correcta penetración del anticuerpo.

5) Incubación con el Anticuerpo primario (Ab, abreviatura del Ingles, *Antibody*): la incubación se realiza durante toda la noche a 4°C, mediante el Ab diluido en tampón bloqueo según tabla anterior.

6) Tres lavados de 5 minutos en PB 0.1 M a temperatura ambiente, de manera que eliminemos el exceso de Ab primario en las muestras.

7) Incubación en el Ab secundario: En este paso es donde diferencia las inmno peroxidasas y la Inmonofluorescencia. En el segundo caso el anticuerpo secundario va acoplado con un fluorocromo, el cual después de una hora de incubación, se le realiza lavados en PB 0.1M para eliminar el exceso, y ya esta listo para su ser observado bajo el microscopio.

En el caso de la inmno peroxidasas, el anticuerpo secundario va biotinilado el cual requiere de pasos adicionales para su revelado.

8) Se realiza dos lavados en PB 0.1M a temperatura ambiente, para eliminar el exceso de anticuerpo secundario que tenga la muestra

9) Incubación con el complejo ABC (Complejo de Avidina-Biotina-peroxidasa, vector laboratorios, USA): El complejo, a una dilución 1/300, se debe preparar entre 15 a 20 minutos antes de su utilización, de modo que se puedan formar los puentes Avidina-Biotina. Este complejo actúa como amplificador de la señal, debido a la afinidad del homotetrámero Avidina por la Biotina.

10) Revelado. Se realizan dos tipos de revelado según el nivel de señal del componente intracelular a detectar.

a) Revelado con el tetracloruro de la diaminobenzidina (DAB, del ingles, 3,3'-*Diaminobenzidine tetrahydrochloride*, Sigma-Aldrich, USA). La reacción se lleva acabo en oscuridad durante unos 10 minutos, hasta que la muestra se haya coloreado lo suficiente. La solución se prepara al 0.3 % + 0.01 % de peroxido de oxigeno, de manera que el peroxido de oxigeno actúe como sustrato de la reacción enzimática, y el DAB como donador de electrones, produciéndose la oxidación del DAB que precipita como un

precipitado marrón e insoluble. EL DAB es el cromógeno más utilizado con actividad peroxidásica.

b) Revelado con tiramidas. Las tiramidas son un compuesto que al ser catalizados por la peroxidasa producen un precipitado fluorescente. Igual que anteriormente se realiza en oscuridad durante un tiempo estimado de 10-15 minutos. La síntesis de las tiramidas se realizó siguiendo las instrucciones del TSA kit de Invitrogen

10) Finalmente se realizan tres lavados con PB 0.1M para eliminar el exceso de soluciones de revelado, se monta las secciones en un portaobjeto, se deja secar y se cubre con medio de montaje para ser observada en el microscopio óptico o fluorescente según corresponda.

5.3 Contaje Celular y Cuantificación

La cuantificación de los cuerpos celulares positivos para la GFP o/y marcadores interneuronales se efectuó sobre las imágenes obtenidas con una cámara Leica DFC350 FX digital acoplada al microscopio Leica modelo AF6000 (Leica Microsystems, Germany) y el programa específico de manejo de fotos LAS AF. (Leica Microsystems Imaging Solutions, Cambridge, UK). El índice de supervivencia de las células inoculadas a 2, 4 y 12 meses tras el trasplante se estimó en cortes seriados contando todas las células GFP+ en el eje antero-posterior y septo-temporal (7 secciones coronales de 50µm con 300µm de distancia entre ellas, incluyendo una que coincidía con cada sitio de inyección, 3 entre estos dos puntos y 1 por cada lado, anterior al primero y posterior al último, cubriendo una zona de -1.06mm a -3.28mm respecto a la Bregma a lo largo del eje longitudinal). La representación de la proporción entre el número total de células GFP+ y la distancia de migración se obtuvo sobre papel milimetrado y la cuantificación del área bajo la gráfica se consideró como el número total de células supervivientes. El porcentaje de supervivencia se estimó de la relación $100 \times (\text{número de células supervivientes}) / (\text{número de células trasplantadas}, 5 \times 10^4)$. El porcentaje de células GFP+ que expresaba PV, CB, GAD-67, SST o NPY fue calculado en cada animal (n=5) en 3 secciones coronales, entre los dos puntos de inyección en las regiones completas del CA1 y hilus del hipocampo. Se analizaron al menos 200 células GFP+ por cada marcador y animal.

La comparación estadística entre los grupos se calculó usando la prueba *t* de Student de una cola y análisis de one way-ANOVA con el nivel de significancia del $p < 0.05$.

6. Análisis de Imágenes de Microscopia: Imaje J

6.1 Cuantificación marcadores de poblaciones

Mediante el uso de los Microscopio de Fluorescencia vertical Leica modelo AF6000 acoplado una cámara Leica DFC350 FX para adquisición de imágenes monocromáticas a gran resolución, que se dirigido a través del programa LAS AF, se tomaron imágenes a distintos aumentos (5X dry, 10X dry, 40X dry), de manera que fueron usadas para su posterior análisis.

6.2 Análisis de Inmunoreactividad y densidad

El análisis de inmunoreactividad y densidad de los diferentes marcadores fueron estudiados con el software libre Image J, programa de análisis de imágenes.

El estudio de densidad de los marcadores se realizo mediante la herramienta ROI manager que nos permite seleccionar el área deseada. El estudio de inmunoreactividad se realizó acorde a lo descrito en Roberson et al 2001 Methods in Molecular Biology vol 670 Chapter 17.

Se realizó la medida de Valor gris medio (Mean Grey Value) a través del programa Image J en las zonas seleccionadas, de modo que el valor gris medio lo tomamos como el valor de inmunoreactividad, lo que nos dice que a mayor valor gris medio, mayor inmunoreactividad. El estudio lo realizamos a cada uno de lo marcadores, partiendo para cada uno de los animales de dos secciones diferentes a la cuales se le medio su inmunoreactividad. Además se realizó normalización interna con una zona donde no existiera expresión de los marcadores en cada una de la secciones, de modo que eliminemos factores como sobre expresión en el revelado, fondos y/o saturación al tomar las imágenes de microscopía.

Para la comparación de los datos entre los experimentos, se procedió a una normalización determinando la media de Inmunoreactividad de los WT, y normalizando el resto de resultados por este valor.

La comparación estadística entre los grupos se calculó usando la prueba t de Student de una cola y análisis de one way-ANOVA con el nivel de significancia del $p < 0.05$.

6.3 Análisis de morfología celular: Análisis de Sholl

El análisis de morfología se realizó mediante el uso de una extensión instalada en Image J: “*Advance Sholl Analysis*, Tiago Ferreira and Tom Maddock, Image J Documentation Wiki”. El análisis de Sholl (Sholl, 1953) es un método para cuantificar las propiedades morfológicas de la arborización de las neuronas mediante el dibujo de círculos concéntricos desde el soma hasta la dendrita más alejada al soma, midiendo el número de Intersecciones que se producen entre las dendritas. Ello nos permitió estudiar las propiedades geométricas de las dendritas, la riqueza en ramificaciones, y los patrones de ramificación. Usamos el análisis de Sholl para el estudio morfológico de nuestras células trasplantadas. Los parámetros estudiados fueron los siguientes:

- Valor Crítico (R_c): Mide la distancia r a la cual se producen un mayor número de Intersecciones de dendritas (N), que nos dice a qué distancia se produce la última ramificación dendrítica
- N_m : Número Máximo de Intersecciones de dendritas (N), indicándonos como de arborizado se encuentra la neurona
- N_v : Número medio de Intersecciones de dendritas (N)
- N_r : Es la función cuyo dominio es el intervalo cerrado $[r_1, r_2]$, que mide la distancia máxima desde el soma, indicándonos cuál es la longitud de la neurona
- Índice de Ramificaciones de Schoenen (RI): Este índice mide el ratio entre N_m y el número de ramificaciones primarias. Este índice RI nos indica si predomina más las ramificaciones primarias o secundarias, es decir menor RI mayor número de ramificaciones primarias.
- Área bajo la curva: El producto de N_r por N_v , dándonos un valor que representa el área que ocupa toda la arborización de las neuronas, que significa como de grande es la neurona
- Coeficiente de Regresión de Sholl (k): Mide la velocidad de caída del número de ramificaciones con respecto al aumento de distancia al soma. Indicándonos como se van reduciendo las ramificaciones dendríticas respecto a la distancia al soma

La comparación estadística entre los grupos se calculó usando la prueba *t* de Student de una cola y análisis de one way-ANOVA con el nivel de significancia del $p < 0.05$.

7. Criopreservación

7.1 Aislamiento y criopreservación de precursores neuronales de la MGE.

Se utilizaron embriones de 13.5 días (la observación de tapón vaginal se considerará día 0.5), diseccionándose cuidadosamente para aislar la MGE, como se ha descrito en la sección 3.1

7.2 Congelación y descongelación de MGE criopreservada para su trasplante

La congelación se llevo a cabo mediante el uso del contenedor para congelación de células Mr Frosty™ de Nalgene®, que nos garantizó una tasa de crítica de enfriamiento de 1°C/minuto para una correcta conservación criogénica y posterior recuperación de las células. Se dejaron toda la noche en un ultracongelador de -80°C, pasándose al día siguiente a contenedores de Nitrógeno líquido de -180°C.

La descongelación fue llevada a cabo mediante una descongelación rápida en baño a 37°C durante un tiempo aproximado de 2 minutos. Una vez descongelados los crioviales, se realizo una serie de lavados y centrifugados para eliminar el DMSO restante. Los tejidos de MGE criopreservado *In toto* fueron sometidos a una disociación mecánica (Apartado 3.4.5).

7.3 Cultivo de MGE criopreservadas.

A los 7 días de la Criopreservación, ya sea *In toto*, disgregados o tras la formación de NE se realizó el cultivo de MGE criopreservada en las diferentes condiciones establecidas.

Una vez descongelados los crioviales (ver apartado anterior), se realizo una serie de lavados y centrifugados para eliminar el DMSO restante. La suspensión celular se sembró en placas P60 especiales para cultivos de suspensión en medio definido completo. Los tejido de MGE criopreservado *In toto* fueron sometidos a una disociación mecánica y sembrados en placas P60, en medio definido completo; igualmente las NE

criopreservadas fueron sometidas a una disgregación mecánica y sembradas en placas P60, en medio definido completo. Todos los cultivos se incubaron a 37 °C en atmósfera de 5% CO₂. Durante los 3 días siguientes a la siembra se añadieron 0,5 ml de medio completo y se verificó la formación y morfología de las NE. A los 3 días en cultivo las NE alcanzaron el tamaño óptimo para realizar el pase siguiente y se disgregaron para su pase a frascos de cultivos (F25) previamente tratados con gelatina (0.1 % peso/volumen) como recubrimiento para promover la adherencia celular, para verificar que los cultivos mantenían sus propiedades proliferativas intactas.

7.4 Medios de cultivo primario de neurosferas (NE)

Medio Control:

Utilizamos como medio control el DMEM/F12 de Invitrogen 11039 con Hepes 15 mM, L-Glut 2.5 mM, el cual fue suplementado de la siguiente forma:

	<u>Stock</u>	<u>[Final]</u>	<u>Dil</u>
Glucosa	30%	0.6%	1/50
NaHCO ₃	7.5%	0.1%	1/75
Hepes	- 5 mM -	-	-
L-Glutamina	200mM	2 mM	1/100
Hormone Mix	10x	10% [105]	1/10
Penicilina/	10.000 U/ml P	100 U/ml	1/100
Estreptomicina/	10.000 U/ml E	50 U/ml	
Antimicótico	25 µg/ml A	0.125 µg/ml	

La preparación del Medio Control fue realizada en condiciones de esterilidad y una vez añadido todo los suplementos fue filtrado mediante un filtro de botella 0,2 μm .

Medio Completo o de cultivo:

Medio Control suplementado con:

	<u>Stock</u>	<u>[Final]</u>	<u>Dil</u>
BSA	40 mg/ml	4 mg/ml	1/10
EGF	4 $\mu\text{g/ml}$	20 ng/ml	1/200
PGF2	25 $\mu\text{g/ml}$	10 ng/ml	1/2500
Heparina (Sigma H3149)	700 U/ml	0.7 U/ml	1/1000

El Medio definido Completo o de cultivo una vez fue realizado se procedió a su filtrado, todo fue realizado en condiciones de esterilidad.

7.5 Inmunocitoquímica

Para la realización de las inmunocitoquímicas las células fueron fijadas con Paraformaldehído (PFA) al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente (RT), realizándose posteriormente 2 lavados en PBS. El bloqueo se realizo durante 1 hora en PBS/10% Normal Goat Serum (NGS)/0.1% tritón X-100 a RT. Una vez realizado el bloqueo se procedió a añadir el Ab 1^{ario} a una dilución 1/100 en solución de bloqueo, incubándose toda la noche a 4°C en continuo movimiento. Tras un lavado con PBS se añadió el Ab 2^{ario}, incubándose a RT durante 1 hora. Se llevaron a cabo tres controles para verificar el correcto funcionamiento de los Ab, un primer control sin Ab, un segundo control con sólo el Ab 2^{ario} de cabra contra ratón, y un tercer control con sólo el Ab 2^{ario} de cabra contra conejo.

Los marcadores utilizados en las Inmunocitoquímicas han sido Nestina+GFAP (precursores neurales), GFAP (astrocitos), MAP-2 (neuronas tempranas), NeuN (neuronas maduras), Olig-2 (marcador de origen de MGE) y NG2 (oligodendrocitos).

Utilizándose para ello los siguientes Ab 1^{ario} a una dilución 1/100:

- Nestina de ratón Anti-ratón de Chemicon
- MAP-2 de ratón Anti-ratón de Sigma

- NeuN de ratón Anti-ratón de Millipore
- GFAP de conejo Anti-ratón de Dakco
- Olig-2 de conejo Anti-ratón de Chemicon
- NG2 de conejo Anti-ratón

En cuanto a los AC 2^{ario} utilizados fueron dos tipos a una dilución 1/100:

- Anti-ratón hecho en Cabra de Jackson unido a FITC
- Anti-conejo hecho en Cabra de Jackson unido a Cy-5

Resultados Tesis

En este apartado presentamos los resultados encaminados a la consecución de los objetivos propuestos. En las primeras secciones mostraremos los datos obtenidos al trasplantar precursores GABAérgicos procedentes de la MGE en dos modelos animales murinos de encefalopatías infantiles. Empezaremos con el modelo de Síndrome de West, ya descrito en la introducción, que porta una adicción de 7 alaninas en el exon 2, que fue desarrollado en laboratorio de Kitamura y cedido por el Dr Jeffrey Golden del *Children's Hospital of Philadelphia (Filadelfia, USA)* [22].

Posteriormente, continuaremos con el segundo modelo de encefalopatía epiléptica, una línea transgénica hipomórfica para el gen *Lhx6* desarrollada y cedida por el laboratorio del Dr Vassilis Pachnis del *National Institute for Medical Research (Londres, Reino Unido)*. [25]

En ambos modelos se comprobó la distribución y diferenciación de las células trasplantadas; evaluamos mediante diferentes aproximaciones experimentales y análisis si las células trasplantadas lograban restituir las pérdidas que sufren en los diferentes subtipos de interneuronas y, específicamente, en el modelo de síndrome de west, por estar mucho más estudiado y definido su fenotipo, estudiamos el efecto que mediaban las células trasplantadas a nivel de comportamiento y electrofisiológico, mediante test de conducta y estudios de electroencefalogramas (EEGs), respectivamente. En el caso del modelo hipomórfico para *Lhx6*, al haberse descrito muy recientemente, las pruebas de comportamiento solo se realizaron para los animales con la mutación y sus controles wild-type (WT) sin trasplante, ya que no se había realizado el estudio con anterioridad.

Por otra parte, finalizaremos esta sección con los resultados obtenidos en los diferentes ensayos de criopreservación de los precursores GABAérgicos procedentes de la MGE. En ellos describimos diferentes aproximaciones experimentales para su mejor criopreservación, de forma que logramos una alta viabilidad tras su trasplante en el cerebro del ratón adulto y neonato al mismo tiempo que preservamos sus principales características de migración y diferenciación.

1. Efectos del trasplante de precursores GABAérgicos derivados de la MGE en un modelo animal de Síndrome de West.

Con el fin de analizar la capacidad de los trasplantes de precursores GABAérgicos procedentes de la MGE para reemplazar la pérdida de interneuronas GABAérgicas y su efecto a nivel morfológico, fisiológico y psicomotor, en una patología como la EEI, se usó el modelo animal de SW [22]. Este modelo de encefalopatía infantil presenta serias alteraciones morfológicas y pérdida de interneuronas desde el mismo momento del nacimiento, siendo la primera vez que se estudia el efecto a nivel de comportamiento de las células trasplantadas en un modelo de epilepsia neonatal y habiendo sido las células trasplantadas en un momento en que son ya evidentes las alteraciones cerebrales.

Para ello se realizaron trasplantes tanto en animales portadores de la mutación, como en animales sin ella (wild-types) y, asimismo, se establecieron dos grupos experimentales sin trasplante de animales mutantes (mutantes controles) y animales controles (Wild-types) a los cuales se les sometió al mismo procedimiento quirúrgico inyectándoles un volumen similar de vehículo.

1.1 Evaluación del comportamiento en animales de modelo del Síndrome de West trasplantados con precursores neuronales GABAérgicos derivados de la MGE.

Los animales mutantes con la expansión (GCG7), en adelante *Arx GCG7*, muestran un comportamiento característico causado por las anomalías morfológicas y de actividad cerebral que padecen (ver introducción). Estos animales presentan una mayor ansiedad e hiperactividad que los animales sin la mutación, fenotipo que se asemeja a lo que ocurre en humanos en donde los niños con SW muestran altos niveles de hiperactividad cerebral. Para comprobar si influía de alguna forma el trasplante de los precursores GABAérgicos en el comportamiento de estos animales se realizaron diferentes pruebas que permiten evaluar desde su actividad y coordinación motora hasta sus niveles de ansiedad.

Todos los grupos de animales fueron sometidos a las mismas pruebas y comparados entre ellos. Sin embargo, es importante indicar que las pruebas se realizaron antes de conocer si los trasplantes habían sido realizados correctamente. Por ello, una vez que analizamos los animales histológicamente (apartado 1.3), sólo aquellos que presentaban una cantidad de

células trasplantadas aceptables y cuya distribución y diferenciación en el animal huésped eran correctas fueron incluidos en la estadística para su estudio.

Iniciamos los ensayos realizando varias pruebas motoras para verificar que los animales no presentaban problemas de coordinación ni de fuerza que pudieran afectar al resto de ensayos que estaban planificados. Todas las pruebas se realizaron a las 3-4 semanas después del trasplante cuando las células trasplantadas ya han completado su diferenciación.

La primera prueba que se realizó fue un ensayo de fuerza o *Grip Strength* en donde medimos el estado y la fuerza neuromuscular (Material y Métodos 3.5). Nuestros estudios mostraron valores similares a lo ya publicado para este modelo en los diferentes grupos experimentales, tanto para los animales trasplantados como no trasplantados (Figuras 8 y 9). Los resultados obtenidos indicaron que la fuerza de agarre de las extremidades anteriores resultó ser similar en todos los grupos, lo que indica que no existe daño neuromuscular ni debilidad en estos animales debido a este tipo de mutación en el gen *Arx* [22].

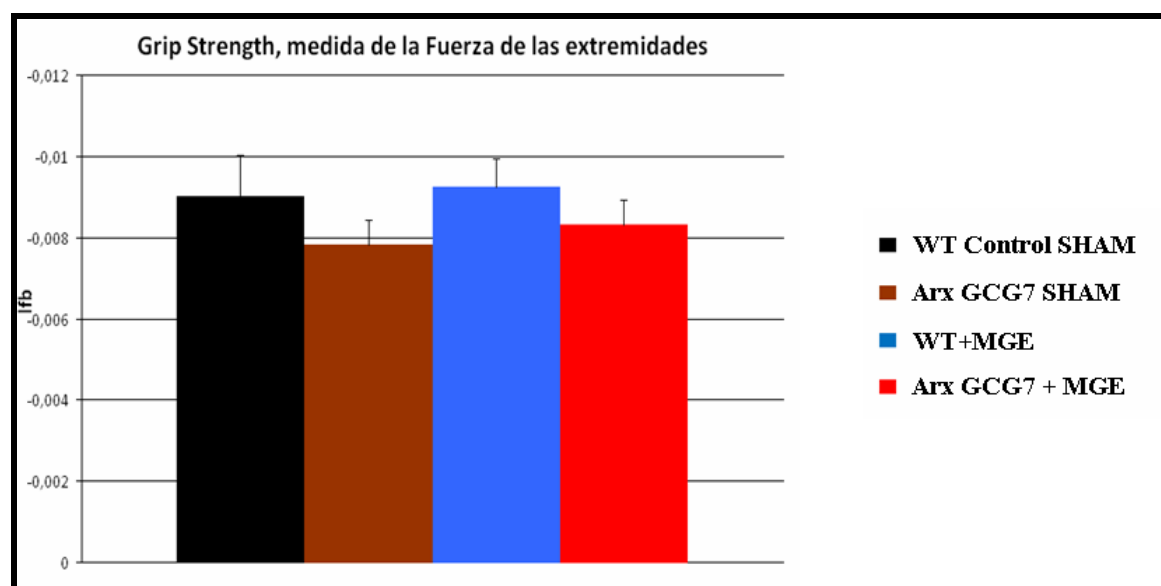


Figura 8: Prueba de Grip Strength, donde medimos la fuerza de agarre de las extremidades superiores e inferiores. No se muestran diferencias significativas.

La segunda prueba realizada fue el Rotarod, en donde medimos la coordinación motora (ver material y métodos 3.4). En esta prueba se midió el tiempo de latencia de caída, a cuantas revoluciones se produjo, así como los porcentajes de mejora en latencia a lo largo de los días que duró la prueba.

Indicar que se ha descrito que los animales *Arx GCG7* presentan un tiempo de latencia de caída en el rotarod menor que los animales wild-type (controles) [22].

Los resultados mostraron que los porcentajes de mejora con el tiempo en los tiempos de latencia de caída eran similares en todos los grupos, por lo que todos muestran un progreso similar en su coordinación con el entrenamiento. Sin embargo, los animales mutantes, tanto trasplantado como no trasplantado, presentaron valores absolutos de latencia menores que los animales wild-type, de forma similar a lo descrito por Kitamura et al. Esta aparente contradicción entre valores absolutos y porcentajes de mejora de la latencia puede achacarse al comportamiento hiperactivo y ansioso ante un nuevo ambiente que desarrollan los animales *Arx GCG7* [22]. Los animales mutantes, por su ansiedad, tienden a tirarse más que a caer del rotarod. Sin embargo, a lo largo del tiempo ambos grupos, mutantes y wild-type, logran progresar en la prueba e incrementan esta latencia.

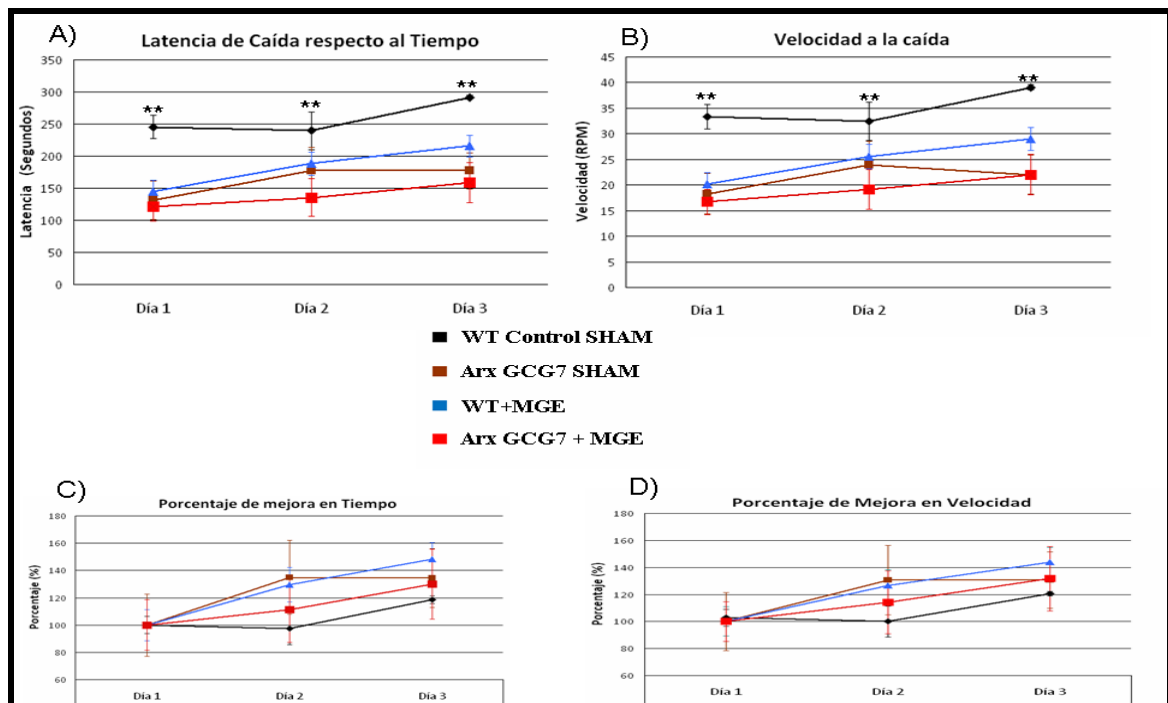


Figura 9: Evaluación de la Coordinación Motora mediante el uso de Rotarod. A y B muestran la latencia de caída en tiempo y velocidad, C y D representa como mejoran respecto al primer día de estudio. Mostrando un aprendizaje similar en los cuatro grupos.. Siendo algo menor la latencia en los animales mutantes *Arx GCG7* que los animales controles (WT). *t-student* $p < 0,01$ **

Trabajos previos han demostrado que mutaciones en *Arx* conllevan una hiperactividad motora y cerebral, así como una mayor ansiedad en respuesta a entornos nuevos, tal como describió Kitamura y Noebels.[20, 22] Una de las pruebas que mejor evalúa estos fenotipos es el campo abierto, en donde evaluamos la distancia recorrida y la velocidad media durante la prueba, parámetros que nos indican la hiperactividad motora; mientras que el tiempo total que permanecen los animales en la periferia de la arena y en el centro de la arena, así como la razón entre ambos parámetros, es indicativo de la ansiedad que tenían los animales. Conforme a lo descrito en la literatura, nuestros animales mutantes también mostraban este fenotipo de hiperactividad (*Arx* GCG7= 2346 ± 322,12 cm recorridos en el campo abierto vs Controles= 966,00 ± 138,32 cm recorridos en el campo abierto). Interessantemente, los resultados obtenidos en la prueba de campo abierto mostraron cómo los animales mutantes que fueron trasplantados reducen significativamente la distancia total recorrida en la arena, llegando a alcanzar valores similares a los animales control (*Arx* GCG7+MGE=1347,80 ±321,93 cm recorrido en el campo abierto) (Figura 10).

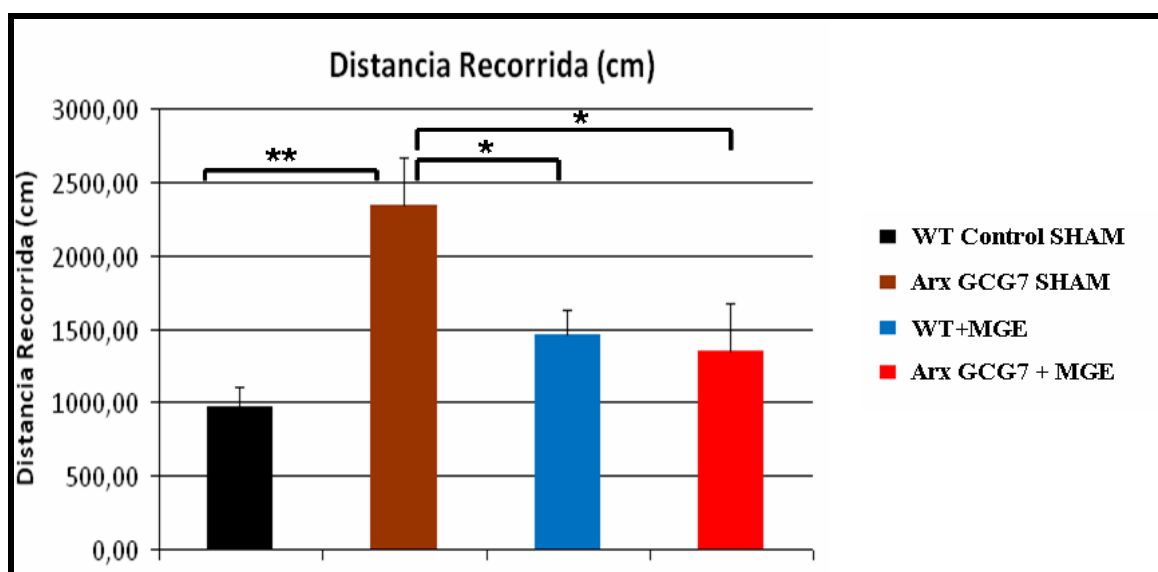


Figura 10: Distancia Recorrida en el campo abierto: Animales *Arx* GCG7 no trasplantados muestran un aumento de la distancia recorrida respecto a los animales controles (wild-typess) no trasplantado. Observándose una disminución de la distancia recorrida en los animales mutantes trasplantados con MGE. Se realizó prueba de t-student de una cola con valor de significancia de 0,05. Dando diferencias significativa para la prueba de t-student *Arx*GCG7 SHAM- WT Controles SHAM ($p=0,002$ **) y Animales WT+MGE- animales *Arx*GCG7 SHAM ($p=0,02$ *) El análisis ANOVA de un solo factor nos da que no hay entre los Animales *Arx* GCG7+MGE y los animales Controles, tanto NT como trasplantado ($F[3,40]=2.34$ $p=0,12$). Si hay diferencias en significativa en el ANOVA de un factor entre los animales mutantes *Arx* GCG7 SHAM y los animales WT, tanto NT como trasplantado. ($F[3.39]=9.72$ $p=0,0008$)

La reducción de la distancia recorrida fue acompañada con una reducción de la velocidad media a la que se desplazaron los animales mutantes trasplantados. (Controles= $4,08 \pm 0,41$ cm/s; Arx GCG7= $8,21 \pm 1,07$ cm/s; Arx GCG7+MGE= $5,01 \pm 0,96$ cm/s). Esta disminución en la velocidad y distancia recorrida suele asociarse a un descenso en hiperactividad y un menor estado de ansiedad (Figura 11).

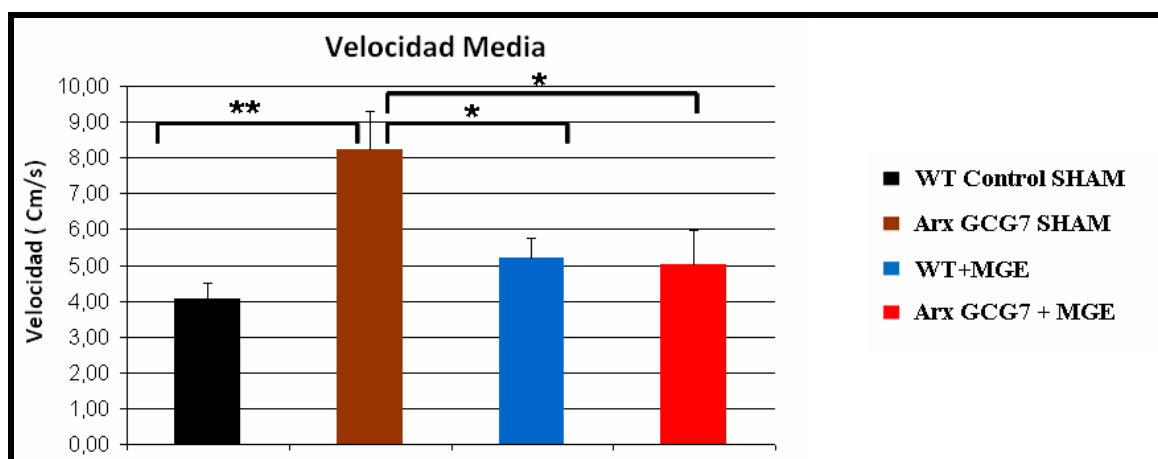


Figura 11: Velocidad Media alcanzada en el campo abierto. Los animales Arx GCG7 +MGE muestran una tendencia a reducir su velocidad media (reducción de hiperactividad). Se realizó prueba de T-student e y de una cola con un valor de significancia de 0,05. Dándonos diferencias significativas entre los grupos de Animales Mutantes Arx GCG7 NT- Animales WT Controles NT ($p=0,002$)** y Animales Mutantes Arx GCG7 NT- Animales Controles trasplantados ($p=0,02$)*. El análisis ANOVA de un solo factor nos da que no hay entre los Animales Arx GCG7+MGE y los animales Controles, tanto NT como trasplantado ($F[3,40]=2,35$ $p=0,12$). Si hay diferencias en significativa en el ANOVA de un factor entre los animales Arx GCG7+MGE NT y los animales controles, tanto NT como trasplantado. ($F[3,39]=9,72$ $p=0,0008$)

En este sentido, otro parámetro que suele asociarse con el estado de ansiedad es la entrada en la zona central de la arena. En este caso, los precursores de la MGE trasplantados en los animales mutantes también redujeron la ansiedad, ya que observando los parámetros del número de entradas y el tiempo que pasan en el centro se aprecia una clara tendencia a situarse en valores similares a los WT (Ratio Tiempo total Centro/tiempo total periferia: Controles= $0,1274 \pm 0,038$; Arx GCG7= $0,0335 \pm 0,004$; Arx GCG7+MGE= $0,0885 \pm 0,016$). (Figura 12 y 13). Para ahondar en el estudio de este efecto se realizó un seguimiento del recorrido de los animales durante la prueba mediante el programa “Any-Maze video tracking” versión 4.81, representándose el recorrido que realizan los animales en un gráfico, lo que nos da una idea de cómo su conducta se muestra alterada. La representación gráfica mostró claramente que los mutantes tienen un

recorrido que se limita a la periferia, mientras que los controles y los mutantes trasplantados exploran uniformemente casi toda la arena del campo abierto.

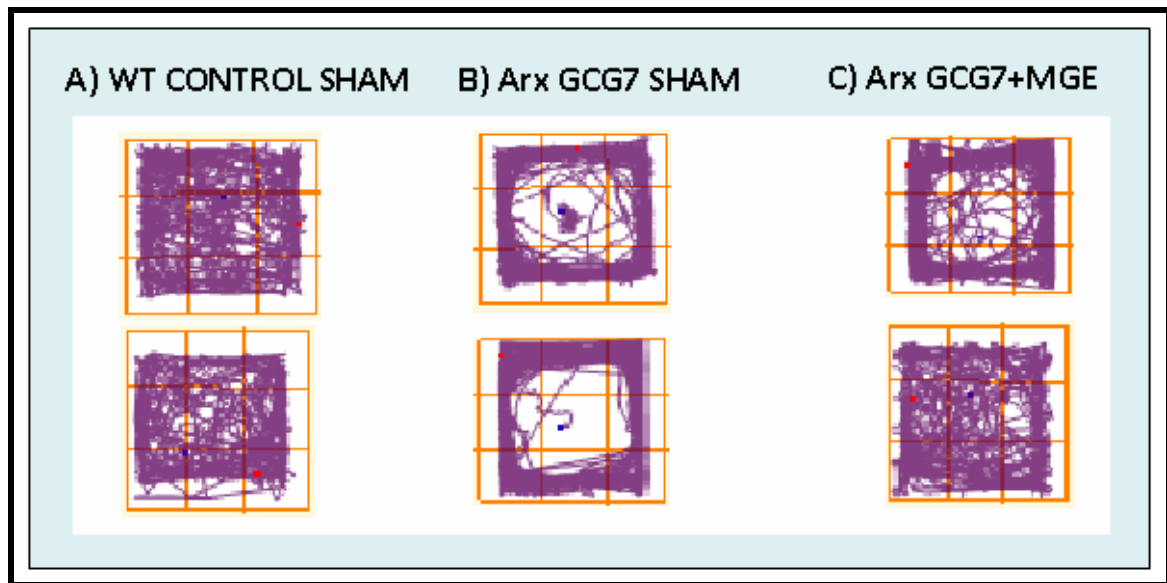


Figura 12: Recorrido durante la prueba de Campo abierto. A) Animales wild-types, recorren toda la arena del campo abierto. B) Animales Arx GCG7 SHAM, claramente se observó como el recorrido se limita a las zonas periféricas de la arena. C) Animales Arx GCG7+MGE, recorren con más asiduidad el centro de la arena.

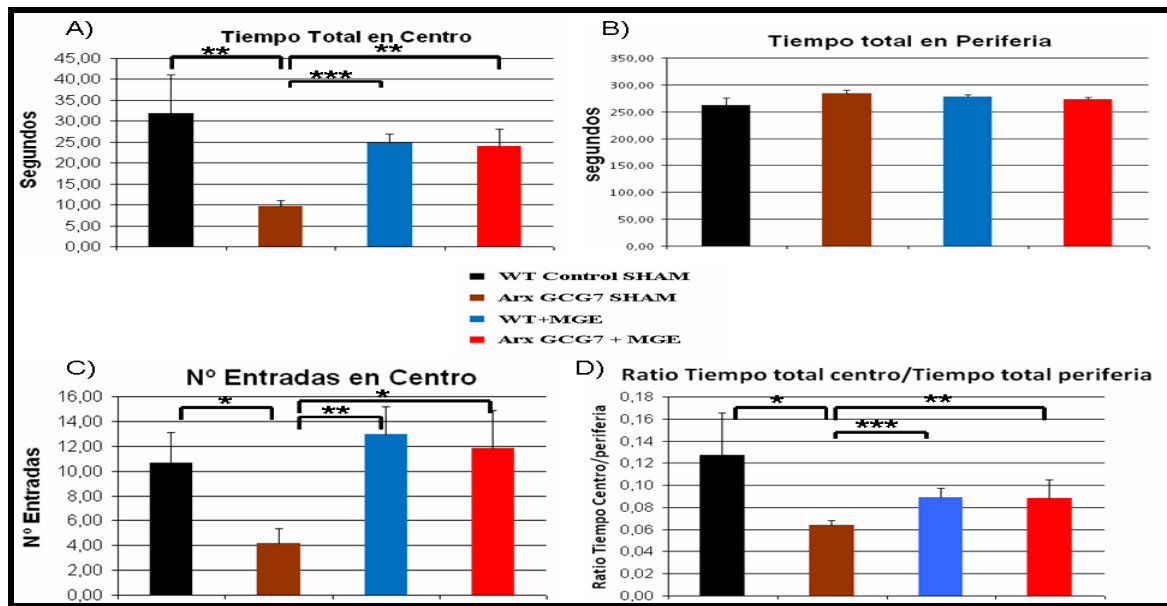


Figura 13: Tiempo total en la zonas del Campo Abierto y el número de entradas. A) Tiempo total en el Centro. Dádonos para la prueba t-student diferencias significativa de todos los grupos respecto al grupo de animales Arx GCG7 SHAM-Animales Controles (Wild-Types) SHAM ($p=0.027^*$); Animales Arx GCG7 SHAM - WT+MGE ($p=0.0008$); Arx GCG7 SHAM NT- Arx GCG7+MGE ($p=0.008^{**}$). El análisis ANOVA de un solo factor nos da que no hay entre los Animales mutantes EY trasplantados y los animales Controles, tanto SHAM como trasplantado ($F[3,40]=1.43$ $p=0.26$). Si hay diferencias en significativa en el ANOVA de un factor entre los animales mutantes Arx GCG7 SHAM y los WT controles, tanto NT como trasplantado ($F[3,52]=5.02$ $p=0.02$) B) Tiempo total en la Periferia. No muestran diferencias significativas entre los grupos. C) Número de entradas en la zona Centro. Dádonos para la prueba t-student diferencias significativa de todos los grupos respecto al grupo de animales Arx GCG7 SHAM. Arx GCG7 SHAM - Animales Controles (Wild-Types) NT ($p=0.017^*$); Animales Arx GCG7 SHAM - Animales WT+MGE ($p=0.005$); Animales Arx GCG7 SHAM - Animales Arx GCG7 + MGE($p=0.025^*$). El análisis ANOVA de un solo factor nos da que no hay entre los Animales Arx GCG7 + MGEy los animales Controles, tanto NT como trasplantado ($F[3,40]=0.22$ $p=0.80$). Si hay diferencias en significativa en el ANOVA de un factor entre los animales Arx GCG7 SHAM y los animales controles, tanto NT como trasplantado. ($F[3,38]= 3.64$ $p=0.04$) . D) Ratio del Tiempo total en el Centro/ Tiempo total de Periferia. Es una medida indirecta de la ansiedad-miedo que presentan los animales. A menor valor del ratio hay una mayor ansiedad-miedo. Resultando que los animales Arx GCG7 +MGE reducen su ansiedad a valores normales. Dádonos para la prueba t-student diferencias significativas de todos los grupos respecto al grupo de animales Arx GCG7 SHAM. Animales Arx GCG7 SHAM - Animales Controles (Wild-Types) NT ($p=0.04^*$); Animales Arx GCG7 SHAM - Animales WT+MGE ($p=0.0007$); Animales Arx GCG7 SHAM - Animales Arx GCG7+MGE ($p=0.008^{**}$). El análisis ANOVA de un solo factor nos da que no hay entre los Animales Arx GCG7+MGE y los animales Controles, tanto NT como trasplantado ($F[3,44]=0.28$ $p=0.76$).

Para comprobar de forma más directa el nivel de ansiedad de estos animales y confirmar en un segundo ensayo si se producía realmente una mejora en este comportamiento, gracias al tratamiento con los precursores GABAérgicos, se realizó la prueba de brazo elevado en cruz (EPM, del inglés Elevated Plus Maze). Esta prueba consistió en dejar los animales en un brazo en forma de cruz elevado a unos 50 cm del suelo, que se divide en dos zonas, un brazo cerrado y otro brazo abierto. Se midió el tiempo que pasaron los animales en cada uno de los brazos, lo que nos indicó cómo de ansiosos se encontraban

los animales. En la prueba se observó cómo los animales *Arx* GCG7 SHAM pasaron un mayor tiempo en el brazo abierto respecto al tiempo que pasaron los WT (Controles = $40,3 \pm 1,0$ % del tiempo en el brazo abierto; *Arx* GCG7 = $66,7 \pm 4,9$ % del tiempo en el brazo abierto), lo que confirmó los datos obtenidos por el grupo del Dr. Kitamura [22]. Posteriormente al realizar la prueba en los animales *Arx* GCG7+MGE se observó una reducción de estos valores (*Arx* GCG7+MGE = $33,1 \pm 9$ % del tiempo en el brazo abierto), llegando a valores similares a los obtenidos en los WT, lo que confirmó los resultados anteriores obtenidos en el campo abierto. Una representación del recorrido de los animales en el laberinto pone de manifiesto de forma visible este efecto. (Figura 14 y 15)

En conjunto estos datos sugerían fuertemente un claro efecto inhibitorio sobre la ansiedad de los animales mediado por el trasplante de precursores GABAérgicos. Así mismo, se observó cierta tendencia en el mismo sentido en los animales wild-types trasplantados, aunque los datos no resultaron estadísticamente significativos.

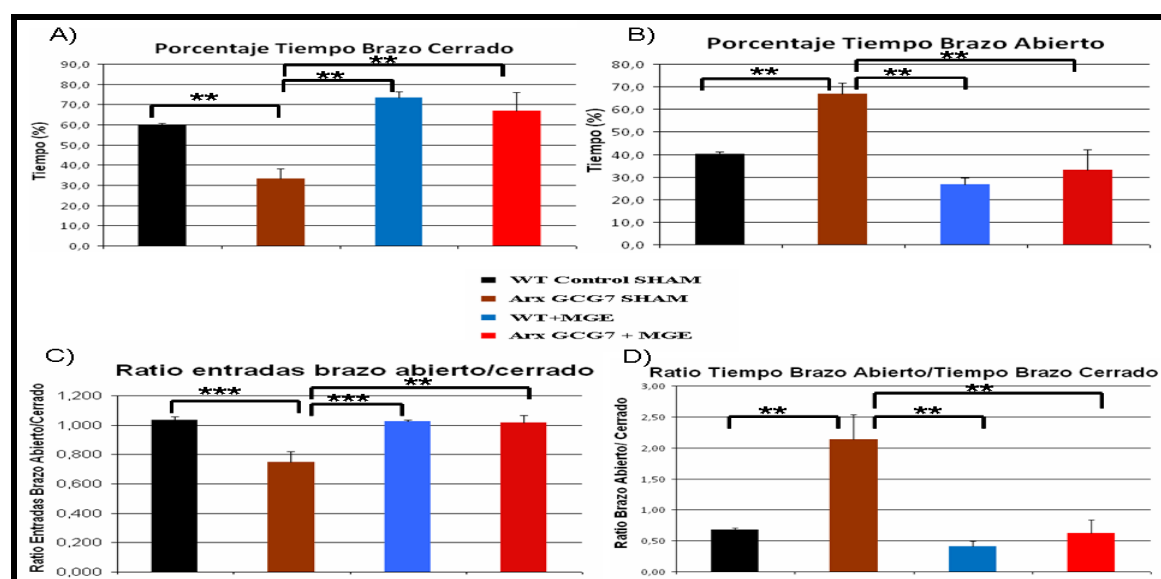


Figura 14: Prueba de laberinto en cruz elevada (Elevated Plus Maze). Los animales con la mutación en el gen ARX muestran una mayor ansiedad, siendo revertido el fenotipo al trasplantarse con los precursores GABAérgicos. A-B) Los animales mutantes pasan mayor tiempo en el brazo abierto que el cerrado, mientras que los animales mutantes los porcentajes son similares a los controles (WT) Dándonos para la prueba t-studentuna cola diferencias significativa de todos los grupos respecto al grupo de animales GCG7. Animales GCG7- Animales Controles (Wild-Types) NT (A $p=0.03$; B $p=0.03$)**Animales Arx GCG7 SHAM- Animales WT+MGE (A $p=0.002$; B $p=0.003$); Arx GCG7 SHAM- - Arx GCG7+MGE (A $p=0.016$; B $p=0.016$)**. El análisis ANOVA de un solo factor nos da que no hay entre los Animales Arx GCG7 +MGE y los animales Controles, tanto NT como trasplantado (A $F[3.44]=1.52$ $p=0.24$; B $F[3.44]=1.52$ $p=0.24$). Si hay diferencias en significativa en el ANOVA de un factor entre los animales mutantes Arx GCG7 SHAM y los animales WT controles, tanto NT como trasplantado (A $F[3.49]=17.18$ $p=0.00005$; B $F[3.49]=17.18$ $p=0.00005$). C) El ratio de entradas en el brazo abierto muestran diferencias significativas. D) Medida del ratio entre el tiempo que pasa en el brazo abierto entre el tiempo en brazo cerrado. Nos da un indice de ansiedad, a mayor indice se produce una mayor ansiedad e hiperactividad. Dándonos para la prueba t-student diferencias significativa de todos los grupos respecto al grupo de animales Arx GCG7 SHAM. Animales Arx GCG7 SHAM - Animales Controles (Wild-Types) NT ($p=0.04$)** Animales Arx GCG7 SHAM- - Animales WT+MGE ($p=0.03$); Animales Arx GCG7 SHAM- Animales Arx GCG7 +MGE ($p=0.03$)**. El análisis ANOVA de un solo factor nos da que no hay entre los Animales Arx GCG7+MGE y los animales Controles, tanto NT como trasplantado ($F[3.44]=1.49$ $p=0.25$). Si hay diferencias en significativa en el ANOVA de un factor entre los animales mutantes Arx GCG7 SHAM y los animales WT controles, tanto NT como trasplantado ($F[3.49]=32.29$ $p=0.0000005$)

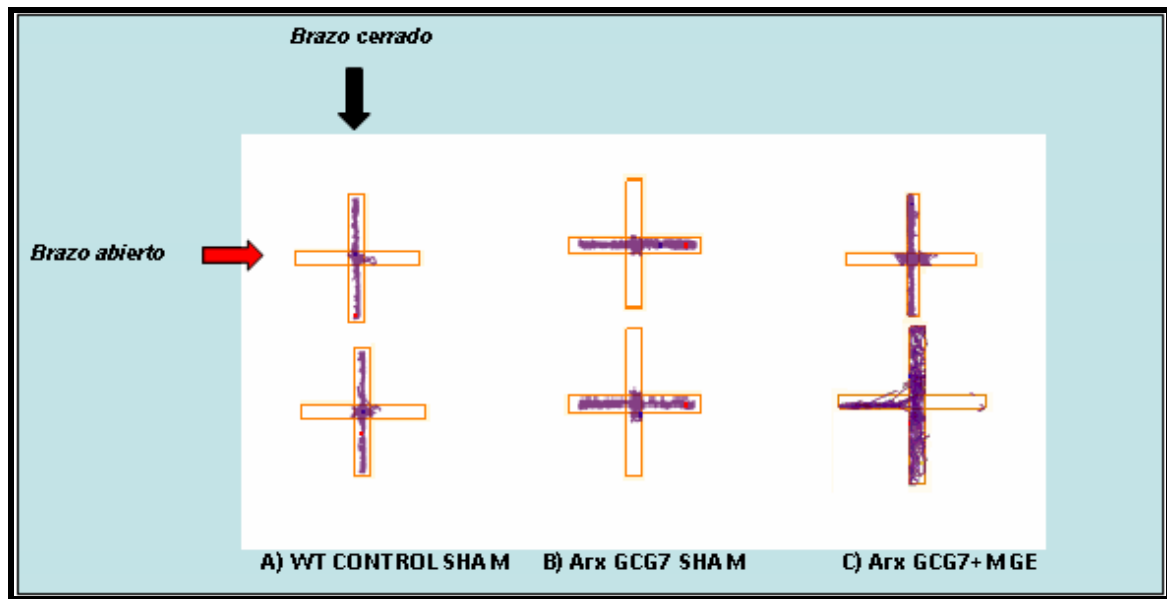


Figura 15: Recorrido durante prueba de brazo en cruz elevado. A) Animales wild-types, pasan la mayor parte del tiempo en el brazo cerrado. B) Animales Arx GCG7, claramente se observó como pasa la mayor parte del tiempo en el brazo abierto. C) Animales Arx GCG7+MGE, claramente pasan mas tiempo en el brazo cerrado, tal como ocurre con los wild-types.

En su conjunto, los resultados obtenidos en las diferentes pruebas de comportamiento realizadas indicaron que los animales trasplantados con los progenitores GABAérgicos procedentes de la MGE presentaban una clara recuperación a nivel psicomotor y en su estado de hiperactividad/ansiedad, llegando a valores muy similares a los grupos control (wild-types). Ello sugería que las células trasplantadas, una vez diferenciadas, podrían integrarse en la red neuronal del huésped de manera que modulasen la actividad cerebral. Esta posible integración implicaría la corrección de las crisis epilépticas y de las alteraciones en los encefalogramas que padecen estos ratones mutantes, lo que estaría en la base de las mejoras a nivel de comportamiento. Para comprobar esta posibilidad se realizaron los análisis de actividad EEG y morfológicos que se muestran a continuación.

1.2 Estudios de electroencefalogramas en modelo del Síndrome de West trasplantado con precursores neuronales derivados de la MGE

Se han descrito alteraciones en el EEG en los mutantes *Arx*, tanto en los desarrollados en el laboratorio de Kitamura como en los laboratorio de Noebels y Golden [20-22] En todos los mutantes se han descrito crisis epilépticas en el 70 % de los animales con la mutación, mostrando una actividad interictal anormal de los EEG. Se ha observado un aumento del número de disparos (llamados spikes) interictales presentes en los animales con la mutación, encontrándose estos spikes agrupados o en “clusters” en todos los casos. Teniendo en cuenta estos datos, decidimos implantar electrodos a una serie de animales y realizar un estudio de EEG en nuestros animales *Arx* GCG7, tanto trasplantados como no trasplantados, realizando el análisis a las 3-4 semanas de los trasplantes cuando los animales tenían aproximadamente un mes de vida. Los datos obtenidos en el EEG de los animales *Arx* GCG7 no trasplantados corroboraron los resultados publicados anteriormente por otros grupos, observándose una clara alteración de la actividad interictal del EEG respecto al WT, con un aumento en el número de spikes respecto a los WT. Sorprendentemente, al analizar los animales *Arx* GCG7+MGE se observó una reducción en el número de spikes, de casi un tercio respecto a los animales *Arx* GCG7 no trasplantados, de igual manera ocurrió con el número de cluster o agrupaciones de spikes observadas. Además se observó un aumento entre los tiempos de aparición de los spikes. Datos que sugieren el efecto inhibitorio sobre la actividad cerebral de las células trasplantadas

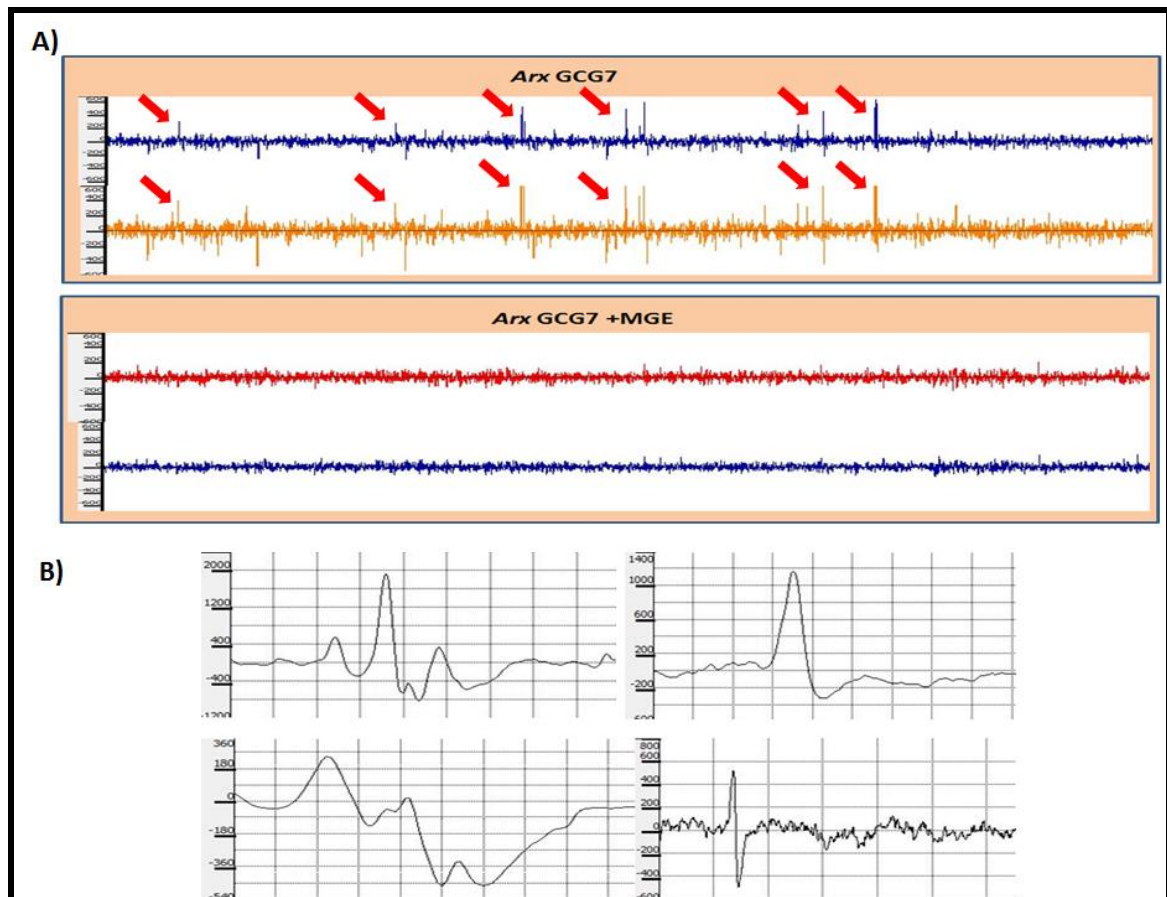


Figura 16: A) Ejemplo de registros EEG en animales mutantes *Arx* sin trasplantes y con trasplantes de MGE. B) Ejemplo de los diferentes tipos de disparos o spikes registrado en los animales *Arx* GCG7

Por otra parte, otros modelos mutantes *Arx*, como los del grupo de Golden [19], han mostrado una alteración en los espectros de ondas Theta , Delta , Beta y Gamma. El análisis de de la transformada de Fourier (FFT) del espectro de ondas en estos mutantes mostró un desplazamiento a la derecha del espectro con una reducción de las ondas Tetha y Delta, y un incremento de las ondas Beta y Gamma, así como variaciones en las frecuencias (Hz) de estas ondas [21]. Dado el fuerte efecto que observamos sobre el número de spikes y clusters, y aunque el modelo no era el mismo, decidimos realizar un análisis de similar del espectro de ondas, ya que no se había realizado nunca previamente en nuestro modelo. Para ello, se procedió a seleccionar al azar diferentes intervalos de tiempo a lo largo de 24 horas en los que los animales se mostraban claramente activos o relajados. Los resultados obtenidos han mostraron resultados en cierta medida similares a los obtenidos por el laboratorio de Golden, donde los animales *Arx* GCG7 no trasplantado

presentaron un espectros de ondas anómalo en la corteza. Obteniéndose en estos animales mutantes *Arx GCG7* en la FFT del espectro de ondas un decremento en la ondas Delta y Theta estadísticamente significativos (Delta: ANOVA $p=0,0013$ y confirmado por el test de Tukey; Theta: ANOVA $p <0.0001$ y confirmado por el test de Tukey) y un incremento en las ondas Beta y Gamma estadísticamente significativo (Beta : ANOVA $p <0,0001$ y confirmado por el test de Tukey; Gamma: ANOVA $p <0.0001$ y confirmado por el test de tukey), lo que supone también un desplazamiento del espectro hacia la derecha, tal como ocurre en el modelo de Golden. Además también se han observado alteraciones en las frecuencias (Hz) de estas ondas, en concreto se ha observado un incremento de las frecuencias en alpha, beta y gamma, que han sido estadísticamente significativo (Alpha: ANOVA $p=0,02$ y confirmado por el test de tukey; beta: ANOVA $p <0,0001$ y confirmado por el test de tukey; gamma: ANOVA $p=0,0014$ y confirmado por el test de tukey). Interesantemente, los animales *Arx GCG7 + MGE* presentaron un espectro de ondas mas similar a los animales WT. No se observó la alteración al realizar la FFT de los espectros de ondas, ni en las frecuencias (Hz) de ondas al compáralo con los controles. Existiendo diferencias significativas entre *Arx GCG7+MGE* y *ArxGCG7* no trasplantados al realizar la FFT del espectro de ondas para la delta, theta , beta y gamma (*t-student*: $p=0,0128$ para delta; $p=0,0016$ para theta; $p=0,0037$ para beta y $p=0,0019$ para gamma), al igual que ocurrió con las frecuencias de ondas de alpha, beta y gamma entre los *Arx GCG7 +MGE* y *Arx GCG7* no trasplantados que mostraron diferencias estadísticamente significativas (*t-student*: $p=0,0428$ para alpha; $p=0,0003$ para beta y $p=0,0164$ para gamma). (Figuras 17-20)

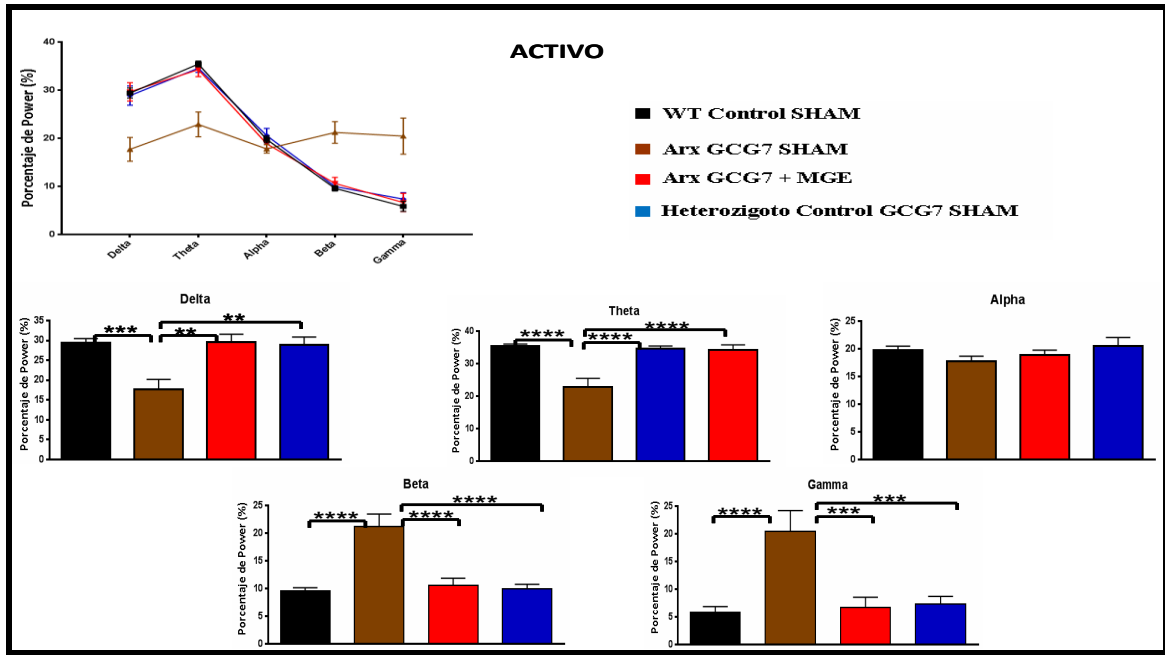


Figura 17: Análisis del espectro de ondas con los animales en activo. One way Anova y datos correlacionados con test de correlación de Tukey. Significancia $\sigma = 0,05$. $p < 0,01$ **; $p > 0,001$ ***; $p < 0,0001$ ****

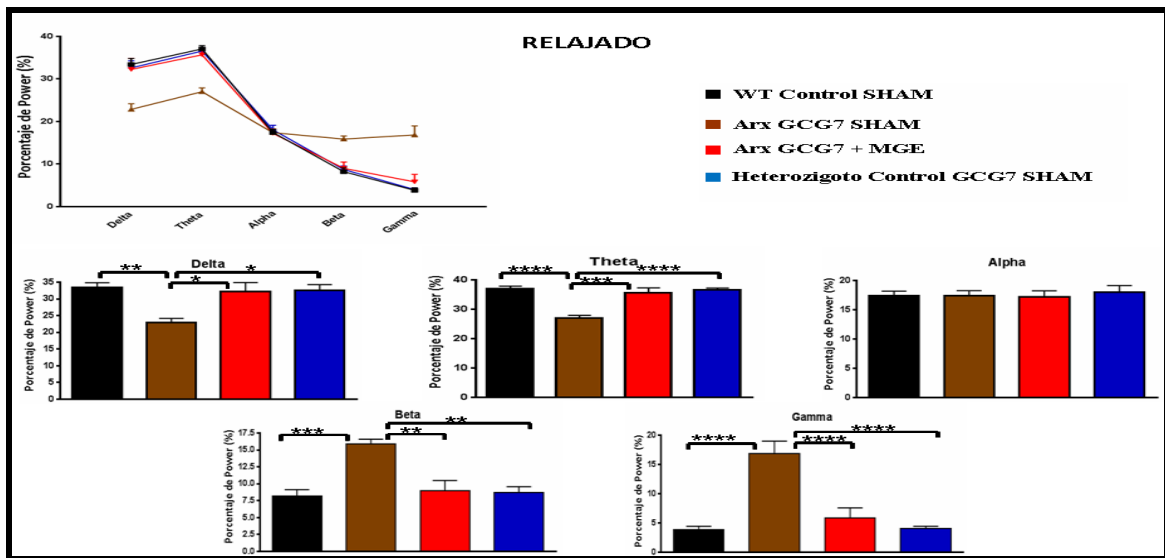


Figura 18: Análisis del espectro de ondas con los animales en relajados. One way Anova y datos correlacionados con test de correlación de Tukey. Significancia $\sigma = 0,05$. $p < 0,01$ **; $p > 0,001$ ***; $p < 0,0001$ ****

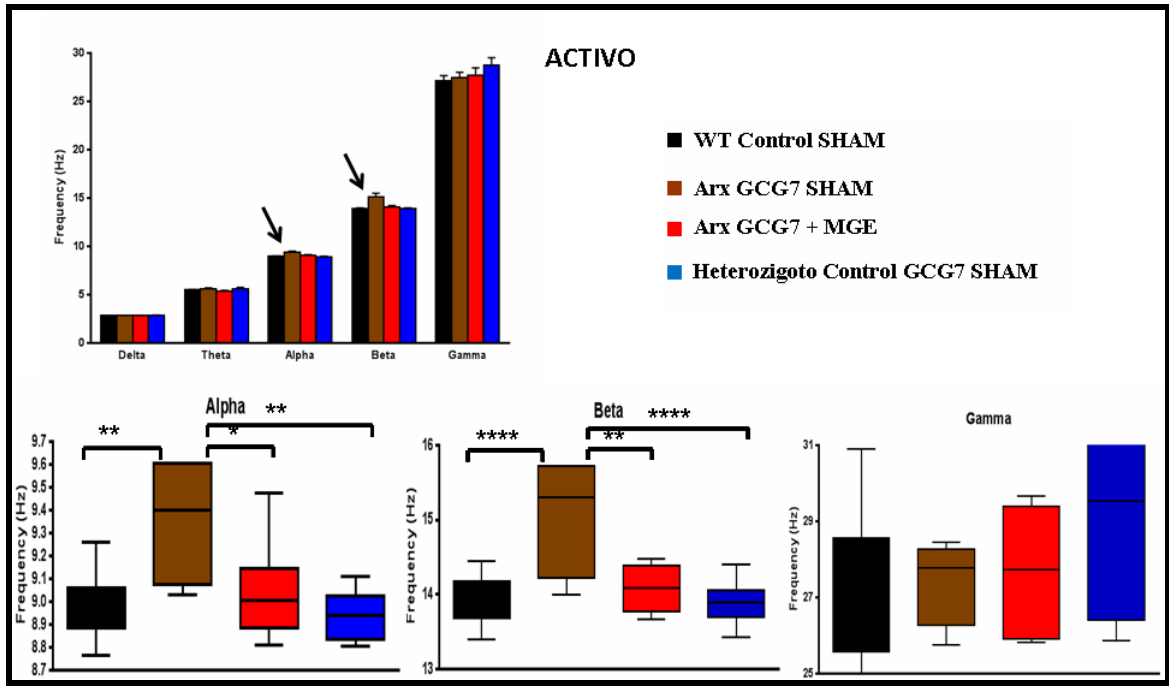


Figura 19: Análisis de las frecuencias (Hz) con los animales en activo. One way Anova y datos correlacionados con test de correlación de Tukey. Significancia $\sigma = 0,05$. $p < 0,01$ **; $p > 0,001$ ***; $p < 0,0001$ ****

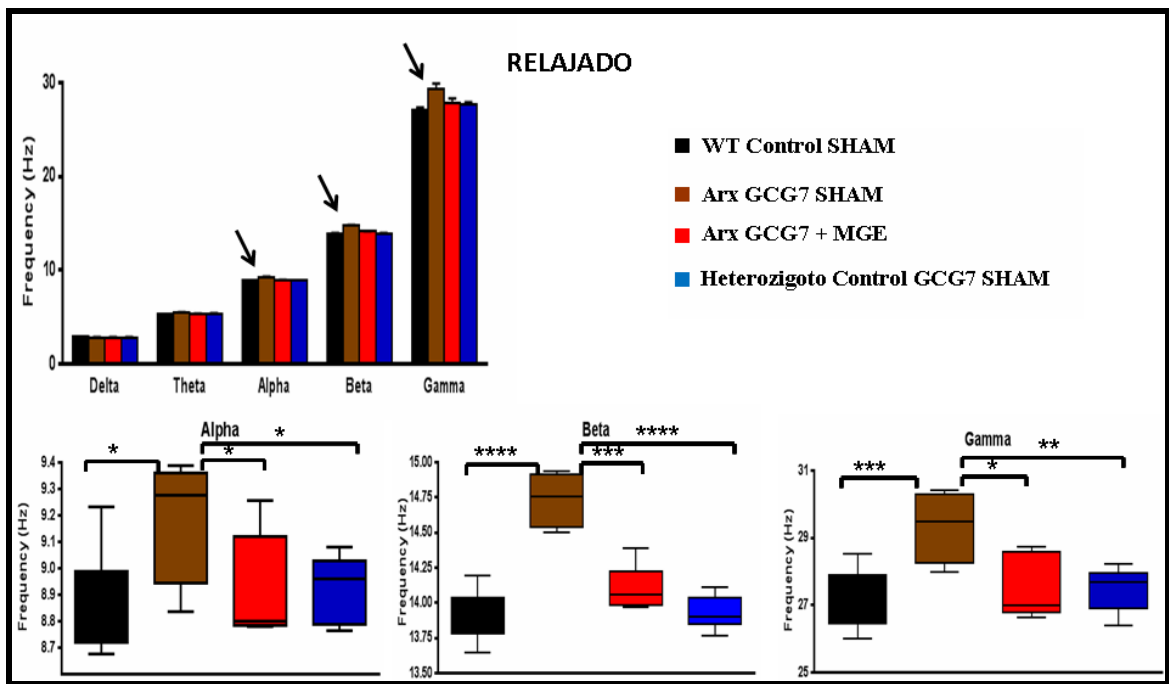


Figura 20: Análisis de las frecuencias (Hz) con los animales relajados. One way Anova y datos correlacionados con test de correlación de Tukey. Significancia $\sigma = 0,05$. $p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p > 0,001$ ***; $p < 0,0001$ ****

Los datos obtenidos del análisis de EEG sugieren fuertemente que las células trasplantadas median un efecto inhibitorio sobre la hiperactividad cerebral, siendo capaces de reducir la actividad epileptiforme. Ello se correlacionó positivamente con los efectos a nivel de comportamiento. Esto indica una plena maduración y diferenciación de las células junto a una integración de las mismas en la circuitería existente del huésped. Para comprobar dicha diferenciación e integración, así como una posible corrección de las alteraciones morfológicas de los mutantes gracias al trasplante se procedió con la siguiente exploración histológica.

1.3 Análisis histopatológico del modelote Síndrome de West después del trasplante de precursores GABAérgicos

Una vez realizadas todas las pruebas de comportamientos y las grabaciones de EEG, los animales fueron sacrificados, coincidiendo con las 4-5 semanas desde su nacimiento.

En primer lugar se procedió a verificar la presencia de las células trasplantadas y cuantificar su supervivencia. Ello se llevó a cabo contando todas las células GFP+ en secciones seriadas y estimando su porcentaje respecto al número total de células que habían sido trasplantadas (Material y Métodos 2.3). Obtuvimos una tasa media de supervivencia celular del $18.22\% \pm 1.22\%$ en los animales wild-types+MGE y del $16.76\% \pm 3.43\%$ en los animales *Arx* GCG7+MGE. Estos datos son comparables a resultados previos publicados por nuestro grupo y otros laboratorios trabajando con este tipo celular [34-36, 86]. Indicar que estas células son estables, siendo capaces de migrar largas distancias, y nunca observamos ningún proceso transformación que derivase en un tumor.

Las células trasplantadas mostraron una amplia distribución en todos los animales trasplantados, a lo largo de la corteza, el hipocampo y el estriado, tanto en ratones mutantes como WT. (Figura 21), lo que indica que un ambiente deficiente en *ARX* no afecta a la propiedad de migración de las células trasplantadas. Además, las células presentan una morfología similar a lo publicado anteriormente en el cerebro de animales neonatos WT [86]. Mostraban una morfología madura, con largas y complejas ramificaciones características de interneuronas. No obstante, dado que las células se diferenciaron en un ambiente defectivo para *Arx* decidimos estudiar más en detalle su morfología, dedicando un apartado en exclusivita a este estudio más adelante.

TABLA 3 Subtipos de Interneuronas	Hipocampo		Corteza		Estriado	
	Wild-Type	Mutantes	Wild-Type	Mutantes	Wild-Type	Mutantes
		Arx (GCG)7		Arx (GCG)7		Arx (GCG)7
GAD67	67.68 ± 1.01%	48.07 ± 5.98%	74.55 ± 4.37%	64.44 ± 6.20%	47.19 ± 5.14%	33.50 ± 7.69%
Parvalbumina (PV)	25.59 ± 2.24%	24.80 ± 4.03%	25.31 ± 5.30%	21.10 ± 2.68%	52.79 ± 6.29%	45.96 ± 3.34%
Somastotatina (SST)	33.66 ± 3.23%	47.85 ± 7.01%	27.48 ± 2.12%	49.30 ± 7.95%	40.28 ± 5.32%	40.48 ± 3.80%
NeuropéptidoY (NpY)	22.79 ± 3.73%	45.06 ± 7.96%	19.18 ± 1.82%	36.73 ± 8.03%	17.1 ± 2.14%	28.14 ± 5.46%
Calbindina (CB)	17.04 ± 1.54%	30.82 ± 3.86%	19.12 ± 2.32%	26.01 ± 3.01 %	35.82 ± 3.93%	35.59 ± 2.50%

Tabla 3: Porcentajes de expresión de los principales marcadores moleculares de interneuronas de las células procedentes de la MGE al trasplantarlas en un modelo del SW y en animales controles (Wild-types).

Para comprobar la adquisición de las propiedades moleculares de interneuronas maduras por parte de las células trasplantadas se realizó una serie de análisis inmunohistoquímicos de marcadores típicos de las diferentes subpoblaciones de interneuronas GABAérgicas. Los marcajes incluyeron GAD67 (Ácido Glutámico Descarboxilasa 67), Parvalbumina (PV), Somastotatina (SST), Neuropéptido Y (NpY) y Calbindina (CB), lo que abarcaría casi el 100% de todas la interneuronas GABAérgicas presentes en la corteza, hipocampo y estriado. La cuantificación del número de células GFP+ procedentes del donante que colocalizaron con los diferentes marcadores empleados se puede ver en la Tabla2. Los resultados en los animales wt control fueron similares a lo publicado previamente por nuestro grupo y otros [34-36, 86]. Sin embargo, encontramos una tendencia al alza en el número de células GFP+ que colocalizaban con SST , NpY y CB, en el caso de los animales mutantes.

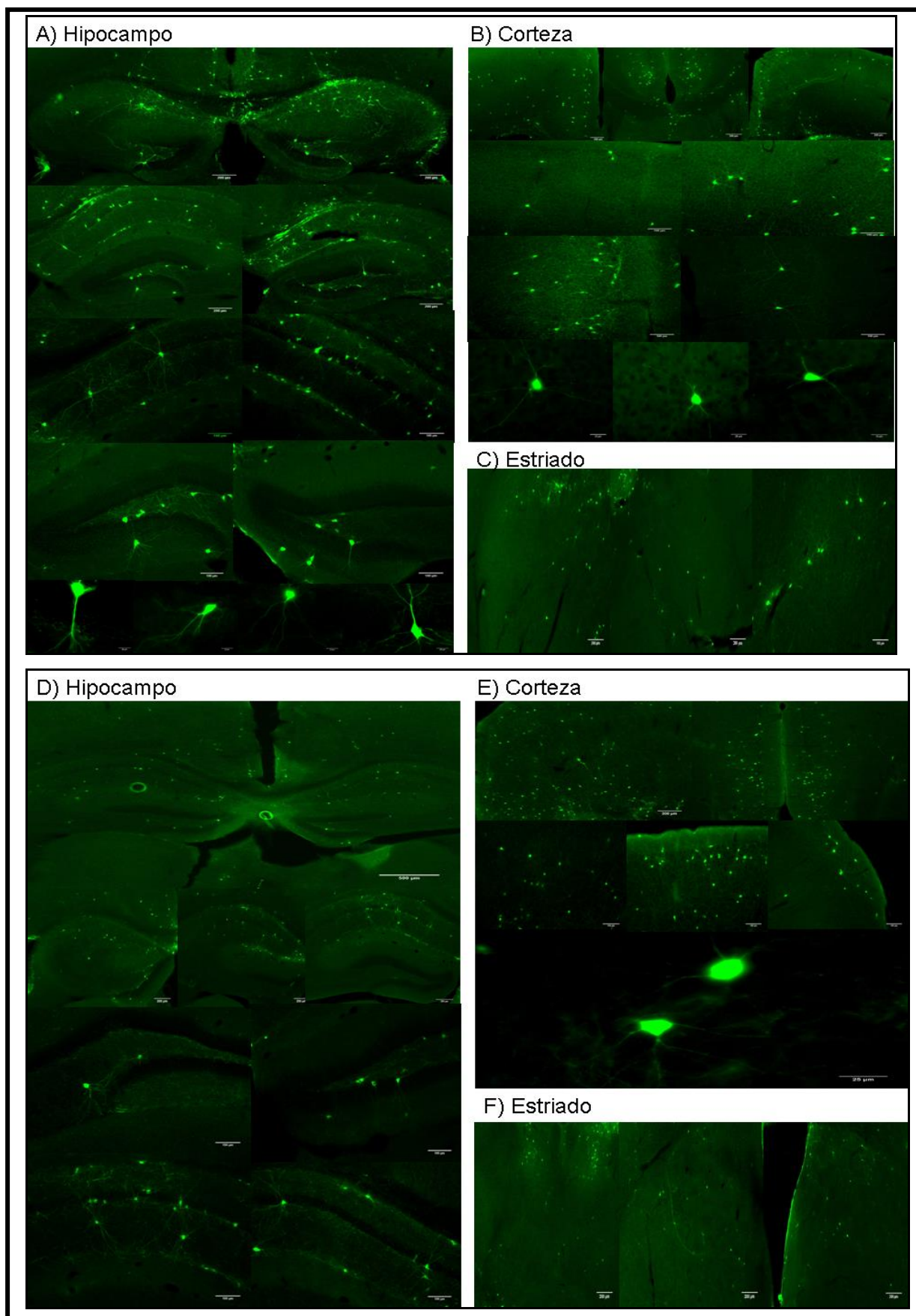


Figura 21: Distribución y diferenciación de las células derivadas de la MGE en los animales *EY* mutantes (A-C) y en los animales controles (*wild-types*) (D-F). Las células GFP positivas provenientes de la MGE. Imágenes de Microscopía de Fluorescencia. . Barra de escala 25 μ m y 100 μ m

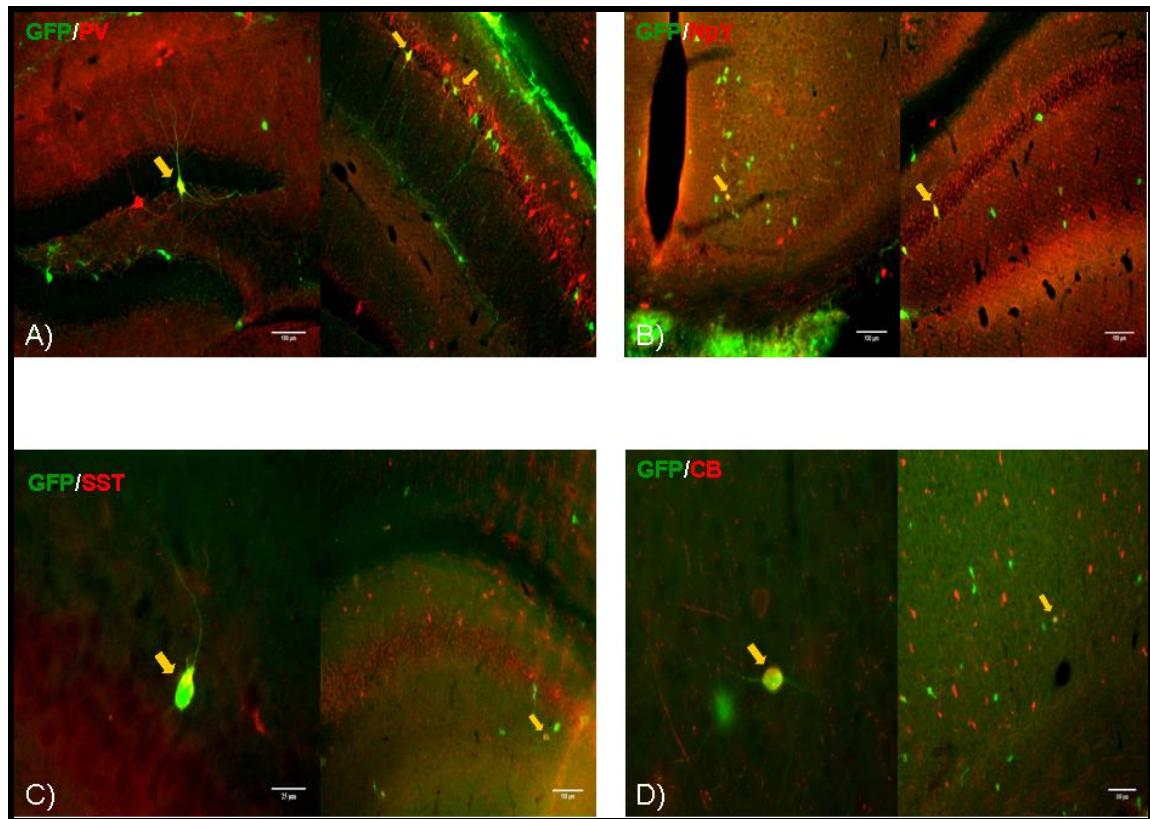


Figura 22: Caracterización molecular de las células derivadas de la MGE en animales *Arx* GCG7 (Síndrome de West) Colocalización inmunohistoquímica de las células GFP positivas provenientes de la MGE con los típicos marcadores de las interneuronas PV (A), NpY (B), SST (C) y CB (D) Las flechas señalan las células doble positivas. Barra de escala 25 μ m y 100 μ m

Estos resultados sugieren que el patrón de crecimiento y diferenciación de los precursores derivados de la MGE hacia interneuronas maduras puede verse afectado bajo un ambiente mutante, ya sea por la deficiencia en *ARX* o bien por la reducción en el número de otras interneuronas que se observa en los ratones *Arx* GCG7

Efectivamente, en el modelo de SW se ha descrito un claro déficit de interneuronas GABAérgicas en áreas de la corteza, hipocampo y estriado, sugiriéndose que se deben a una inhibición tanto de la migración radial de las neuronas GABAérgicas proyectadas desde la eminencia lateral ganglionar (LGE), como de la migración tangencial de las interneuronas GABAérgicas producidas en la MGE. Los animales con la mutación en *Arx* muestran deficiencias en los grupos mayoritarios de interneuronas, como son las positivas para PV y SST; así como cambios en los números totales en otras poblaciones más heterogéneas como son las positivas para NpY y CB. El porcentaje de PV+ totales en el mutante respecto a los WT es de un $81,1 \pm 5,1\%$ en corteza, de $70,6 \pm 7,3 \%$ en el estriado y una reducción en hipocampo que en los resultados obtenidos por el grupo de

kitamura no fue indicado dicho valor. En cuanto a la población SST+ se observó que los porcentajes en corteza e hipocampo eran similares a los animales WT, pero mostraban solo un $52,4 \pm 4,8\%$ de SST+ totales en el estriado, lo que significa casi la mitad de este tipo de interneuronas. También se observó reducción de NpY, siendo una reducción del $52,4 \pm 6,2\%$ en el estriado, y una ligera reducción en la corteza, así como un aumento mas leve pero generalizado de la CB en estos animales; mientras que la población de CR permaneció igual en los mutantes [22].

Dadas las fuertes anomalías en diferentes poblaciones de interneuronas que presentan los animales *Arx* GCG7, analizamos como podían influir los trasplantes de precursores GABAérgico en el número total de interneuronas y si nuestra hipótesis de que son capaces de sustituir un déficit de estas era correcta. Para ello, se realizaron, como se ha comentado con anterioridad, una serie de estudios inmunohistoquímicos y una vez comprobado que las células procedentes de la MGE son capaces de diferenciarse a los hacia los distintos marcadores, cuantificamos la contribución al número total de células que constituyen las diferentes poblaciones de interneuronas.

Se realizó un primer marcaje con un anticuerpo contra GAD67, la enzima Ácido Glutámico Descarboxilasa responsable de la síntesis de GABA. El marcaje nos dio una idea de cual era el número total de interneuronas GABAérgicas en los animales, ya que es un marcador generalizado de casi todas ellas. Observamos que los animales *Arx* GCG7 no trasplantados mostraban una pérdida en el total de interneuronas marcadas con GAD67, de modo que en el hipocampo fue de un $68,57 \pm 4,55\%$ y de un $68,17, \pm 3,43\%$ en el estriado respecto a los animales WT, mientras que los valores obtenidos en la corteza fueron similares ($99,12 \pm 1,77\%$). Como era esperable, se observó que en los animales *Arx* GCG7+MGE se producía un aumento en la densidad total de interneuronas marcadas con GAD67, llegando a valores de un $77,51 \pm 4.20\%$ en el hipocampo y de un $75,40 \pm 6,64\%$ en el estriado respecto al WT; lo que supone una mejora en el déficit de interneuronas GABAérgicas de entorno a un 7%. (Figura 23). No obstante, este aumento esta alejado de los valores totales en los animales WT y este incremento no fue estadísticamente significativo.

Por otra parte, la cuantificación del porcentaje de interneuronas dobles positivas para GFP y GAD67 respecto al total de interneuronas GAD67 en los animales *Arx* GCG7+MGE dio una valores que oscilaron entre los $4,67 \pm 1,92\%$ de interneuronas

dobles positivas/total de interneuronas GAD67 en la corteza, el $9,78 \pm 5,91$ % en el hipocampo, y los $13,44 \pm 3,44$ % en el estriado.

En los animales WT+MGE los valores porcentuales de dobles positivas para GFP y GAD67 respecto al total de GAD67 oscilaron entre $3,5 \pm 1,00$ % de interneuronas dobles positivas/total de interneuronas GAD67 en la corteza, $3,42 \pm 2,78$ % en el hipocampo, y los $7,34 \pm 3,99$ % en el estriado, siendo estos porcentajes casi la mitad en los casos de hipocampo y corteza al compararlo con los obtenidos en los Arx GCG7+MGE

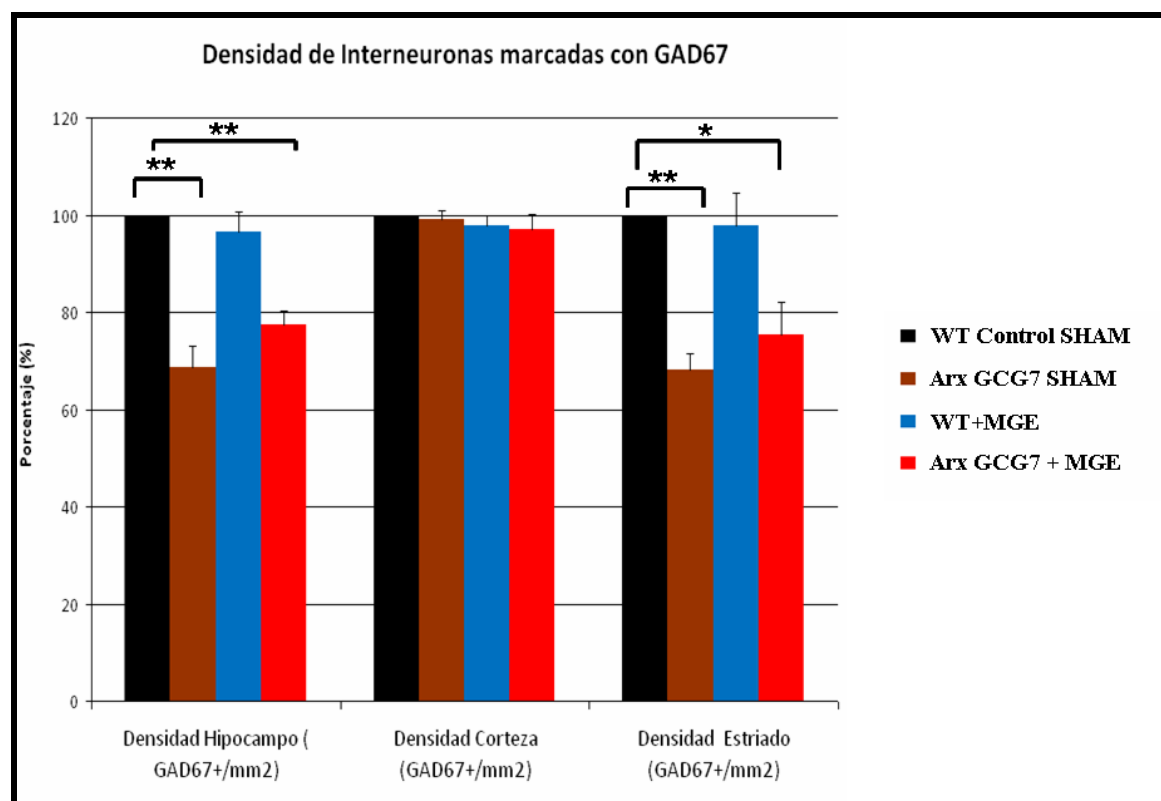


Figura 23: Densidad de Interneuronas GABAérgicas respecto al Wild-type . Observamos diferencias significativas en el hipocampo y en el estriado, tanto en los animales mutantes no trasplantados como los trasplantado, respecto a los controles NT. En hipocampo, t-student de una cola Arx GCG7 SHAM $p=0,002$ ** y Arx GCG7+MGE $p=0,001$ **; en el estriado, t-student de una cola Arx GCG7 SHAM $p=0,04$ * y Arx GCG7+MGE $p=0,03$ *. El Test ANOVA de un factor, Arx GCG7 SHAM respecto a los controles tanto NT como trasplantado en el hipocampo $F[4,46]=15,77$ $p=0,002$; y los Arx GCG7+MGE $F[4,46]=15,77$ $p=0,002$ $F[4,46]=20,68$ $p=0,0007$. En el estriado el anova de un factor, Arx GCG7 SHAM respecto a los controles (NT y Trasplantados) $F[4,46]=12,46$ $p=0,003$; y los Arx GCG7+MGE $F[4,46]=4,89$ $p=0,04$.

El resultado obtenido del estudio de expresión de GAD67 sugería que con el trasplante podíamos estar incrementando alguna de las subpoblaciones de interneuronas GABAérgicas. Por ello, pasamos a estudiar cada uno de aquellos subtipos en donde el modelo animal de SW ha mostrado tener diferencias con los animales WT. Así, se

analizó mediante estudios inmunohistoquímicos con las poblaciones positivas para PV, SST, NpY y CB.

En el caso de la población de PV, y como se indicó anteriormente, los animales *Arx GCG7* muestran un déficit de alrededor del $81,1 \pm 5,1\%$ en corteza, del $70,6 \pm 7,3\%$ en el estriado y una reducción en hipocampo en los animales *Arx GCG7* [20, 22]. Nuestros resultados mostraron la existencia de dicho déficit en los animales *Arx GCG7*. En concreto, encontramos que la densidad de PV+ en hipocampo y estriado era menor respecto al wild-type, un $65,65 \pm 7,01\%$ en hipocampo y hasta de un $62,40 \pm 3,7\%$ en el estriado. Mientras que, por el contrario, en la corteza no encontramos diferencias en los animales *Arx GCG7*.

En cuanto a los animales trasplantados, tanto WT como *Arx GCG7* se observó un aumento en la densidad de PV+. En concreto, los animales *Arx GCG7+MGE* presentaron una densidad de PV respecto al WT, alcanzando valores del $74,42 \pm 16,70\%$ en el hipocampo, que supuso una mejora en el déficit de PV de entorno a un 10% respecto al animal mutante, si bien este incremento no fue estadísticamente significativo; habiéndose obtenido además un porcentaje de dobles positivas GFP-PV respecto al total de PV de un $11,27 \pm 2,1\%$ de células GFP-PV+/total de PV en *Arx GCG7+MGE*. En la corteza, la densidad de PV respecto al WT, como era esperable, no fue muy diferente al control, con un $95,91 \pm 5,87\%$ respecto a él, y con un $1,48 \pm 0,21\%$ de células GFP-PV+ frente al total de PV en los *Arx GCG7+MGE*. Sin embargo, de forma muy llamativa, en el estriado la densidad de PV respecto al WT fue de un $106,25 \pm 17,20\%$, un incremento del 40% que fue estadísticamente significativo y que permitió alcanzar los valores de un animal WT. El porcentaje de células GFP-PV+ fue de un $21,03 \pm 2,42\%$ frente al total de PV en el estriado en los *Arx GCG7+MGE*. Ello supone una clara recuperación del déficit de PV que presentan los animales *Arx GCG7*, lo que se correlacionó con los porcentajes de dobles positivas GFP-PV de los animales *Arx GCG7+MGE*.(Figura 24)

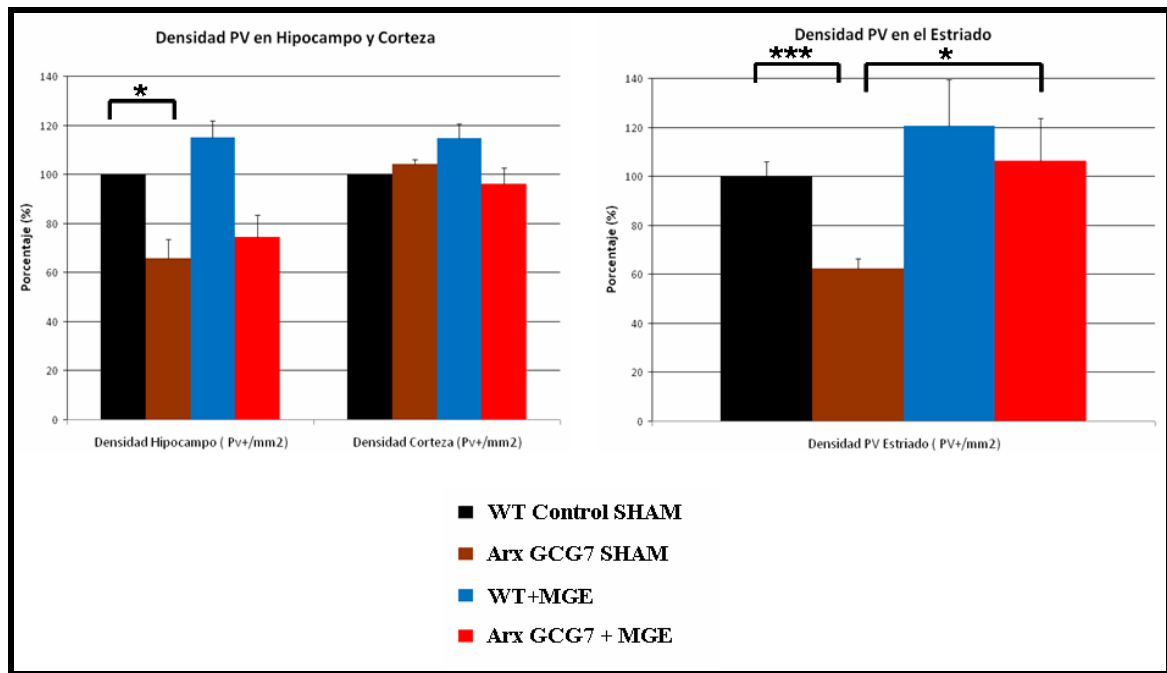


Figura 24: Densidad Parvalbumina en el hipocampo, la corteza y el Estriado respecto al Wild-type. Se observa diferencias significativa en la densidad de PV en los animales Arx GCG7 SHAM en el hipocampo y estriado, dándonos en la prueba t-student $p=0,02$ * en el hipocampo y $p= 0,0003$ *** en el estriado. Los animales Arx GCG7+MGE no muestran diferencias significativas, $p=0,07$ en el hipocampo y $p= 0,74$ en el estriado, mostrando en el estriado diferencias significativas entre el Arx GCG7 SHAM y el Arx GCG7 +MGE $p= 0,04$ *. El análisis de las varianza, ANOVA de un factor, mostraron diferencias en hipocampo entre los Arx GCG7 SHAM y los WT SHAM y trasplantados $F[3,74]=9,64$ $p=0,002$, y entre los Arx GCG7 +MGE vs WT (NT y trasplantados) debido al aumento en densidad en WT trasplantado $F[3,74]=5,83$ $p=0,01$. En el estriado en análisis ANOVA mostró entre Arx GCG7 SHAM y WT (NT y trasplantados) diferencias significativas $F[3,81]=6,94$ $p=0,009$; y no significativo entre los Arx GCG7 +MGE y WT (NT y trasplantados) $F[3,81]=0,56$ $p=0,58$.

Otro de los subtipos de interneuronas analizados fue la población positiva para SST donde, según el grupo de Kitamura, se observó una disminución cercana al 50 % de interneuronas en el estriado. Nuestros resultados corroboraron estos datos, observando en los animales Arx GCG7 una densidad de SST en el estriado de un $58,31 \pm 2,92\%$ respecto al grupo WT. Por otra parte, también observamos una disminución en la población de SST en el hipocampo, obteniendo una densidad del $78,88 \pm 7,47 \%$ en el hipocampo respecto a los WT, mientras que se mantuvieron en valores similares a los del grupo control en la corteza. En cuanto a los animales Arx GCG7+MGE observamos que se producía un aumento de la densidad de SST en el hipocampo, pasando a ser de un $110,17 \pm 8,93 \%$ en el hipocampo respecto al control WT, lo que supone una mejora en el déficit de SST de más de un 20% respecto a los animales Arx GCG7, incremento que fue estadísticamente significativo. El porcentaje de dobles positivas GFP-SST respecto al

total de SST fue de un $16,72 \pm 3,42$ % GFP-SST+/ total de SST+ en el hipocampo. En la corteza, la densidad que obtuvimos en los *Arx* GCG7+MGE fue similar a la obtenida en los WT, en concreto de un $109,21 \pm 3,91$ %, como era de esperar, con un porcentaje de dobles positivas GFP-SST respecto al total de SST de un $10,39 \pm 2,70$ % de células GFP-SST+/total de SST+ en la corteza. En cuanto al estriado, la densidad de los animales *Arx* GCG7+MGE fue de un $89,48 \pm 8,1$ %, lo que supuso una mejora de un 30% respecto a los animales *Arx* GCG7 no trasplantado, incremento que fue estadísticamente significativo, casi alcanzando los valores de un animal WT y sin diferencias estadísticamente significativas entre estos grupos. El porcentaje de dobles positivas GFP-SST respecto al total de SST fue de un $15,48 \pm 4,05$ % en el estriado (Figura 25). Estos resultados muestran una recuperación del déficit de SST que presentan los animales *Arx* GCG7 no trasplantados en el hipocampo y en el estriado.

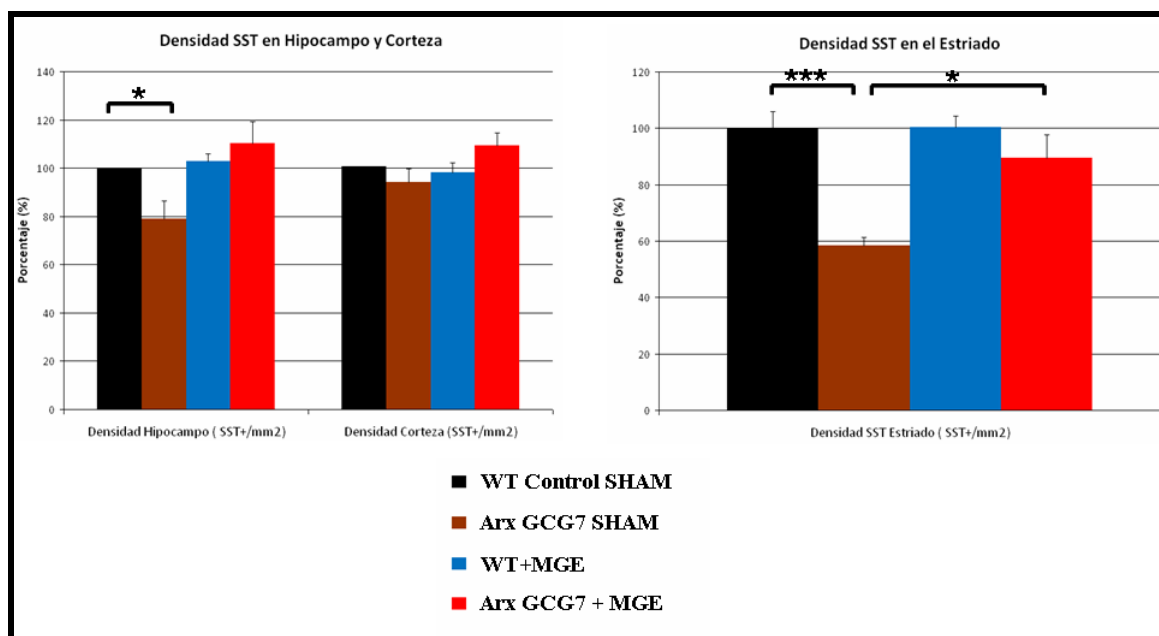


Figura 25: Densidad Somastotatinas en el hipocampo, la corteza y el Estriado respecto al Wild-type. Se observa diferencias significativas en la densidad de PV en los animales *Arx* GCG7 SHAM en el estriado, dándonos en la prueba t-student de dos colas $p=0,0004^{***}$ en el estriado. Los animales *Arx* GCG7+MGE no muestran diferencias significativas $p=0,34$ en el estriado, mostrando en el estriado diferencias significativas entre el *Arx* GCG7 SHAM y el *Arx* GCG7+MGE $p=0,02^*$. En el estriado en análisis ANOVA mostró entre *Arx* GCG7 SHAM y WT (NT y trasplantados) diferencias significativas $F[3,74]=28,67$ $p=0,00001$, y entre los *Arx* GCG7+MGE vs WT (NT y trasplantados) no mostraron diferencias significativas $F[3,88]=0,91$ $p=0,43$.

En el hipocampo y la corteza no se observaron diferencias significativas al realizar la t-student, excepto entre los *Arx* GCG7 SHAM y los *Arx* GCG7+MGE, $p=0,03$. El análisis de varianza de un factor (ANOVA) no mostró diferencias significativas entre los grupo, ni en hipocampo ni en corteza. Anova en Hipocampo entre *Arx* GCG7 SHAM y WT (NT y trasplantados) $F[3,68]=3,26$ $p=0,07$; entre los *Arx* GCG7+MGE y WT (NT y trasplantados) $F[3,74]=0,45$ $p=0,69$. Anova en la corteza, entre *Arx* GCG7 SHAM y WT (NT y trasplantados) $F[3,68]=0,43$ $p=0,66$; entre los *Arx* GCG7+MGE y WT (NT y trasplantados) $F[3,74]=1,25$ $p=0,32$

Los dos últimos marcadores analizados en estos animales fueron el Neuropéptido Y (NpY) y la Calbindina (CB)

Es bien conocido que el Neuropéptido Y (NpY) durante los procesos epileptogénicos aumenta su expresión, de forma que está muy implicado en los procesos y remodelación que tienen lugar en el cerebro [106, 107]. En los animales mutantes para el SW, según lo publicado por el grupo de Kitamura, se produce un descenso en el número de células positivas para NpY. En concreto, se produce una pérdida de aproximadamente el 50 % en el estriado y una ligera disminución en la corteza y el hipocampo,. Sin embargo, la pérdida en el número de células va acompañada de un aumento en la expresión en las fibras musgosas del giro dentado. Los animales *Arx GCG7* que analizamos recapitulamos estas alteraciones en NpY. En concreto, mostraron una densidad de NpY respecto a los WT del $63,53 \pm 5,3$ % en el estriado, del $55,81 \pm 2,34$ % en el hipocampo y del $76,06 \pm 10,21$ % en la corteza. Interesantemente, al analizar la densidad de NpY respecto a los WT en los animales EY mutantes trasplantados con los precursores GABAérgicos obtuvimos una clara recuperación de este déficit. La densidad de las células positivas para NpY en el estriado paso a ser un $81,52 \pm 7,43$ %, de un $110,89 \pm 8,56$ % en el hipocampo y de un $98,58 \pm 5,79$ % en la corteza. (Figura 26), con lo que casi se alcanzan los valores de los animales control WT. Ello supone un incremento de aproximadamente un 50 % en el hipocampo, de un 25 % en la corteza y de un 20% en el estriado respecto a los *Arx GCG7* no trasplantado, incrementos que fueron todos ellos estadísticamente significativos.

Este resultado se correlaciona con el porcentaje de dobles positivas GFP-NpY+ que se encuentran en los animales trasplantados, siendo en hipocampo del $16,72 \pm 3,27$ %; en la corteza de $7,51 \pm 1,12$ %; y en el estriado de un $21,41 \pm 4,34$ %.

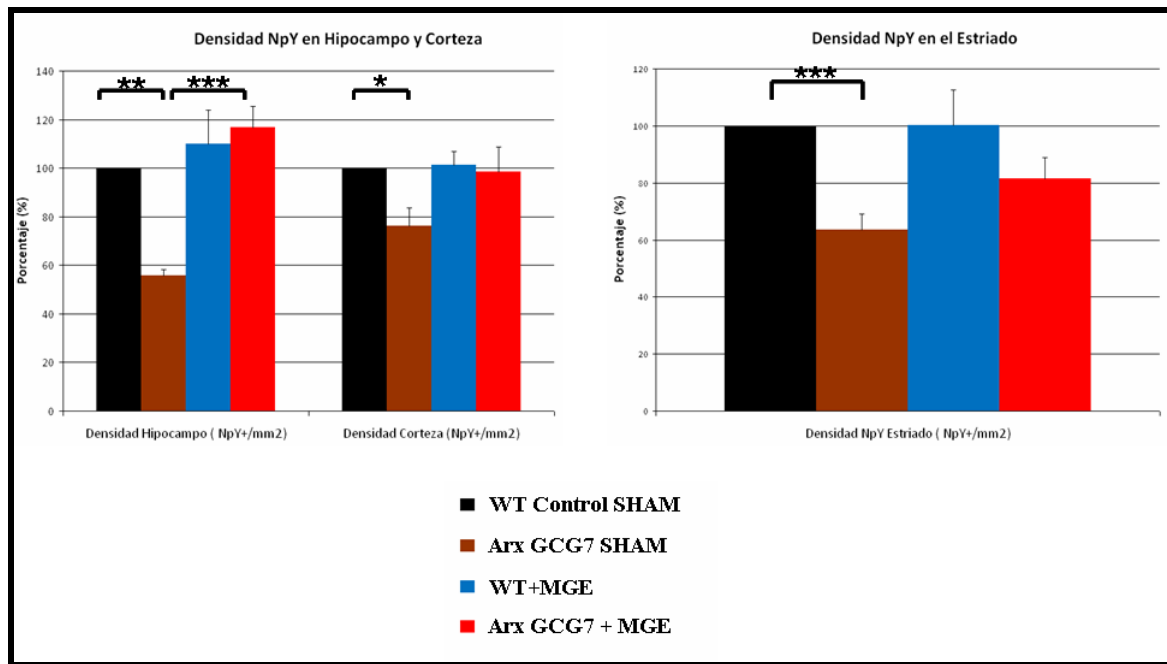


Figura 26: Densidad Neuropéptido Y en el hipocampo, la corteza y el estriado respecto al Wild-type. Se observaron diferencias significativas de densidad en las tres zonas en los animales Arx GCG7 SHAM respecto al WT; dándonos para la t-student de dos colas unas probabilidades respectivamente de $p=0,012^{**}$, $p=0,025^*$, $p=0,0009^{***}$ Mostrando Arx GCG7+MGE diferencias significativas en el hipocampo respecto a los Arx GCG7 SHAM, $p=0,0009^{***}$

El análisis de varianza de un factor (ANOVA) mostró diferencias significativas entre los animales Arx GCG7 SHAM y los WT (NT y trasplantados) tanto en hipocampo, corteza como en el estriado; $F[3,68]=7,54$ $p=0,005$ (hipocampo), $F[3,63]=5,35$ $p=0,02$ (corteza), $F[3,88]=8,53$ $p=0,005$ (estriado). El anova entre los animales Arx GCG7+MGE y los WT (NT y Trasplantados) no mostraron diferencias; $F[3,74]=0,50$ $p=0,68$ (hipocampo), $F[3,74]=0,034$ $p=0,97$ (corteza), $F[3,98]=1,69$ $p=0,23$ (estriado).

Por último, se analizó la densidad para la población de CB en donde, según el grupo de Kitamura, se produce cierta tendencia al aumento en la corteza. Nuestros resultados corroboraron estos datos, observándose un aumento de la densidad de CB respecto al WT en los animales Arx GCG7 no trasplantados. En concreto, en el hipocampo se observó una densidad del $107,32 \pm 6,81\%$ respecto al WT, mientras que en la corteza no se observó ningún incremento, con una densidad prácticamente igual al WT ($100,13 \pm 2,73\%$). Así mismo, en el estriado observamos una densidad de un $118,18 \pm 7,04\%$, aunque ninguno de estos incrementos, incluido en el del estriado que fue más pronunciado, resultaron ser estadísticamente significativos. En cuanto a los animales Arx GCG7+MGE observamos cómo esas tendencias de aumento en la densidad de CB se mantuvieron, en el caso del hipocampo se observó una densidad del $109,26 \pm 7,53$, que en la corteza fue de un $106,13 \pm 5,90\%$, y del $112,47 \pm 12,57\%$ en el estriado. Estas variaciones no fueron estadísticamente significativas.

Por otra parte, el porcentaje de células dobles positivas GFP-CB respecto al total de CB fue de un $12,09 \pm 1,6\%$ en los animales *Arx* GCG7+MGE en el hipocampo., mientras que en la corteza, fue de un $1,41 \pm 0,29 \%$, y de un $4,31 \pm 0,87 \%$ de células GFP-CB+/total de CB en los animales *Arx* GCG7+MGE en el estriado. (Figura 27)

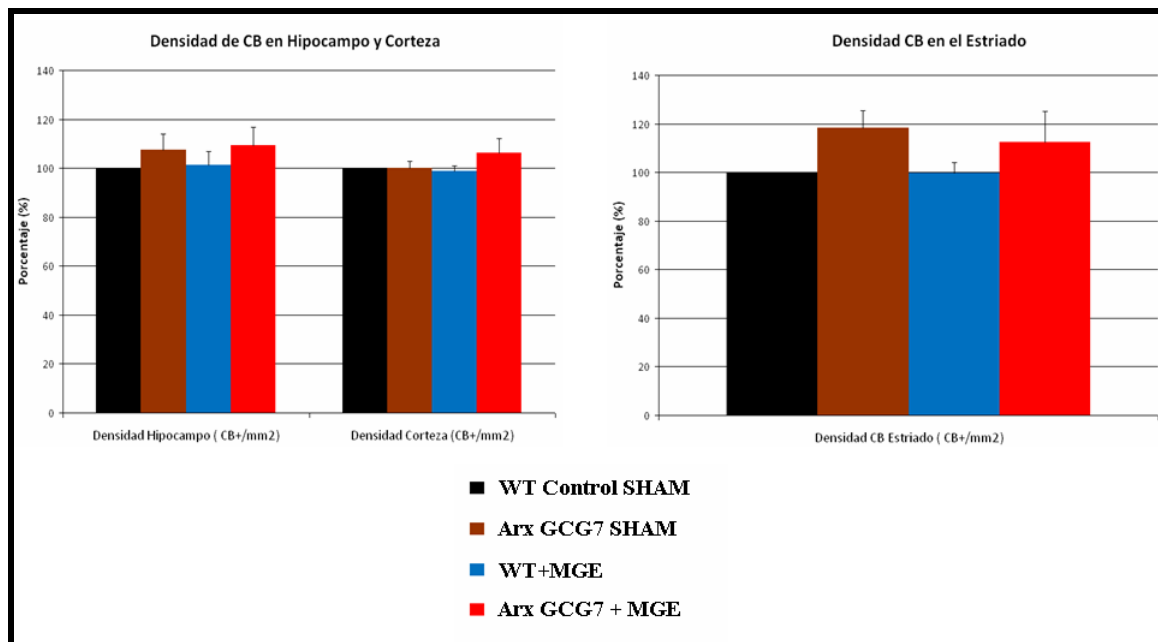


Figura 27: Densidad de Calbindina en Hipocampo, Corteza y Estriado respecto al Wild-type. No mostraron diferencias significativas entre los diferentes grupos, ni en el t-student de dos colas, ni en el análisis de la varianza (ANOVA).

En su conjunto, estos resultados nos indican que las células trasplantadas son capaces de reducir parcialmente el déficit en el número de interneuronas que padecen los animales *Arx* GCG7. Ello sugiere que, pese a la existencia de alteraciones inherentes en un modelo genético desde el mismo momento en que se trasplantan las células, como es el caso que estudiamos, las células pueden diferenciarse correctamente, aunque podrían variar la expresión de alguno de sus marcadores y los porcentajes de las poblaciones finales de cada subtipo verse modificados.

Una vez realizada la caracterización histopatológica, tanto de los animales *Arx* GCG7 SHAM como de los animales *Arx* GCG7+MGE, se puso de manifiesto que existían diferencias en el número de células que constituyen las poblaciones de interneuronas. Así mismo, nos percatamos que podrían existir diferencias de expresión de los marcadores moleculares en las células trasplantadas respecto a las células endógenas, tanto en los animales WT trasplantados como en los animales *Arx* GCG7+MGE. Además, quisimos analizar la morfología de las células trasplantadas en un animal *Arx* GCG7 respecto a las

trasplantadas en un animal WT, lo que describiremos más adelante, ya que el ambiente mutante podría influir en este aspecto.

Para comprobar si las células trasplantadas mantenían los niveles de expresión de los diferentes marcadores estudiados se realizó un estudio de inmunoreactividad (IR) en el soma de las células trasplantadas, centrándonos en la región de la corteza cerebral somatosensorial.

Primeramente empezamos por el estudio de la IR en la corteza somatosensorial, midiendo en diferentes zonas de esta y en secciones diferentes de cada uno de los animales los niveles de expresión (Material y Métodos 6b).

El análisis de la IR en los somas mostró como las células trasplantadas tenía IR en sus somas en parte compensatorio con respecto a las endógenas y en algunos casos por debajo de la IR de las propias endógenas como son los caso de las células trasplantadas en los WT.

En el caso concreto de las células trasplantadas en un animal *Arx* GCG7 se observo como tanto en PV ,SST y NpY se mantenían por debajo de la endógenas al igual que ocurre en el WT, a excepción de la CB que aumento su expresión, pero cuyo resultado no fue estadísticamente significativo. En este punto hay que destacar como existía un aumento considerable de expresión de NpY que como se dijo anteriormente el NpY durante los procesos epileptogénicos aumenta su expresión, de forma que está muy implicado en los procesos y remodelación que tienen lugar en el cerebro.[106, 107], aunque se produzca una bajada en el número de células positivas para NpY.(Figura 28) De modo que parece que existe una modulación de la expresión de los diferentes marcadores moleculares en las células trasplantadas.

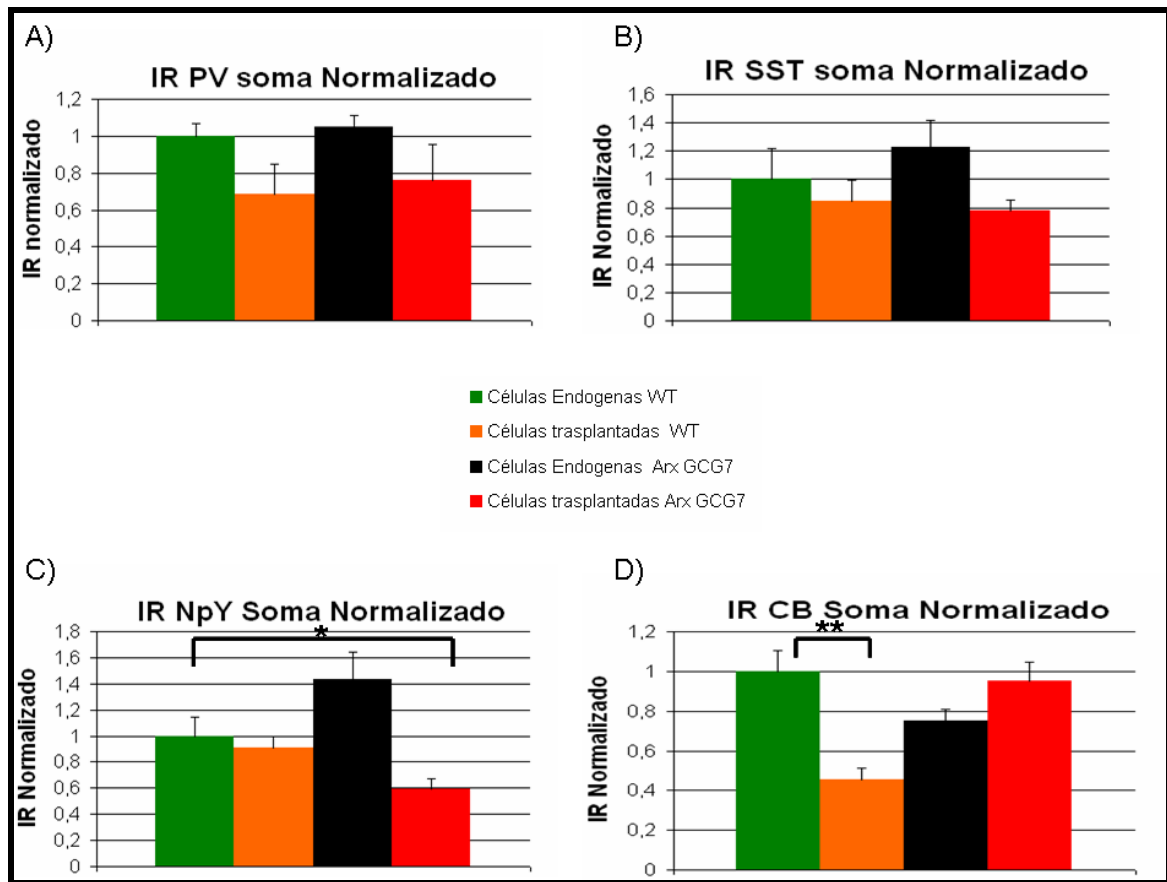


Figura 28 : Estudio de Inmunoreactividad de marcadores neuronales en los somas de interneuronas corticales. A) Inmunoreactividad de Parvalbumina, B) Inmunoreactividad de Somatostatinas, C) Inmunoreactividad del Neuropeptido Y, D) Inmunoreactividad de la Calbindina.. Test realizado t-student de dos colas, $\sigma=0,05$. Todos los valores $p>0,05$ ($p=0,52$) $.p<0,05^*$ y $p<0,01^{**}$

1.4 Análisis de morfología de las células trasplantadas.

Tras analizar los distintos marcadores y observar que las células trasplantadas son capaces de revertir el déficit de los distintos subtipos de interneuronas, nos preguntamos si en la morfología de la células diferenciadas en un animal wild-type y en un animal mutantes existían diferencias en su arborización dendrítica debido al ambiente mutante. Observando las imágenes de microscopía de fluorescencia realizadas y mostradas en la sección 1.3 de resultados (Figura 21), las células tal como ya se dijo muestran morfología madura, mostrando largas y complejas ramificaciones características de interneuronas. De modo que para verificarlo se realizó un análisis de Sholl (Sholl, 1953)[108], el cual es un método por el que a través de la realización de círculos concéntricos que parten desde el soma hasta el final de la arborización se cuantifica el números de intersecciones que se producen entre los círculos y las dendritas. Se puede estudiar diferentes propiedades dendríticas de las neuronas, tanto la geometría de las dendritas, como la riqueza en ramificaciones, y los patrones de arborización; dándonos un

estudio morfológico completo de una neurona. Se estudiaron diferentes parámetros que nos describen las características morfológicas mencionadas anteriormente, centrándonos en las interneuronas que expresan PV por razones técnicas. Estudiamos el área bajo la curva de la representación del número de intersecciones N versus el radio (r, μm), que nos da una aproximación de cuanto ocupa la arborización dendríticas; Valor Crítico (Rc), distancia donde se produce el máximo de intersecciones; Valor medio de la función (Nav) como número medio de intersecciones a lo largo de la función; Nm, densidad máxima de intersecciones en función del Rc; Índice de Ramificaciones de Shoenen (RI), que es el ratio entre Nm y el número de ramas primarias; Nr, que representa la distancia que hay desde el soma hasta el último círculo concéntrico; y el Coeficiente de Regresión de Sholl (k), que mide el ratio de caída del número de ramificaciones con el aumento de distancia al soma.

Todos estos valores fueron analizados en los animales trasplantados, tanto controles como mutantes, no encontrándose diferencias significativas entre las células trasplantadas en un wild-type con las trasplantadas en los mutantes. (Figura 29 Y TABLA 4). Estos resultados nos sugieren que las células derivadas de los trasplantes de precursores de la MGE adquieren de forma normal una morfología de interneuronas, independientemente del ambiente genético en el que se encuentren.

TABLA 4 <i>Análisis de Sholl</i>	Área bajo la curva (μm^2)	RI	Rc (μm)	Nav	Nm	Nr (μm)	k(μm)
WT+MGE	2281,25 $\pm 126,63$	14,14 $\pm 1,46$	109,34 $\pm 12,21$	12,45 $\pm 1,44$	21,01 $\pm 2,37$	183,19 $\pm 12,95$	-0,053 $\pm 0,002$
Arx GCG7 +MGE	1782,94 $\pm 329,79$	17,17 \pm 2,62	105,45 $\pm 12,02$	9,71 $\pm 0,63$	16,54 $\pm 1,02$	188,30 $\pm 11,27$	-0,052 $\pm 0,001$

Tabla 4 : Análisis de morfología de las células trasplantadas mediante Sholl

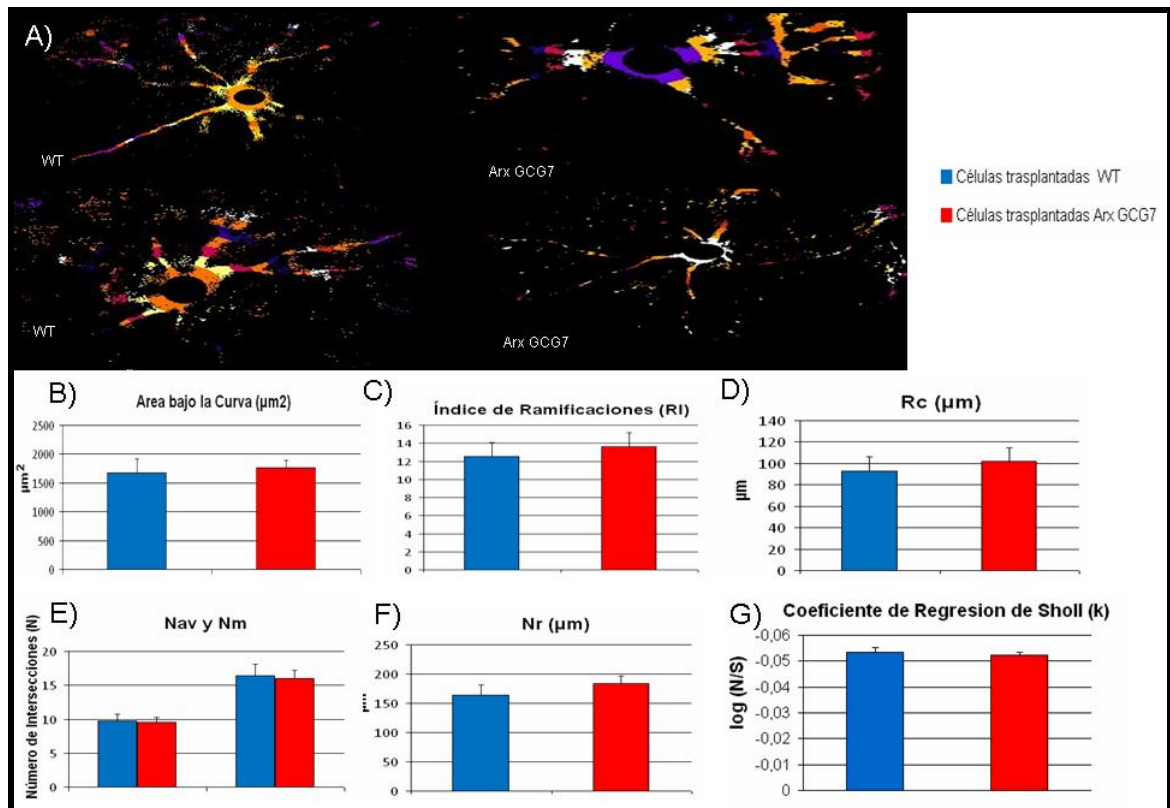


Figura 29: A) Ejemplo de Análisis de Sholl, en diferentes interneuronas. B-G) Parámetros morfológicos analizados mediante Sholl, que nos muestran diferencias significativas (t-student de dos colas) entre interneuronas trasplantadas en animales WT (n=21) e interneuronas traslantadas en animales EY mutantes (n=27) Test realizado t-student de una cola, $\sigma=0,05$. Todos los valores $p>0,05$.

2. Efectos de trasplantes Efectos de trasplante de precursores GABAérgicos derivados de la MGE en un Modelo animal con déficit en *Lhx6*.

Con el fin de analizar la capacidad de los trasplantes de precursores GABAérgicos procedentes de la MGE, en otros ambientes genéticos, y su efecto morfológico, fisiológico y psicomotor en una nueva patología de encefalopatía epiléptica, se usó un modelo animal que tiene afectado el factor de transcripción *Lhx6*, que es clave para que produzca una correcta migración y especificidad de los diferentes subtipos de interneuronas corticales. Usamos modelos animales desarrollados en el laboratorio de V. Pachniss.[25] Estos animales son hipomórficos para *Lhx6*, mostrando déficit de Interneuronas GABAérgicas corticales.

Para ello, al igual que se realizó en el modelo de SW, se realizaron trasplantes tanto en animales portadores de la mutación, como en animales sin ella (wild-types) y, asimismo, se establecieron dos grupos experimentales sin trasplante de animales mutantes (mutantes controles) y animales controles (Wild-types) a los cuales se les sometió al mismo procedimiento quirúrgico inyectándoles un volumen similar de vehículo.

2.1 Evaluación del comportamiento en modelo hipomórfico para *Lhx6*.

Antes de realizar los trasplantes, y puesto que en estos animales no estaban descritos a nivel psicomotor, realizamos una serie de pruebas de comportamiento que nos permitió evaluar si los animales con bajos niveles de expresión en *Lhx6* muestran alteraciones de comportamientos.

Los estudios realizados mostraron que estos animales hipomórficos no sufrían alteraciones motoras inherentes a la mutación, así como no mostraban síntomas de hiperactividad ni ansiedad. (Figuras 30-33)

La primera prueba que se realizó fue el Rotarod. Al igual que en el modelo de SW, se midió el tiempo de latencia de caída, a cuantas revoluciones se produjo, así como los porcentajes de mejora en latencia a lo largo de los días que duró la prueba. Los resultados mostraron que los porcentajes de mejora con el tiempo en los tiempos de latencia de caída eran similares en ambos grupos, por lo que todos muestran un progreso similar en su coordinación con el entrenamiento. (Figura 30)

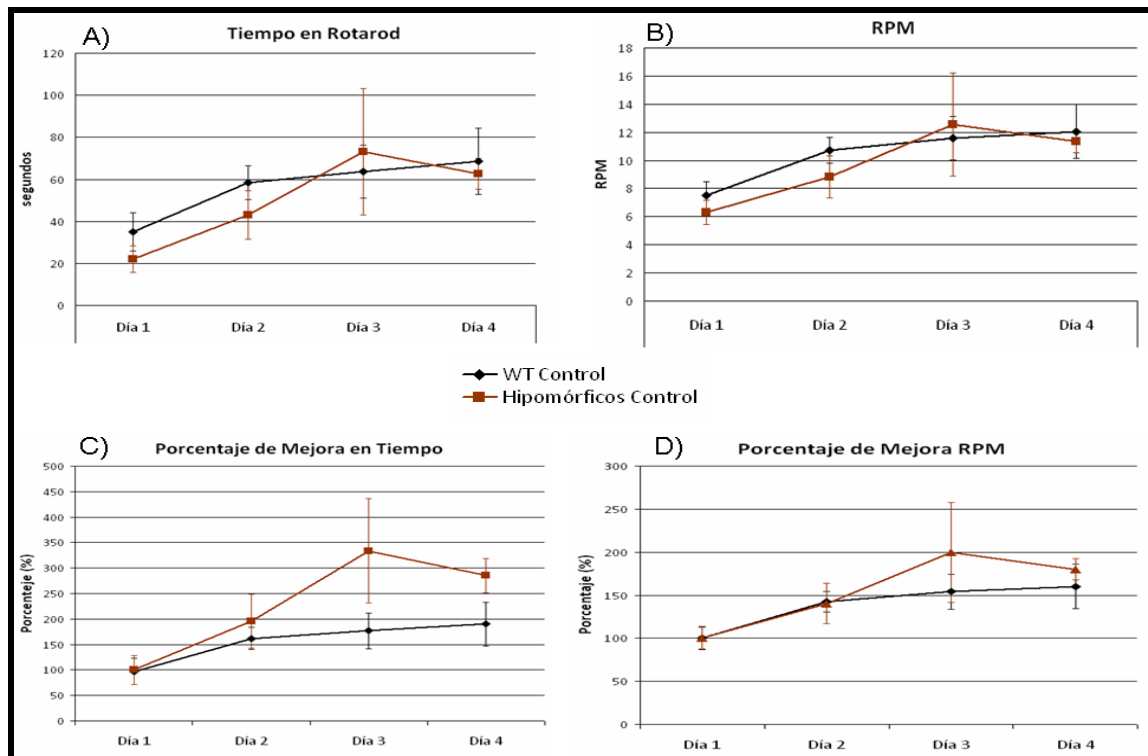


Figura 30: Evaluación de la Coordinación Motora mediante el uso de Rotarod. A y B muestran la latencia de caída, en tiempo y velocidad respectivamente y D representa como mejoran respecto al primer día de estudio. Mostrando un aprendizaje similar en ambos grupos. . WT Control n=5 y Hipomórficos Control n=4. Test realizado t-student de una cola, $\sigma=0,05$. Todos los valores $p>0,05$ Ay C) $p=0,13$;B yD) $p=0,52$

La segunda prueba que se realizó fue el campo abierto, que nos permitió evaluar si la mutación en *Lhx6* conllevaba una hiperactividad motora y cerebral, así como una mayor ansiedad en respuesta a un entorno nuevo, tal como ocurrió en los animales del modelo anterior SW. Los resultados obtenidos mostraron que no existía hiperactividad en los animales hipomórficos, teniendo valores similares en todos los parámetros analizados, tales como distancia recorrida, velocidad media alcanzada, tiempo en la zona periférica y tiempo en la zona central. (Figuras31 y 32)

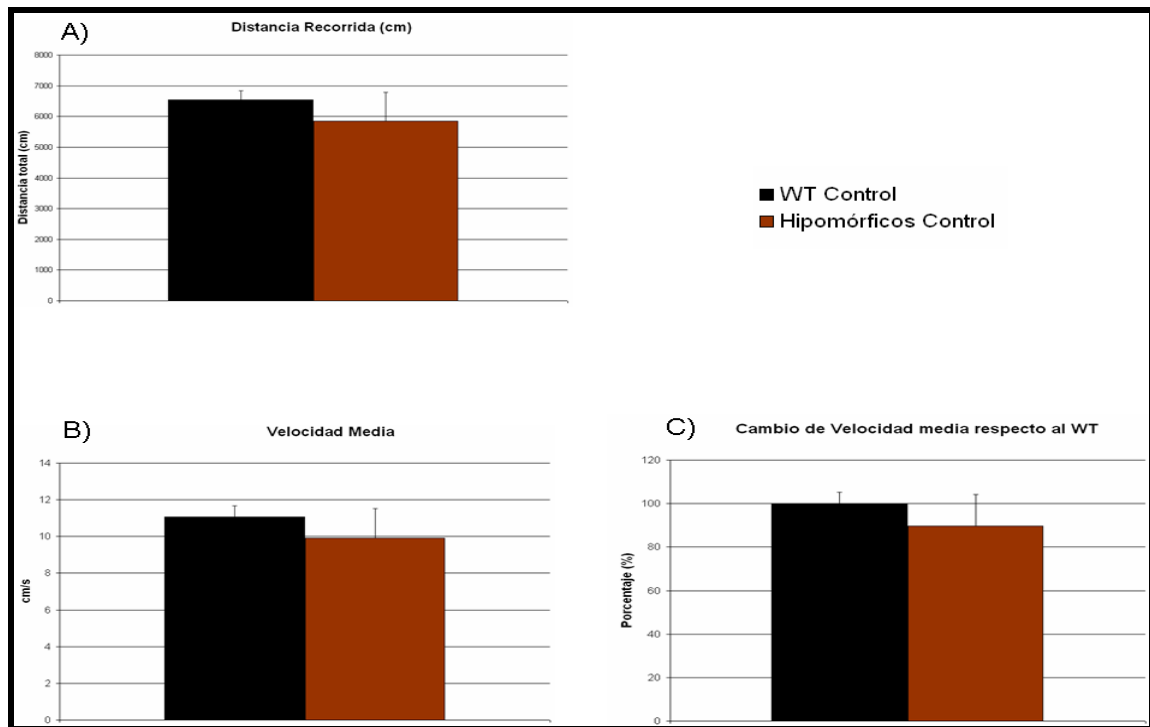


Figura 31: Prueba de Campo Abierto. A) Distancia total recorrida en 5 minutos en la arena, no muestran diferencias significativas. B) Velocidad media, no muestran diferencias significativas. C) Cambio de velocidad media de los animales mutantes respecto al WT, no muestran diferencia significativa. WT Control n=5 y Hipomórficos Control n=4. Test realizado t-student de una cola, $\sigma=0,05$. Todos los valores $p>0,05$ ($p=0,52$)

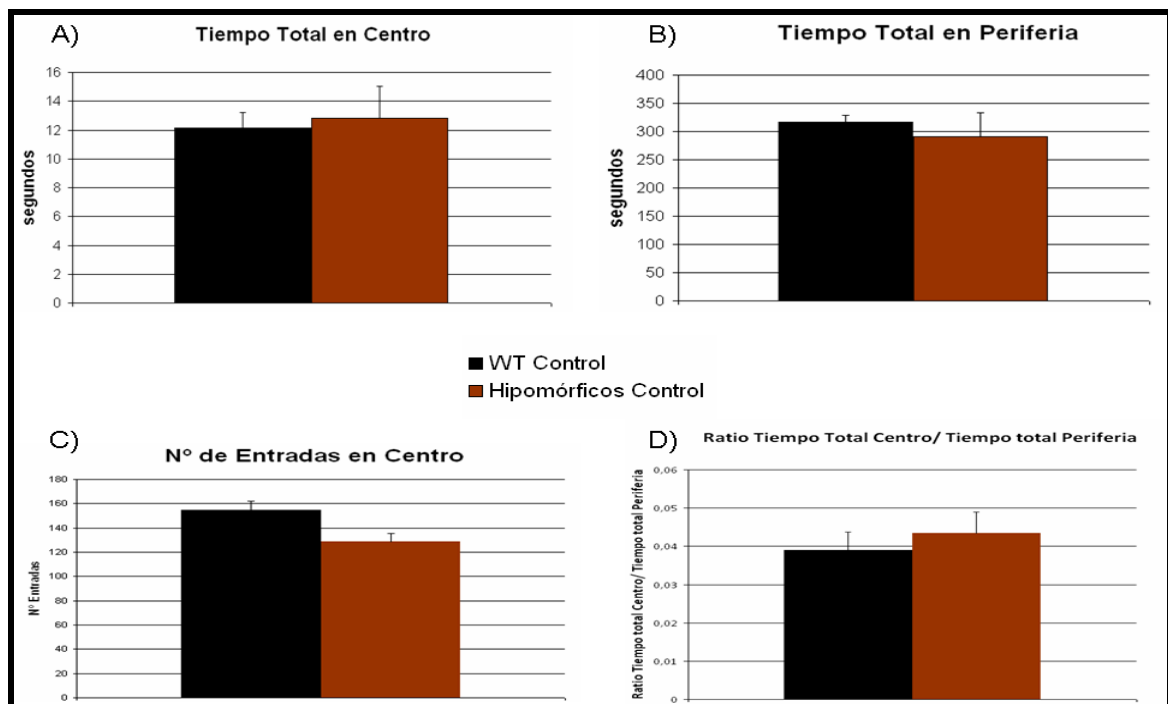


Figura 32: Tiempo total en la zonas del Campo Abierto y el número de transiciones entre zonas .A y B) tiempo total en centro y periferia respectivamente, no muestran diferencias significativas. C) Total de transiciones, no muestra diferencias significativas. D) Ratio entre tiempo que los animales pasan en el centro y en la periferia, no mostrando diferencias significativas. WT Control n=5 y Hipomórficos Control n=4. Test realizado t-student de una cola, $\sigma=0,05$. Todos los valores $p>0,05$. A) $p=0,93$; B) $p=0,61$; C) $p=0,051$; D) $p=0,87$

Solo en una de las pruebas, en concreto en el brazo elevado en cruz que se realizó del mismo modo a como fue realizado en el modelo de SW. Se midió el tiempo que pasaron los animales en cada uno de los brazos, observándose en la prueba cierta tendencia de los animales hipomórficos de pasar mayor tiempo en el brazo abierto (WT control= 101,78 ± 21,94 segundos en el brazo abierto; hipomórfico= 226,08 ± 27,67 segundos en el brazo abierto), lo que podría suponer un aumento de ansiedad en los animales con la mutación en *Lhx6* que a nivel estadístico resultó no ser significativa (Figura 33)

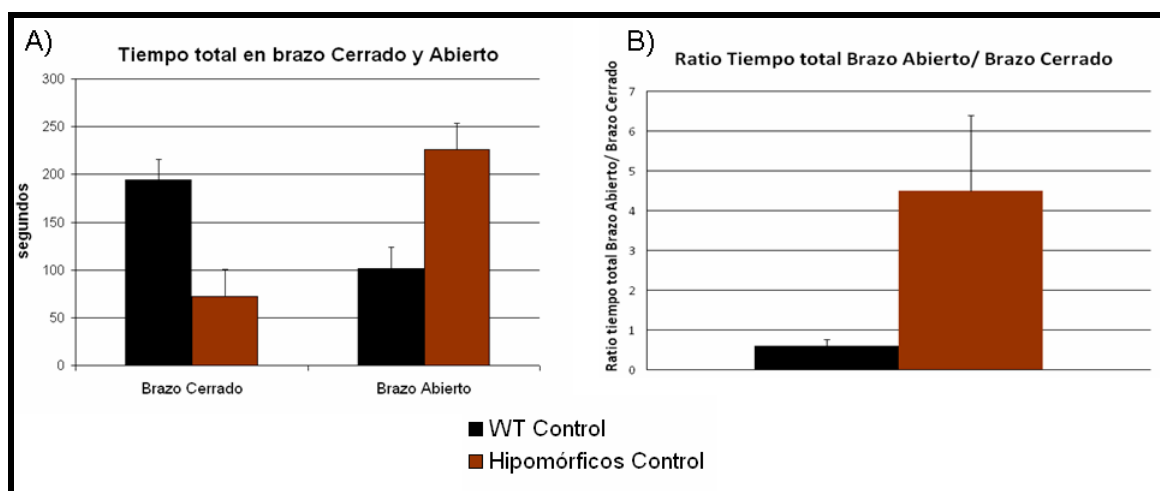


Figura 33: Prueba de laberinto en cruz elevada (Elevated Plus Maze). A)Tiempo total en Brazo Cerrado y Abierto. Muestra tendencia los mutantes de permanecer un mayor tiempo en el abierto, pero la diferencia no es significativa al realizar la prueba de t-student de dos colas, $\sigma=0,05$, donde en el brazo cerrado $p=0,071$ y en el brazo abierto $p=0,068$. B) Ratio entre el tiempo total Brazo Abierto/Brazo cerrado. Igualmente muestra tendencia hacia un mayor tiempo en el brazo abierto los animales mutantes, pero no es significativo. t-student, $\sigma=0,05$, $p=0,23$.

En conjunto, y al no verse complementado los resultados obtenidos en el campo abierto con los obtenidos en la prueba de brazo elevado en cruz, estos datos no nos sugiere que los animales hipomórfico presente problemas psicomotrices, de hiperactividad o ansiedad, Por lo que se descarto realizar pruebas en los animales trasplantados.

2.2 Análisis histopatológicos de modelos con déficit en *Lhx6* después del Trasplante.

Los animales trasplantados, tanto mutantes como controles, se sacrificaron a los 3 meses del trasplante. En primer lugar se procedió a verificar la presencia de células trasplantadas y cuantificar su supervivencia, de igual modo a como se realizó en el modelo de SW. Obtuvimos una tasa media de supervivencia celular de $24,88 \pm 4,26\%$ en los animales WT+MGE y de $24,08 \pm 3.68\%$ en los hipomórficos+MGE, estimadas de igual forma a lo realizado en los animales de SW. Datos comparables comparable a lo publicado con anterioridad, y a lo obtenido anteriormente, indicando que las células son estables, migran largas distancias y que no producen tumores.

Las células mostraron una amplia distribución en todos los animales trasplantados a lo largo del todo el hipocampo y la corteza, tanto en ratones mutantes como WT, indicando que el ambiente mutante no afecta a las propiedades de migración de las células trasplantadas. Observando una morfología similar a lo publicado anteriormente [86] y a lo obtenido en el modelo de SW, mostrando una morfología madura, con largas y complejas ramificaciones características de interneuronas. No obstante y tal como hicimos en los animales del SW, dado que las células se diferenciaron en un ambiente defectivo para *ARX* decidimos estudiar mas en detalle su morfología, dedicando un apartado en exclusivita a este estudio más adelante. (Figura 34)

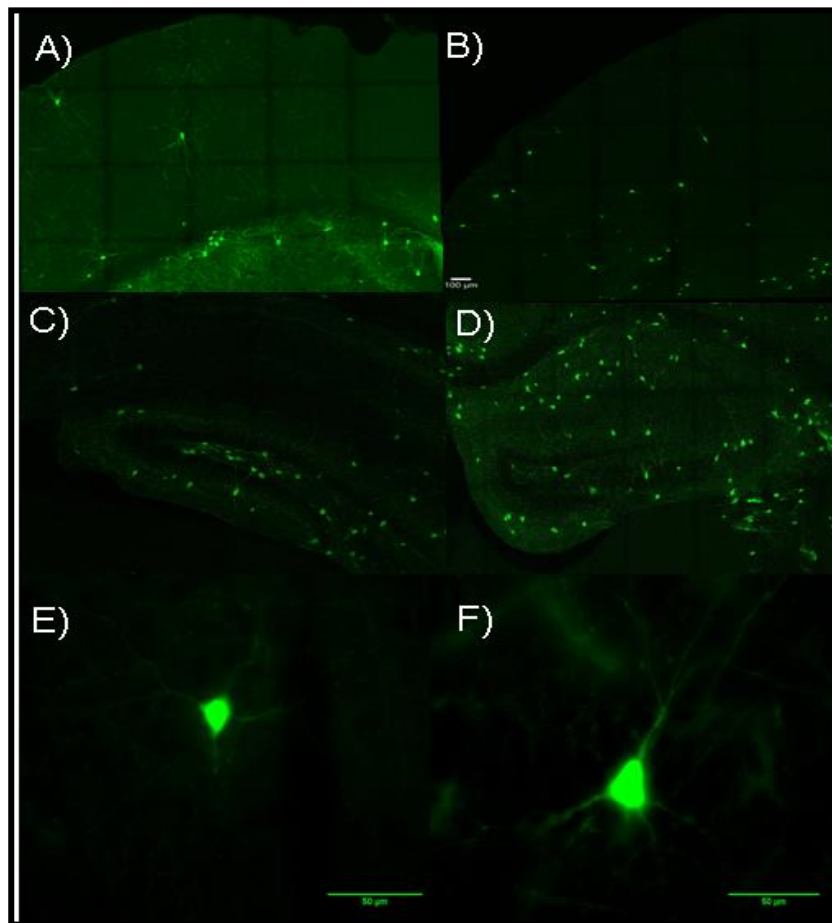


Figura 34: Distribución y diferenciación de las células derivadas de la MGE en los animales *Hipomórficos* mutantes. Corteza(A-B), Hipocampo (C-D), Interneuronas de Corteza (E) Interneuronas de Hipocampo (F) Imágenes de Microscopia de Fluorescencia. . Barra de escala 50 μ m y 100 μ m

Al igual que en el modelo anterior para comprobar la adquisición de propiedades moleculares características de interneuronas maduras por parte de las células trasplantadas se realizó una serie de análisis inmunohistoquímicos de marcadores típicos de las diferentes subpoblaciones de interneuronas GABAérgicas. Los marcajes incluyeron GAD67 (Ácido Glutámico Descarboxilasa 67), Parvalbumina (PV), Somastotatina (SST), Neuropéptido Y (NpY) y Calbindina (CB), lo que abarcaría casi el 100% de todas la interneuronas GABAérgicas presentes en la corteza e hipocampo. La cuantificación del número de células GFP+ procedentes del donante que colocalizaron con los diferentes marcadores empleados se puede ver en la Tabla3, obteniendo, al igual que ocurrió en el anterior modelo, un diferenciación hacia los distintos marcadores

moleculares (Tabla 5), con una tendencia muy marcada hacia la diferenciación en Parvalbuminas en los mutantes, pudiéndose ser debida esta tendencia a el ambiente presente en el mutante. (Figura 35). Los resultados en los animales wt control fueron similares a lo publicado previamente por nuestro grupo y otros [34-36, 86].

Estos resultados vuelven a demostrar como los precursores derivados de la MGE siguen el patrón de crecimiento y diferenciación derivados de la MGE hacia interneuronas maduras puede verse afectado bajo un ambiente mutante, ya sea por la deficiencia en *Lhx6* o bien por la reducción en el número de otras interneuronas que se observa en los ratones hipomórficos para *Lhx6*.

En el caso de los modelos hipomórficos de *Lhx6* se ha descrito un claro déficit de interneuronas GABAérgicas en corteza e hipocampo. Los animales con la mutación en hipomórfico *Lhx6* muestran deficiencias en los grupos mayoritarios de interneuronas, como son las positivas para PV y SST. En concreto el grupo de Pachnis, donde se han desarrollado el modelo, mostró un déficit muy pronunciado en las interneuronas que expresan SST, tanto en corteza como en hipocampo, de aproximadamente el 40% en la corteza y del 30 % en el hipocampo, siendo el porcentaje total de SST en el mutante respecto al WT de $57,7 \pm 7\%$ en la corteza. Otras interneuronas afectadas son el grupo de PV, con una reducción de aproximadamente un 10% en la corteza, con un porcentaje total de PV respecto al WT de $92 \pm 3\%$ en la corteza, y una reducción del 50 % en el hipocampo, ($3,6 \pm 0,3$ células positivas para PV/sección en los hipomórficos vs $7,8 \pm 0,9$ células positivas para Pv/sección) [25]. Los cambios en los número totales en otras poblaciones más heterogénea como son las positivas para NpY y CB no se conocía con exactitud hasta el momento, al menos en la corteza, por no haber sido analizado en los estudios previos realizados en el modelo.

TABLA 5 Subtipos de Interneuronas	Hipocampo		Corteza	
	Wild-Type	Mutantes Hipomórficos <i>Lhx6</i>	Wild-Type	Mutantes Hipomórficos <i>Lhx6</i>
Parvalbumina (PV)	$36,28 \pm 6,13\%$	$37,37 \pm 5,06\%$	$31,16 \pm 2,16\%$	$63,3 \pm 1,72\%$
Somastotatina (SST)	$43,54 \pm 5,84\%$	$38,18 \pm 3,32\%$	$29,1 \pm 6,23\%$	$28,99 \pm 5,74\%$
NeuropéptidoY (NpY)	$16,95 \pm 4,37\%$	$11,80 \pm 3,60\%$	$17,11 \pm 2,51\%$	$12,74 \pm 1,34\%$

Tabla 5: Porcentajes de expresión de los principales marcadores moleculares de interneuronas de las células procedentes de la MGE al trasplantarlas en un modelo hipomórficos *Lhx6* y en animales controles (Wild-types). ¹¹⁵

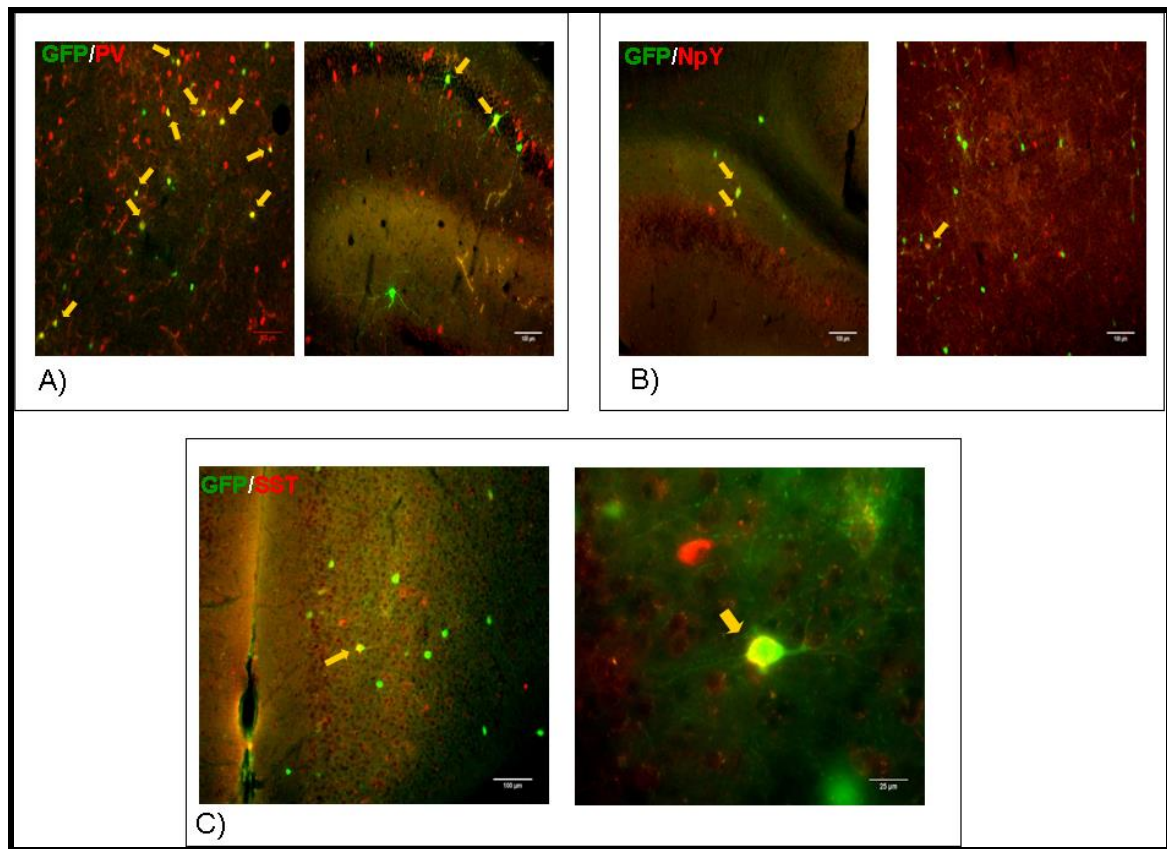


Figura 35: Caracterización molecular de las células derivadas de la MGE en animales Hipomórficos mutantes. Colocalización inmunohistoquímica de las células GFP positivas provenientes de la MGE con los típicos marcadores de las interneuronas PV (A), NpY (B) y SST (C) Las flechas señalan las células doble positivas. Barra de escala 25 μ m y 100 μ m

Al igual que se realizó en el modelo del SW, y dada las fuertes anomalías en las poblaciones de interneuronas positivas para PV y SST, analizamos si nuestra hipótesis de que son capaces de sustituir un déficit de estas era correcta. De modo que se realizaron, como se realizó en el modelo de SW, una serie de estudios inmunohistoquímicos y una vez comprobado que las células procedentes de la MGE son capaces de diferenciarse a los hacia los distintos marcadores, cuantificamos la contribución al número total de células que constituyen las diferentes poblaciones de interneuronas.

Lo primero que se realizó fue un estudio de los animales mutantes y controles sin trasplantes, para verificar si existe una reducción en el número total de interneuronas

GABAérgicas, tal como esta publicado. Para ello realizamos un primer marcaje contra GAD67, que como se dijo anterioridad es la enzima responsable de la síntesis de GABA. Los resultados obtenidos muestran que en el hipocampo la densidad de GAD67 es de un $72,40 \pm 1,8$ % GAD67+ respecto al total de GAD67 + del WT, y en la corteza es de un $89,10 \pm 12,8$ % GAD67+ respecto al total de GAD67+ del WT (Figura 36). Estos resultados sugerían que los animales mutantes tienen una reducción de interneuronas que esta relacionada con las perdidas en las subpoblaciones de interneuronas de PV y SST.

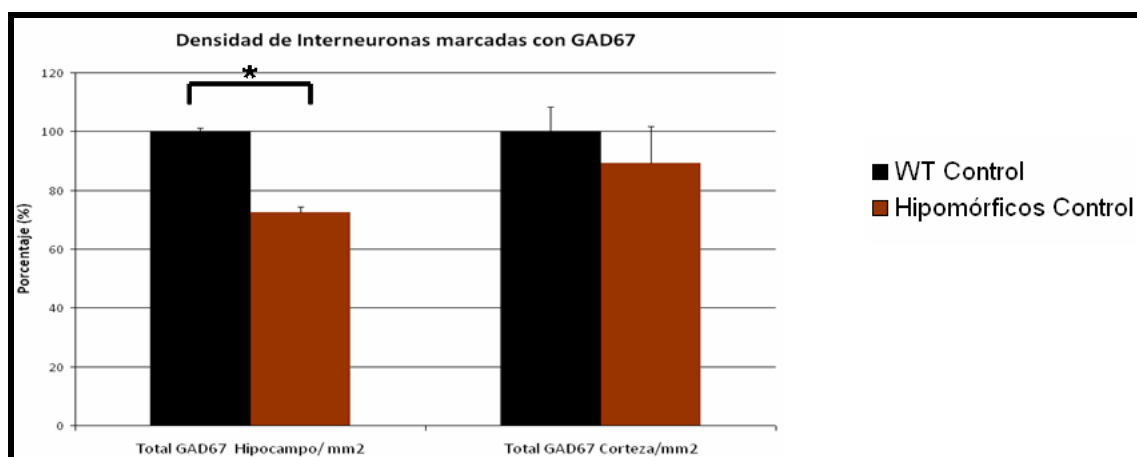


Figura 36: Densidad de Interneuronas GABAérgicas respecto al Wild-type en el hipocampo y la corteza. *t*-student una cola, $\sigma=0,05$; en Hipocampo $p=0,01^*$ y en Corteza $p= 0,51$

Los resultados obtenido del estudio de expresión de GAD67 sugería que con trasplantes de precursores GABAérgicos podríamos aumentar las subpoblaciones deficitarias tal como ocurrió en el modelo de SW. Para ello se procedió a estudiar como los trasplantes afectaban a los subtipos deficitarios en el modelo hipomórfico respecto al WT. De modo que se analizó mediante estudios de inmunohistoquímicas las poblaciones positivas de PV, SST y NpY .

En el caso de las PV mostraban un déficit de aproximadamente un 10% en la corteza y de un 50 % en el hipocampo en los animales hipomórficos, tal como se dijo anteriormente. Nuestros resultados confirmaron esos déficit de interneuronas PV, encontrándose una densidad de PV en los animales hipomórficos respectos al WT de un $85,21 \pm 3,94$ % de PV en la corteza y de $39,65 \pm 4,37\%$ en el hipocampo. En cuanto a los mutantes hipomórficos+MGE mostraron un aumento de la densidad de PV respecto a los WT, en concreto en la corteza se paso a una densidad de $107,7 \pm 2,56$ % de PV, y en

el hipocampo a una densidad de $54,56 \pm 9,4\%$ de PV, lo que supone una mejora del déficit de PV de un 22% en la corteza y de un 15% en el hipocampo respecto a los animales hipomórficos no trasplantados, si bien este incremento no fue estadísticamente significativo. Además también se observó un aumento de la densidad de PV en los animales controles+MGE (Figura 37). Estos datos muestran además una correlación con el porcentaje de dobles positivas GFP-PV+ presente en los animales trasplantados respecto al total de PV presentes, en concreto en los animales mutantes trasplantados se observó un $9,08 \pm 2,55\%$ de Dobles GFP-PV frente al total de PV en el hipocampo y de un $6,5 \pm 1,20\%$ de Dobles GFP-PV frente al total de PV en la corteza.

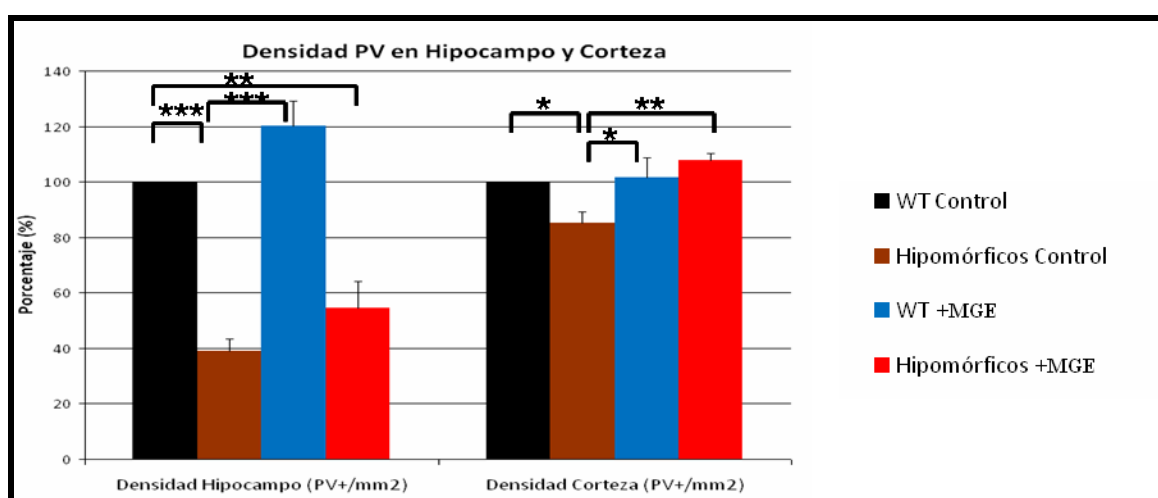


Figura 37: Densidad de Parvalbumina en el hipocampo y la corteza respecto a los WT controles (NT). En el Hipocampo se observa diferencias significativas entre los Hipomórficos controles y WT controles; y entre los hipomórficos trasplantados y los WT controles. *t*-student una cola, $\sigma=0,05$, $p=0,00003$ ***y $p=0,005$ **. El análisis de la varianza (ANOVA de un factor) mostró esas diferencias entre los hipomórficos controles y los WT (controles y trasplantados), $F[3,89]=20,30$ $p=0,0001$; y entre los hipomórficos trasplantados y los WT (controles y trasplantados), $F[3,81]=10,87$ $p=0,002$. En la corteza se observaron diferencias significativas entre los Hipomórficos controles y WT controles. *t*-student, $\sigma=0,05$, $p=0,03$ *. Los hipomórficos trasplantados no mostraron diferencias con los WT controles, pero muestran diferencias significativas con los hipomórficos controles, *t*-student, $\sigma=0,05$, $p=0,004$ **. El análisis de la varianza (ANOVA de un factor), no se mostró esas diferencias entre los hipomórficos controles y los WT (controles y trasplantados), $F[3,89]=2,42$ $p=0,13$; y ni se mostraron diferencias entre los hipomórficos trasplantados y los WT (controles y trasplantados), $F[3,81]=0,67$ $p=0,53$

El siguiente subtipo de interneuronas analizado fue la población positivas para SST, en donde los animales hipomórficos para *Lhx6*, según el grupo de Pachnis [25], mostraban un déficit de aproximadamente un 40% en la corteza y de un 30% en el hipocampo. Nuestros resultados confirmaron esos resultados obtenidos por el grupo de Pachnis, obteniendo una densidad de SST respecto al WT de un $55,27 \pm 4,56\%$ en el hipocampo, lo que supone una reducción del casi 45% respecto al WT; y de una densidad de $62,97 \pm$

3,80 de SST en la corteza, lo que supone un reducción de aproximadamente del 40%, similar a lo obtenido por el laboratorio del Dr. Pachnnis. En cuanto a los animales hipomórficos +MGE se observó una recuperación del déficit de SST en la corteza de los animales hipomórficos, pasando tener una densidad de SST respecto a los WT de un $90,25 \pm 14,07$ % de SST en la corteza, lo que supone un incremento de cerca de un 30% respecto a los animales mutantes hipomórficos no trasplantados que no fue estadísticamente significativo; mientras que en el hipocampo no mostraron ningún aumento de la densidad. Siendo este resultado correlativo a lo obtenido cuando analizamos el porcentaje de Dobles GFP-SST respecto al total SST presente en los animales mutantes trasplantados, obteniendo un $11,24 \pm 1,58$ % en la corteza y de un $19,7 \pm 5,10$ % en el hipocampo. Además se observó un aumento de la densidad de SST en la corteza de los animales controles+MGE, en concreto se pasó a una densidad de un $107,25 \pm 15,75$ % de SST respecto a los WT no trasplantados, que es correlacionado con el porcentaje de dobles GFP-SST respecto al total de SST en la corteza, que fue de un $5,5 \pm 1,25$ %.(Figura 38).

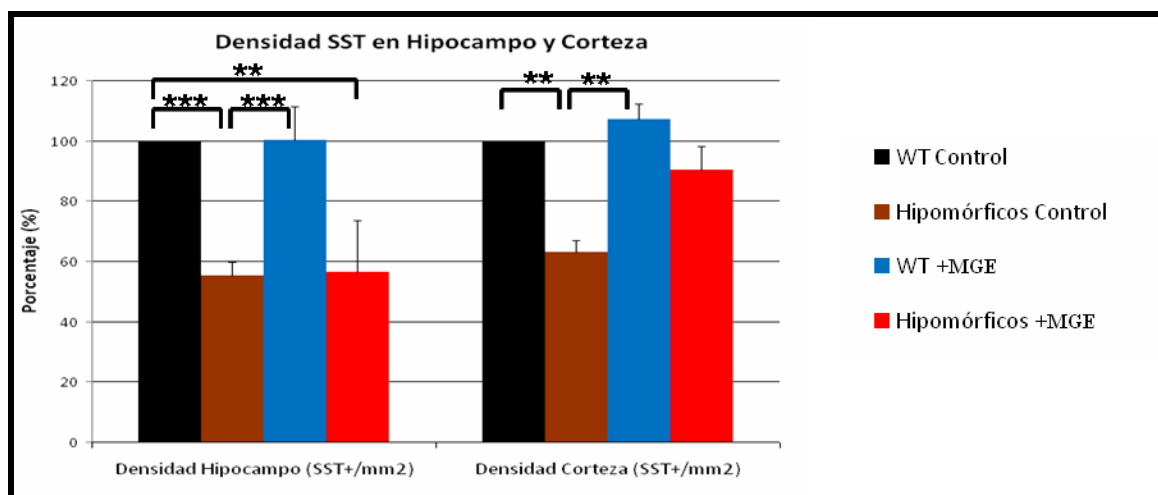


Figura 38: Densidad Somatostatina en el hipocampo y la corteza respecto a los WT controles. En el hipocampo se observaron diferencias significativas tanto entre los animales hipomórficos controles y los WT control como entre los hipomórficos trasplantados y los WT controles, *t*-student de una cola, $\sigma=0,05$, $p=0,008^{***}$; y $p=0,001^{**}$. El análisis de las varianzas (ANOVA de un factor) mostraron las mismas diferencias entre los hipomórficos controles y los WT (controles y trasplantados), $F[4,10]=11,97$ $p=0,02$; y entre los hipomórficos trasplantados y los WT (controles y trasplantados), $F[3,98]=12,49$ $p=0,001$. En la corteza los hipomórficos controles se observaron diferencias significativa, *t*-student de dos colas, $\sigma=0,05$, $p=0,002^{**}$. Los hipomórficos trasplantados no se observaron diferencias significativas. El análisis de la varianza (ANOVA de un factor) mostró esas diferencias entre los hipomórficos controles y los WT (controles y trasplantados), $F[3,98]=5,75$ $p=0,02$; y entre los hipomórficos trasplantados y los WT (controles y trasplantados) no se observaron diferencias significativas, $F[3,98]=0,48$ $p=0,63$

Estos resultados nos muestran como las células procedentes de la MGE, y trasplantadas en animales hipomórficos son capaces de producir una recuperación del déficit presenten en estos animales en los subtipos interneuronas de las poblaciones de PV y SST.

Además de los estudios realizados en PV y SST, se estudiaron otros dos marcadores que no teníamos conocimiento de haberse reportado algún tipo de déficit.

Primeramente estudiamos como se encontraba la densidad NpY en los animales mutantes, que como se dijo anteriormente el NpY forma parte de los procesos de regulación epileptogénicos, aumentando su expresión en los procesos epileptogénicos. Los animales mutantes hipomórficos que analizamos mostraron una densidad de NpY respecto a los WT en el hipocampo se mantenían sin cambios significativos, sin embargo en la corteza encontramos como la densidad era de un $72,36 \pm 4,8$ % respecto a los WT, lo que supone un déficit de aproximadamente un 30% que fue estadísticamente significativo. Al analizar la densidad de los animales hipomórfico+MGE se observó una clara recuperación del déficit de NpY en los mutantes hipomórfico+MGE, pasando a ser una densidad de un $119 \pm 7,99$ % de NpY respecto al WT, lo que supone un incremento del 50% respecto a los mutantes hipomórficos no trasplantados, resultado que estadísticamente significativo. En cuando al porcentaje de Dobles GFP-NpY respecto al total NpY presente en los animales hipomórficos+MGE, se obtuvo un $3,61 \pm 0,74$ % en la corteza y de un $5,7 \pm 0,7$ % en el hipocampo. (Figura 39)

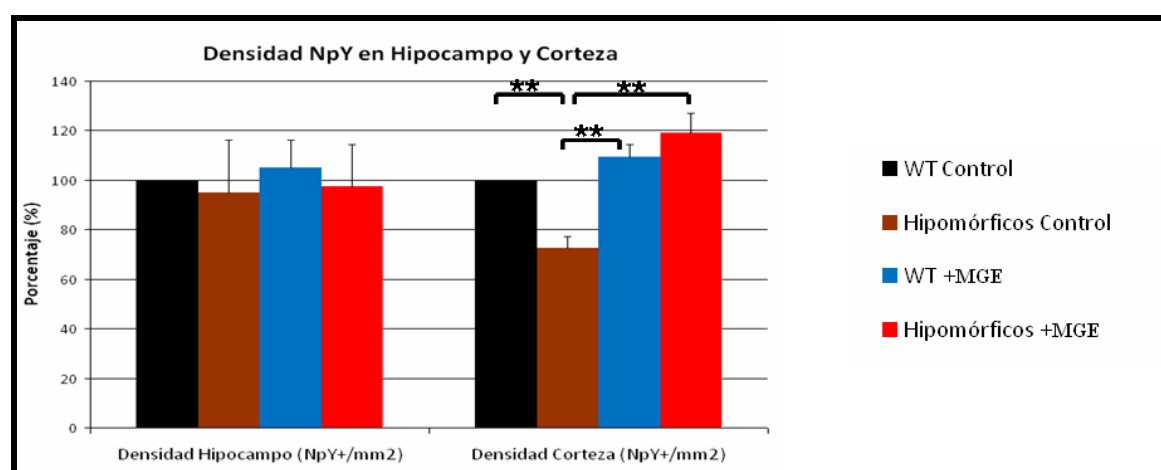


Figura 39: Densidad del Neuropeptido Y en el Hipocampo y la corteza respecto a los WT controles. En el hipocampo no se observaron diferencias al realizar la prueba de t-student de dos colas, ni en el Análisis de la varianza (ANOVA de un factor) los hipomórficos controles y los WT (controles y trasplantados), $F[3,89]=0,14$ $p=0,87$; y hipomórficos trasplantados y los WT (controles y trasplantados), $F[3,81]=0,09$ $p=0,91$. En la corteza se observaron diferencias significativas entre los Hipomórficos controles y WT controles. t-student, $\sigma=0,05$, $p=0,005^{**}$. Los hipomórficos trasplantados no mostraron diferencias con los WT controles, pero muestran diferencias significativas con los hipomórficos controles, t-student, $\sigma=0,05$, $p=0,002^{**}$. El análisis de la varianza (ANOVA de un factor), se mostrós esas diferencias entre los hipomórficos controles y los WT (controles y trasplantados), $F[3,89]=11,58$ $p=0,002$; y no se mostraron diferencias entre los hipomórficos trasplantados y los WT (controles y trasplantados), $F[3,81]=2,44$ $p=0,13$.

En su conjunto, estos resultados, y tal como ocurrió en el modelo de SW, nos indican que las células trasplantadas son capaces de reducir parcialmente el déficit en el número de interneuronas que padecen los animales hipomórficos para *Lhx6*. Y al igual que en el modelo de SW, pese a la existencia de alteraciones inherentes en un modelo genético desde el mismo momento en que se trasplantan las células las células pueden diferenciarse correctamente, aunque podrían variar la expresión de alguno de sus marcadores y los porcentajes de las poblaciones finales de cada subtipo verse modificados.

Posteriormente y una vez realizada la caracterización histopatológica de los animales hipomórficos no trasplantados y los hipomórficos +MGE, nos volvimos a percatar que podrían existir diferencias de expresión de los marcadores moleculares en las células trasplantadas respecto a las endógenas, tanto en los WT+MGE y los mutantes hipomórficos+MGE. Al igual que se realizó en los animales del SW, se procedió al estudio de los niveles de expresión mediante estudios de IR en los somas de las células trasplantadas centrándonos nuevamente en la región de la corteza cerebral somatosensorial.

El análisis de la IR en los somas mostró como las células trasplantadas en los animales WT con respecto a las endógenas del WT se encontraban por debajo su expresión. En el caso de las células trasplantadas en los animales mutantes, curiosamente en los casos de PV y CB mostraron una mayor IR, efecto que no ocurrió con el resto de marcadores. De modo que parece existir una modulación de la expresión de los diferentes marcadores moleculares en las células trasplantadas. (Figura 41)

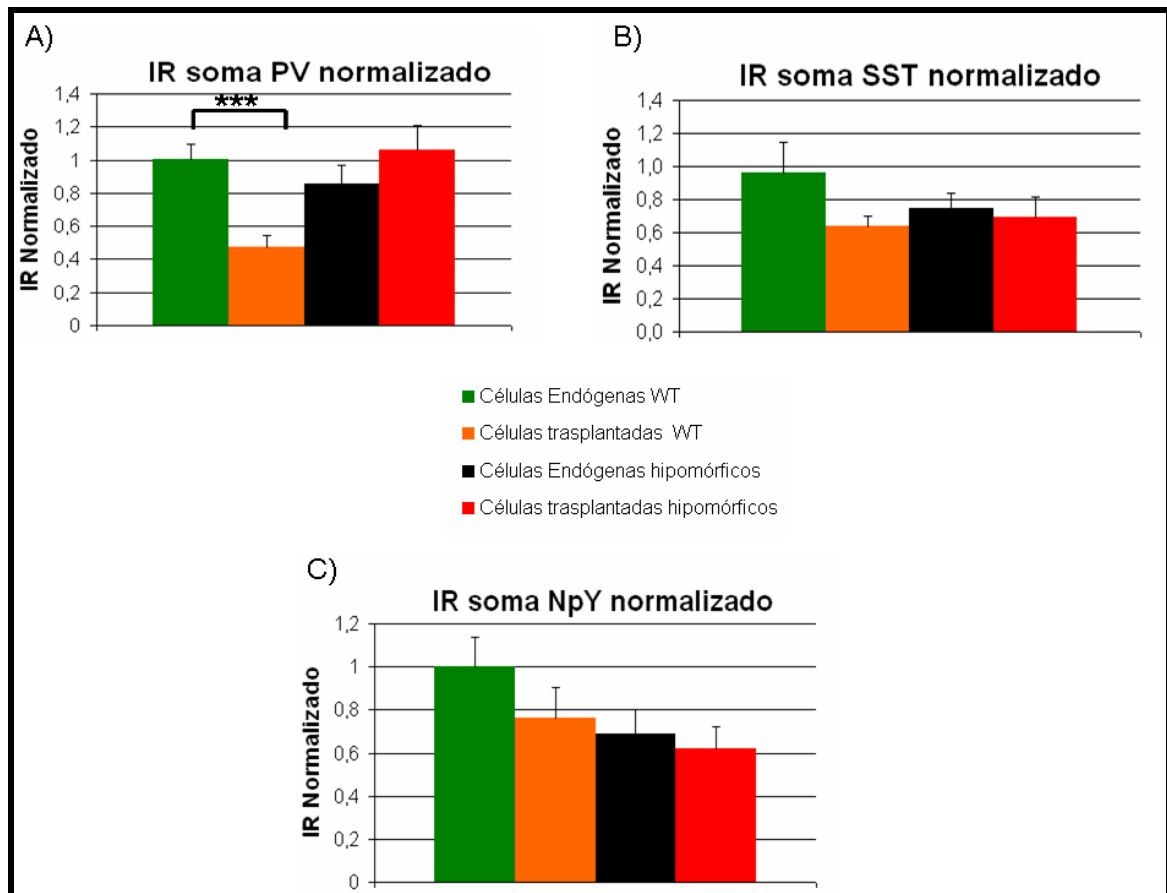


Figura 41 : Estudio de Inmunoreactividad de marcadores neuronales en los somas de interneuronas corticales. A) Inmunoreactividad de Parvalbumina, B) Inmunoreactividad de Somatotatinas, C) Inmunoreactividad del Neuropéptido Y. Test realizado *t*-student de una cola, $\sigma=0,05$. Todos los valores $p>0,05$ ($p=0,52$) . $p<0,01$ ** y $p<0,001$ ***

2.3 Análisis de morfología de las células trasplantadas

Por último, y al igual que se realizó con el modelo de SW quisimos analizar la morfología de las células trasplantadas en un animal hipomórfico respecto a las trasplantadas en un animal WT, y observar si el ambiente influyó en este aspecto.

Del mismo modo que en el modelo de SW las células presentaban una morfología madura con largas y complejas ramificaciones características de interneuronas. Para verificarlos se realizó un análisis de Sholl, tal como se describió en el modelo del SW, y midiendo los mismo parámetros y centrándonos en las Interneuronas PV por razones

técnicas (Tabla 6). Todos los parámetros analizados en los animales trasplantados, tanto WT como mutantes hipomórficos, mostraron que no había diferencias estadísticamente significativas, por lo que se puede decir que un ambiente mutante nuevo tampoco afecta a la diferenciación de estas células procedentes de la MGE hacia interneuronas maduras y funcionales, independientemente del ambiente genético en el que se encuentre (Figura 42).

TABLA 6 <i>Análisis de Sholl</i>	Área bajo la curva (μm^2)	RI	Rc (μm)	Nav	Nm	Nr (μm)	k(μm)
WT+MGE	1371,06 $\pm 200,82$	13,84 $\pm 1,51$	81,52 $\pm 14,71$	7,53 $\pm 0,72$	15,56 $\pm 1,79$	191,47 $\pm 23,20$	-0,056 $\pm 0,002$
Hipomórficos+MGE	1295,07 $\pm 133,78$	13,94 $\pm 0,85$	65,73 $\pm 7,14$	8,15 $\pm 0,67$	14,89 $\pm 0,93$	156,05 $\pm 7,38$	-0,052 $\pm 0,001$

Tabla6: Análisis de morfología de las células trasplantadas mediante Sholl

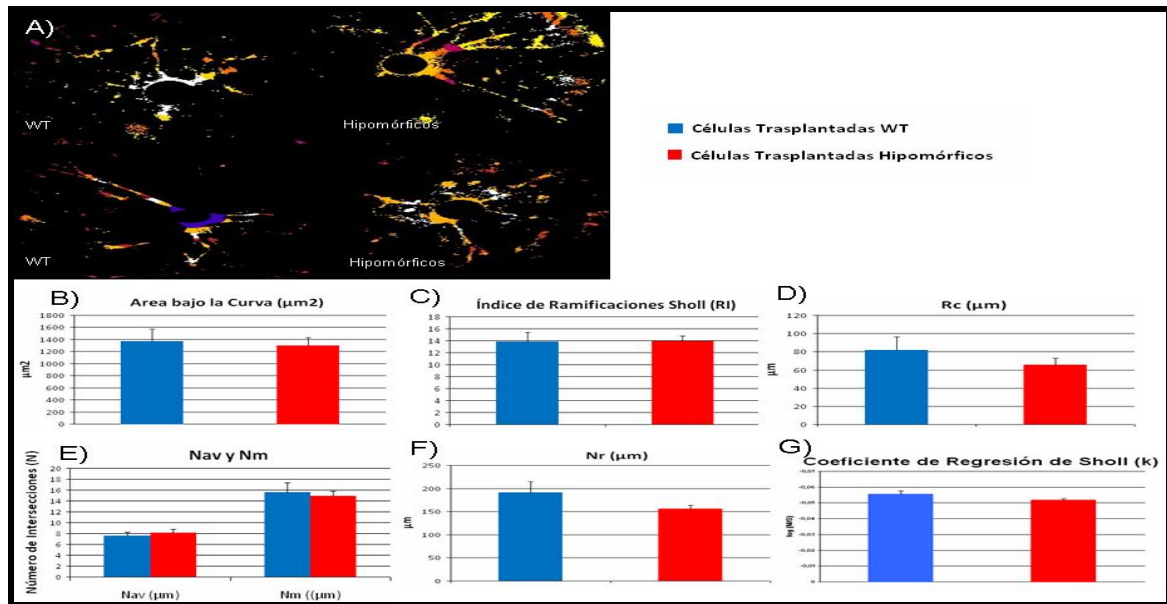


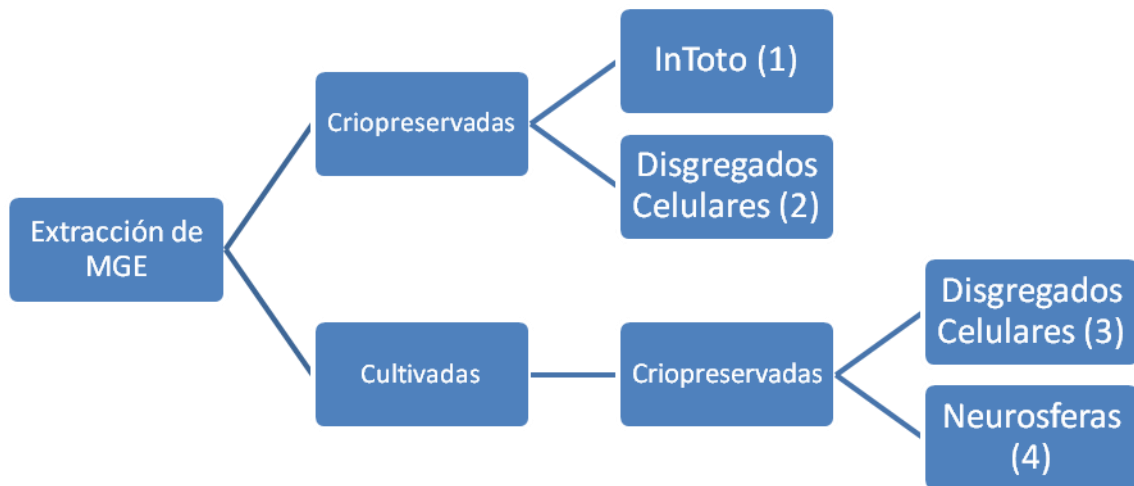
Figura 42: A) Ejemplo de Análisis de Sholl, en diferentes interneuronas. B-G) Parámetros morfológicos analizados mediante Sholl, que nos muestran diferencias significativas (*t*-student de dos colas) entre interneuronas trasplantadas en animales WT ($n=14$) e interneuronas trasplantadas en animales hipomórficos ($n=22$) Test realizado *t*-student de una cola, $\sigma=0,05$. Todos los valores $p>0,05$.

3 Criopreservación de precursores GABAérgicos derivados de la MGE.

El último apartado de la presente Tesis versa sobre el establecimiento de un protocolo eficaz de criopreservación de los precursores GABAérgicos procedentes de la MGE. Como hemos mencionado en la introducción, la creación de un criobanco de progenitores GABAérgicos ayudaría a disponer de estas células en cualquier momento para su uso clínico o estudio experimental.

3.1 Metodología, variables y grupos de criopreservación

Basándonos en las diferentes metodologías de criopreservación existentes y tal como recogemos en la introducción, establecimos una serie de procedimientos con distintas variables para evaluar cual/es podría/n ser la/s mejor/es condiciones de criopreservación. En concreto, se establecieron cuatro condiciones de criopreservación en donde las variables fueron por una parte la congelación *in toto* de la MGE, o bien disgregar y aislar las células de esta región antes de su congelación. Y por otro lado, la segunda variable que consideramos importante fue la de hacer un cultivo previo como neuroesferas de las células de MGE para su amplificación y posteriormente congelarlas, ensayando nuevamente su criopreservación de forma agregada en neuroesferas, o bien disgregadas. El esquema 1 representa los diferentes grupos testados.



Esquema 1: Condiciones de Criopreservación. (1) DMSO al 10% + MGE congelada In toto. Condición 1; (2) DMSO al 10% + MGE congelada Disgregados celulares. Condición 2; (3) DMSO al 10% + MGE Cultivadas Congeladas disgregadas. Condición 3; (4) DMSO al 10% + MGE Cultivadas Congeladas Neurosferas (NE). Condición 4.

De esta forma, se establecieron 4 grupos para su estudio:

1. MGE *in toto* recién aislada + criopreservada en DMSO al 10% (Condición 1)
2. Células de MGE disgregadas y recién aisladas + criopreservadas en DMSO al 10% (Condición 2)
3. Células de MGE cultivadas como NE + criopreservadas disgregadas en DMSO al 10% (Condición 3)
4. Células de MGE cultivadas como NE + criopreservadas agregadas como NE en DMSO al 10%. (Condición 4)

De forma que las principales variables a testar son la disgregación o no de las células y el paso previo de cultivo y amplificación.

3.2 Rendimiento y viabilidad celular tras la criopreservación

Una vez establecidas las cuatro condiciones a ensayar, se calculó la viabilidad de los cultivos mediante el recuento de células vivas después de la criopreservación. Así mismo, cuantificamos el rendimiento total del proceso después de la criopreservación mediante el cálculo del porcentaje de células vivas obtenidas respecto al número total de células de

partida. Estos dos parámetros nos indicaron como afectó la criopreservación a los cultivos. A continuación detallamos los resultados obtenidos en 4 ensayos independientes para cada una de las condiciones.

Condiciones MGE in toto y MGE Disgregados

Los explantes de MGE fueron criopreservados inmediatamente tras su disección en las dos condiciones establecidas, *in toto* y disgregadas mecánicamente (*ver métodos*). Previamente a la congelación se determinó el porcentaje de viabilidad de las células recién aisladas mediante tinción con azul de tripano, obteniéndose en el caso de las disgregadas una media del $90,5 \pm 0,7$ % de células vivas, con un número total medio de células de $5,5 \times 10^6 \pm 4,0 \times 10^4$ células/ml en un volumen total de 1 ml.

En el caso de la condición *in toto* no es posible realizar la medida de viabilidad, pero estimamos unos valores de partida similares a los de la condición 2, que incluso podían ser superiores debido a que evitamos la disgregación mecánica a la que se somete el cultivo en la condición 2. Al partir del mismo número de embriones (8-10 embriones por condición) y estimando que de cada embrión obtenemos unas 500000 células, se estimó que partimos de aproximadamente un número total medio de células de $4-5 \times 10^6 \pm 4,84 \times 10^4$ células/ml en condición 1)

A los 7 días de la criopreservación, los crioviales se descongelaron en baño caliente a 37° C y nuevamente se determinó la viabilidad celular, obteniéndose un $76,9 \pm 2,38$ % de células vivas en la Condición 1 tras su disgregación y un $66,47 \pm 12$ % en el caso de la Condición 2 (Tabla 3). El número total medio de células para la condición 1 fue de $2,7 \times 10^6 \pm 4,3 \times 10^5$ células/ml y para la Condición 2 de $3,3 \times 10^6 \pm 9,5 \times 10^4$ células/ml, ambas en 1 ml total de volumen, lo que supone una pérdida celular media de alrededor del 40%, o lo que es lo mismo, un rendimiento del $71,44 \pm 7,2$ % y del $59,4 \pm 14,36$ % para la condición 1 y 2 respectivamente. Estos porcentajes de viabilidad y rendimiento son más altos que los encontrados en la literatura consultada, donde habían llegado tan solo a 56% de viabilidad [100]. Las pérdidas celulares suelen ser debidas al efecto que tiene el criopreservante, en este caso DMSO, que presenta cierta citotoxicidad sobre las células disgregadas, así como al proceso de lavado del criopreservante y de disgregación. (Figura 43)

Condiciones MGE cultivadas + criopreservadas disgregadas y MGE cultivadas + criopreservadas in toto como NE

Para este protocolo de criopreservación las células derivadas de la MGE fueron previamente cultivadas y amplificadas en medio definido completo hasta la formación de NE (ver métodos), que se produjo a los 3 días de su puesta en cultivo, sin llegar a realizar ningún pase previo antes de su criopreservación. De estas células disgregadas se sembraron un total medio de células de $6,1 \times 10^6 \pm 5,7 \times 10^4$ células/ml en volumen total de un 1 ml, y con una viabilidad media del $89,14 \pm 1,68$ % previa a la criopreservación. Una vez se formaron las NE, una parte de ellas se criopreservaron directamente en los crioviales en DMSO al 10% (condición 4), y otra parte se disgregó y recontó nuevamente, obteniéndose una densidad media celular de $6,4 \times 10^6 \pm 7,7 \times 10^4$ células/ml en un volumen total de 1 ml, con una viabilidad media del $91,65 \pm 1,78$ % previo a su criopreservación (condición 3). (Figura 38).

A los 7 días de la criopreservación los crioviales se descongelaron en baño caliente a 37° C y las células procedentes de las NE congeladas completas o disgregadas fueron puestas de nuevo en cultivo. Las NE completas, condición 4, se sometieron a una disgregación mecánica previa a su siembra en cultivo a una densidad media celular de $2,0 \times 10^6 \pm 1,0 \times 10^4$ células/ml en un volumen total de 1 ml y una viabilidad media del $92,23 \pm 1,27$ %. Ello supone una pérdida de alrededor del 70% desde su disección, aislamiento y tras la criopreservación, lo que representa un rendimiento medio del $29,60 \pm 5,46$ %. Por su parte, las NE disgregas, condición 3, después de su criopreservación dieron una densidad media de $2,0 \times 10^6 \pm 5,9 \times 10^4$ células/ml en un volumen total de 1 ml con una viabilidad media del $75,43 \pm 5,79$ %; lo que también supone una pérdida celular de aproximadamente un 66% y un rendimiento medio del $34,36 \pm 4,52$ %.(Tabla 7).

TABLA 7 Recuento y Viabilidad de los precursores Criopreservados en diferentes condiciones	1	2	3	6
MGE <i>In toto</i> + DMSO al 10% (condición 1)	----	76,9 ± 2,38 %	71,44 ± 7,2	****
MGE Disgregados + DMSO al 10% (condición 2)	90,5 ± 0,7 %	66,47 ± 12 %	59,32± 14,36 %	*
MGE Cultivadas disgregadas + Criopreservadas disgregadas en DMSO al 10% (condición 3)	91,65 ± 1,8%	75,43± 5,79%	34,36± 4,52%	***
MGE Cultivadas disgregadas + Criopreservadas NE en DMSO al 10% (condición 4)	89,14 ± 1,8%	92,23 ± 1,27%	29,60 ± 5,46%	**

Tabla 7: Recuento celular y Viabilidad antes y después de la criopreservación. (1) Viabilidad pre-criopreservación; (2) Viabilidad Post-criopreservación; (3) Rendimiento; (4) Condición del cultivo. **** Muy Bueno, ***Aceptable, **Malo, * Muy Malo.

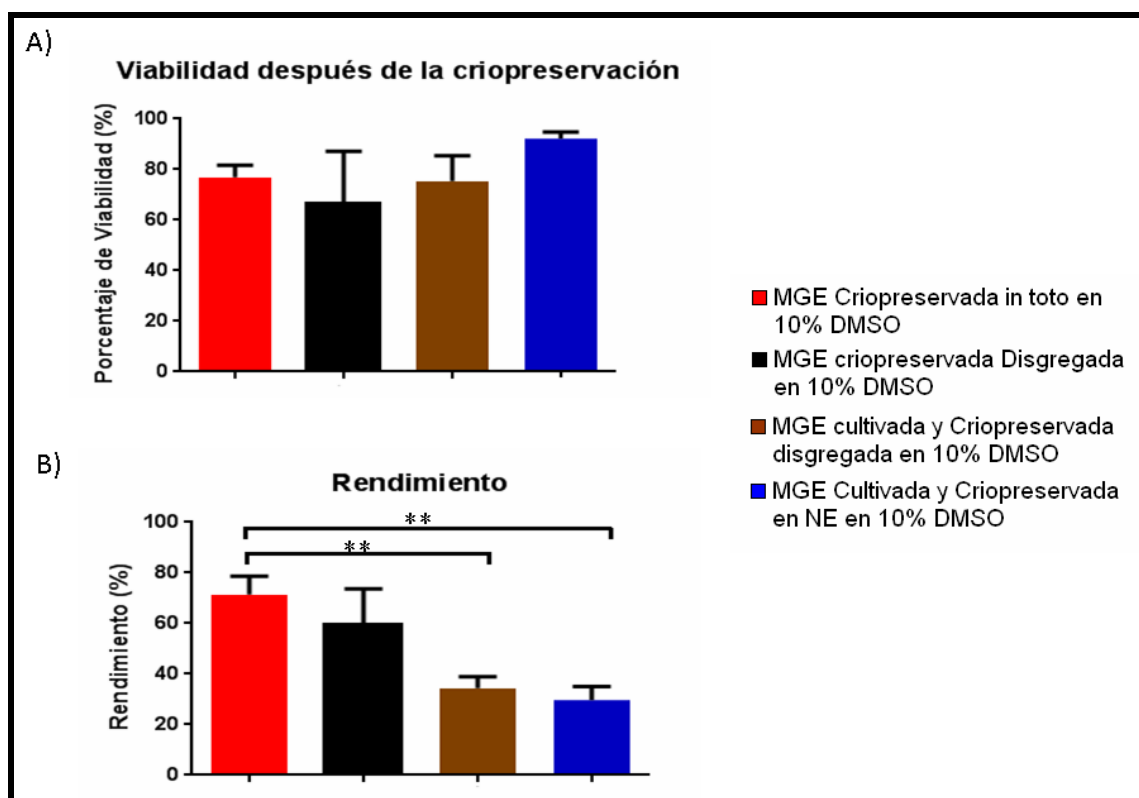


Figura 43: A) Viabilidad después de la criopreservación. One way- ANOVA no mostró diferencias significativas $p=0,0556$ * $F[3,10]=3,550$ correlacionado con el test de Tukey B) Rendimiento del cultivo después de la criopreservación. One-way ANOVA mostro diferencias significativas $p=0,0187$ $F[3,9]=5,645$, correlacionado con el test Tukey El grupo de MGE criopreservadas in toto mostro diferencias significativas con las condiciones de MGE cultivada al realizar la t-student de una cola, MGE criopreservada in toto- MGE cultivada y criopreservada disgregadas $p=0,0054^{**}$; MGE criopreservada in toto- MGE cultivada y criopreservada en NE $p=0,0038^{**}$ $\sigma=0,05$. $n=4$ en todos los grupos

En conjunto, una comparativa de los datos de viabilidad entre las diferentes condiciones ensayadas no mostró diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, los datos de rendimiento sí indicaron diferencias significativas entre las diferentes condiciones. Observándose que la condición 1 es donde se obtiene un mejor resultado, el cual llega a ser de casi el doble en comparación con los obtenidos en las condiciones 3 y 4.

3.3 Evaluación *in vitro* de la funcionalidad y diferenciación celular post-congelación

Es importante confirmar que el proceso de criopreservación mantiene intactas las propiedades intrínsecas de los progenitores derivados de la MGE. Por ello, una vez sembradas las células después de la criopreservación se procedió a cultivarlas en forma de neuroesferas para evaluar su funcionalidad a lo largo del tiempo que se encuentra en cultivo, y si mantienen sus propiedades de proliferación intactas, sin que se produzcan diferenciación hacia los diferentes linajes neuronales.

Este apartado de evaluación *in vitro* fue necesario para observar como las condiciones de cultivos pueden afectar al comportamiento de las células en cultivo, permitiéndonos evaluar las diferentes condiciones, no solo en base a su rendimiento después de la criopreservación, sino en base a su funcionalidad *in vitro*.

Interesantemente, se observaron ciertas diferencias en el comportamiento celular a lo largo del proceso de cultivo y en la funcionalidad del mismo según las condiciones de criopreservación. En primer lugar, las células de la condición 1 de congelación *in toto* (Figura 44 A) formaron sin dificultad NE a los tres días de cultivo, realizándose en ese momento un pase 1:1 y volviéndose a formar sin mayores problemas NE a los tres días de cultivo. Este proceso se realizó en sucesivos pases en los que siempre se volvieron a formar nuevas NE. Por el contrario, los cultivos realizados con las células disgregadas de la condición 2 no llegaron nunca a formar NE, ni siquiera tras mantener las células en cultivos durante 10 días con cambio periódico del medio de cultivo (Figura cultivo 44 B), resultado que era el esperado según la bibliografía consultada[96] (Tabla 7).

Por su parte, las células de la condición 3 fueron puestas en cultivo en donde se observó una formación de NE más lenta que en la condición 1 usada anteriormente. Las NE no se formaron hasta los 4 días, de modo que el cultivo responde bien después de la

criopreservación, aunque como mencionamos forman las NE más lentamente y su rendimiento como hemos reseñado en el apartado anterior fue menor. (Figura 45). Sorprendentemente, cuando se realizó un segundo pase 1:1 no se volvieron a formar NE. Indicando que este procedimiento de congelación puede estar afectando a la viabilidad de las células madre y a su capacidad de autorrenovación.

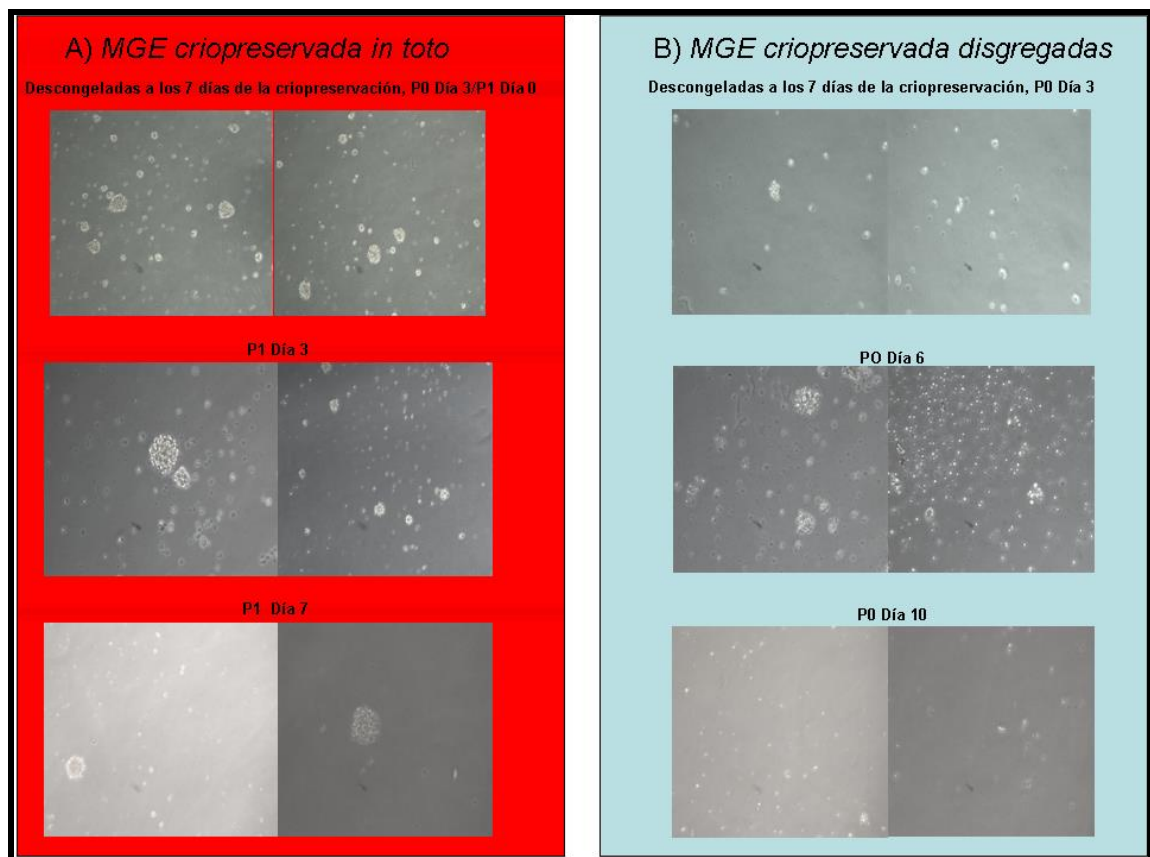


Figura 44: A) MGE criopreservada In toto y cultivada disgregada 7 días después de Criopreservación B) MGE disgregadas Criopreservadas, Cultivadas disgregadas 7 días después de la Criopreservación

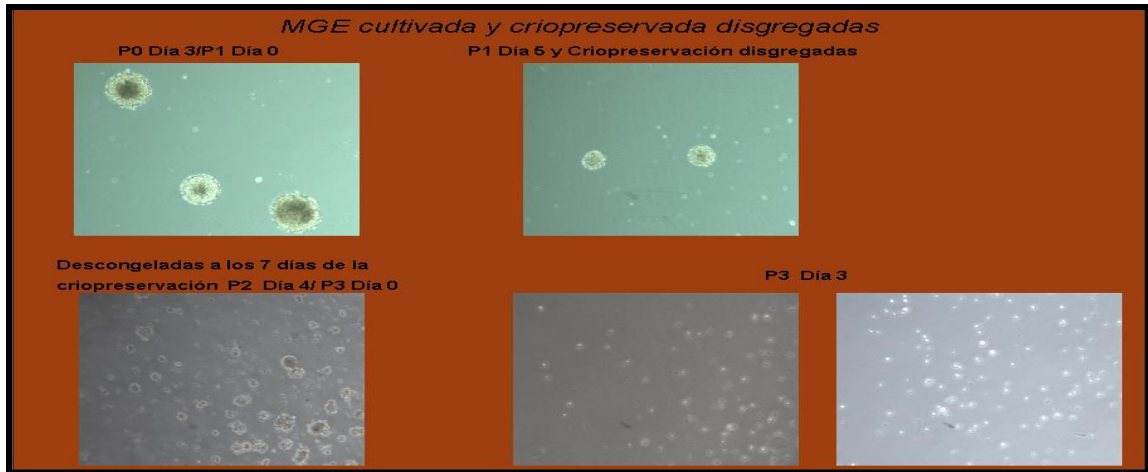


Figura 45: MGE cultivadas disgregadas (P0-P1), posteriormente Criopreservadas disgregadas y cultivada disgregada después de la Criopreservación (P2-P3).

Respecto a las NE congeladas completas, condición 4, no llegó a producirse una duplicación en el cultivo (Figura 46), ni formarse NE a los 3 días de cultivo. Sugiriendo que la congelación en la estructura esférica de las NE, la formación de cristales entre los agregados celulares o el posterior disgregado tras la descongelación puede afectar seriamente a la viabilidad celular.

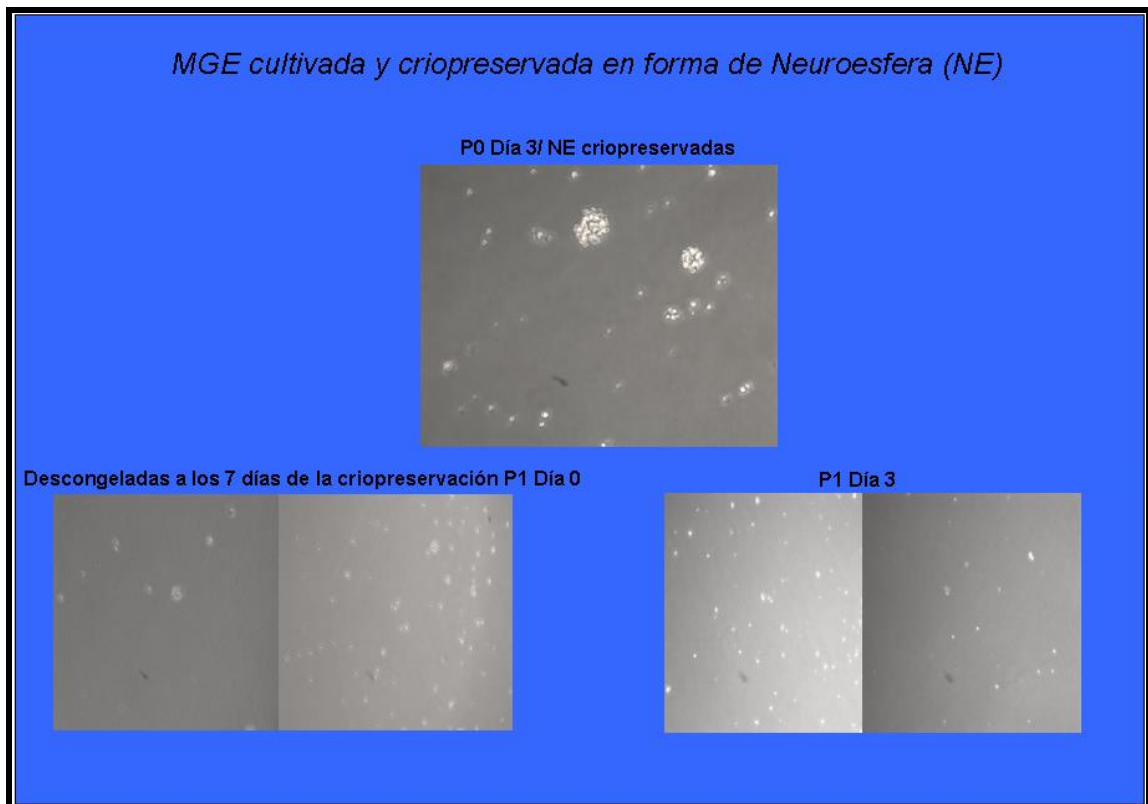


Figura 46: MGE cultivada y criopreservadas en NE, posteriormente descongelada y cultivada disgregadas

Caracterización inmunocitológica de los cultivos

Tras comprobar que el proceso de congelación que presentaba una mejor relación de viabilidad/rendimiento y proliferación en cultivo era la condición 1, congelación *in toto*, pasamos a verificar si este procedimiento mantenía intactas sus propiedades de indiferenciación y características específicas de la región a la que pertenecen estas células, la MGE. Para ello, a los 4 días en cultivo las NE formadas a partir de la condición 1, una vez que alcanzaron el tamaño óptimo para realizar su pase, fueron disgregadas y pasadas a frascos de cultivo (F25) previamente tratados con gelatina (0.1 % peso/volumen) como recubrimiento para promover su adherencia, en presencia de completo de NE en presencia de factores de crecimientos. A los tres días en cultivo se realizaron los estudios de marcadores para su caracterización.

Se realizaron una serie de inmunocitoquímicas con marcadores clásicos de precursores y linajes neurales. Los marcadores utilizados en las inmunocitoquímicas fueron Nestina+GFAP (precursores neurales), GFAP (astrocitos), MAP-2 (neuronas tempranas), NeuN (neuronas maduras), NG2 (oligodendrocitos) y Olig-2 (marcador de origen de la MGE). Se hicieron también inmunos control usando solo los anticuerpos secundarios correspondientes, siendo en todos los casos negativas.

Los resultados en la colocalización de Nestina y GFAP fueron satisfactorios ya que casi la práctica totalidad (>98%) de las células en cultivo co-expresaron los marcadores de precursores neurales (Figura 47). No apreciándose células marcadas exclusivamente para GFAP que indicarían la presencia de astrositos diferenciados. Esto sugiere que las condiciones utilizadas de criopreservación y cultivo de las células derivadas de la MGE mantienen sus propiedades como progenitoras indiferenciadas, uno de los principales requisitos para la puesta a punto de nuestro sistema de amplificación celular en cultivo.

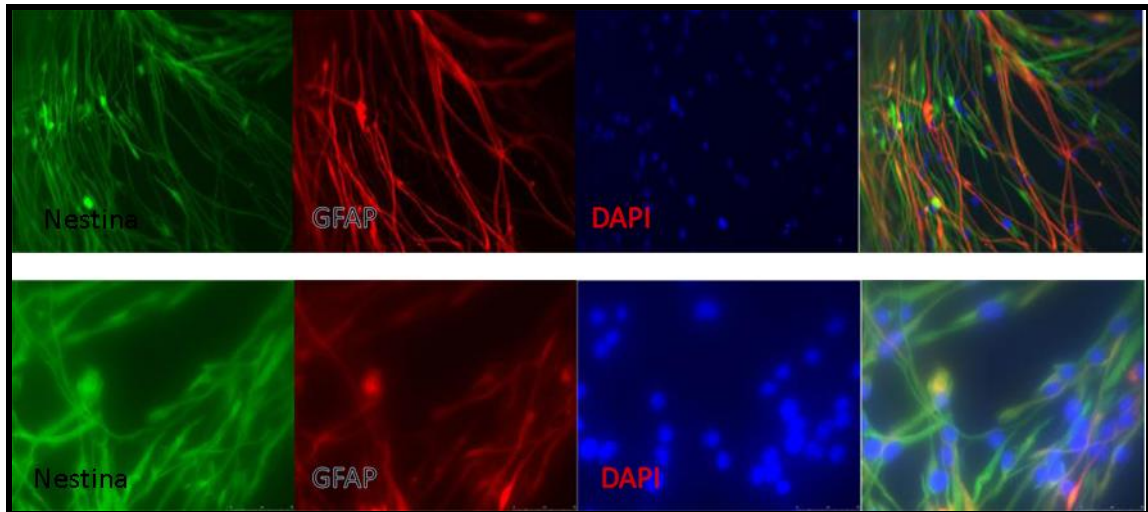


Figura 47: Doble inmunofluorescencia para Nestina (FITC-verde) y GFAP (Cy5-rojo). En azul marcaje con DAPI para la visualización de núcleos celulares.

Así mismo, se comprobó la completa colocalización del marcador Olig-2 específico de la MGE, con nestina y la tinción de DAPI para los núcleos (Figura 48-49). El resultado positivo, avala la buena práctica en la disección de la MGE y la falta de contaminación de otras áreas adyacentes. Además, sugiere que las células en cultivo mantienen características propias de la región de donde fueron extraídas, así como de su estado de indiferenciación.

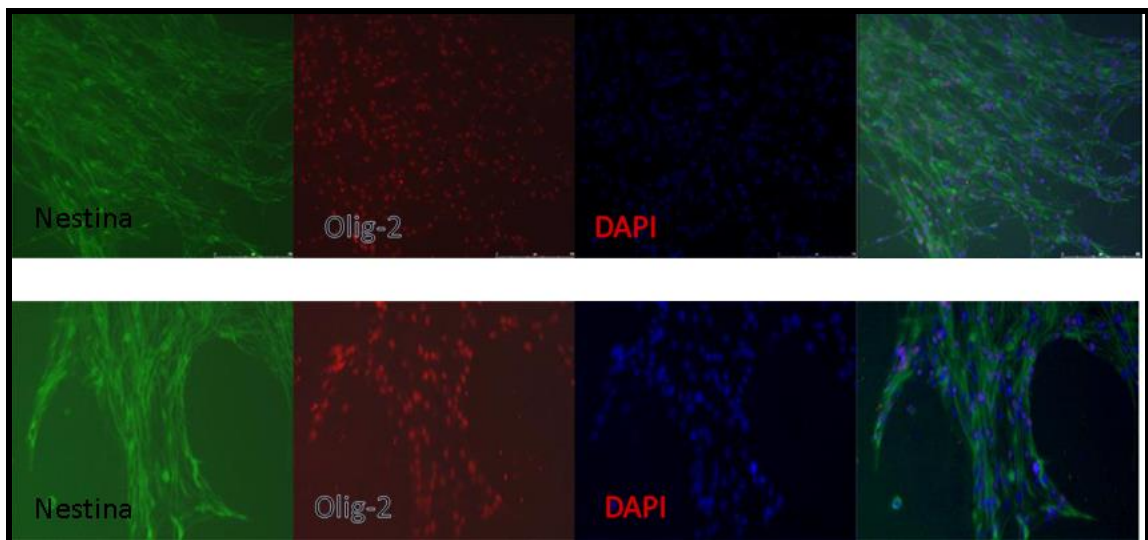


Figura 48: Doble inmunofluorescencia para Nestina (FITC-verde) y Olig-2 (Cy5-rojo). En azul marcaje con DAPI para la visualización de núcleos celulares.

Por otro lado, los cultivos fueron negativos para la expresión de NG2 (Figura 49.), lo que sugiere el bloqueo en la diferenciación hacia oligodendrocitos.

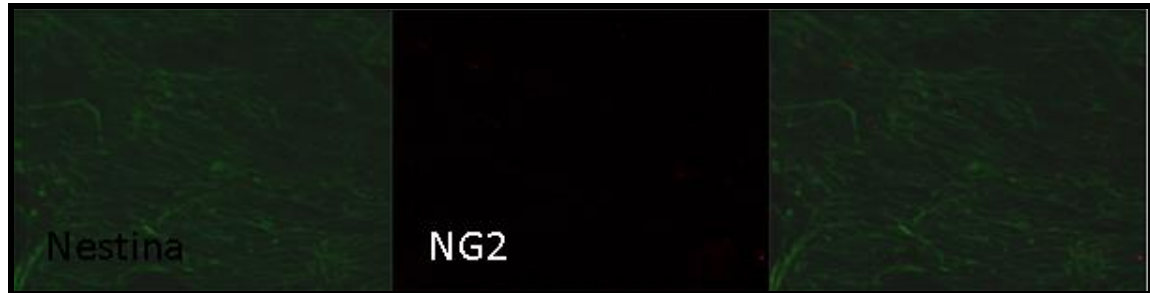


Figura 49. Doble inmunofluorescencia para Nestina (FITC-verde) y NG2 (Cy5-rojo).

Por último, se observó un pequeño porcentaje de células positivas para MAP-2 (5-7%). El marcaje no se encontró en los procesos celulares, sino que se concentraba en el soma. Esto sugiere que las condiciones de cultivo están manteniendo un estado de indiferenciación en la mayoría de las células, aunque es posible que unas pocas células escapen a este bloqueo y estén preparándose para diferenciarse hacia neuronas acumulando MAP-2. En ningún caso se observó inmunoreactividad para NeuN, indicando la ausencia de neuronas maduras (Figura 50-52).

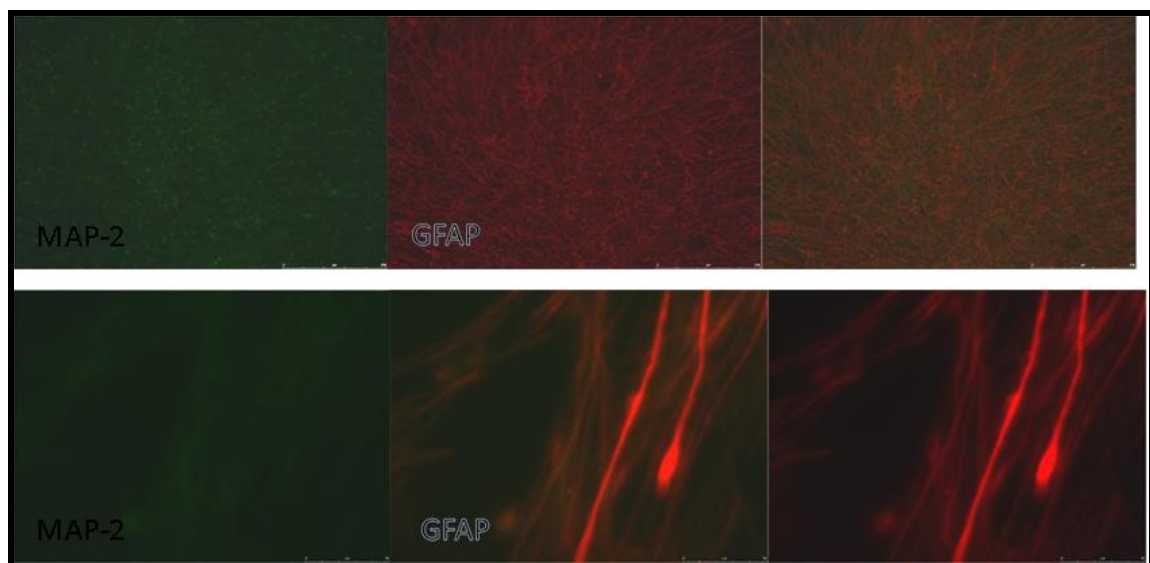


Figura 50:. Doble inmunofluorescencia para MAP-2 (FITC-verde) y GFAP (Cy5-rojo).

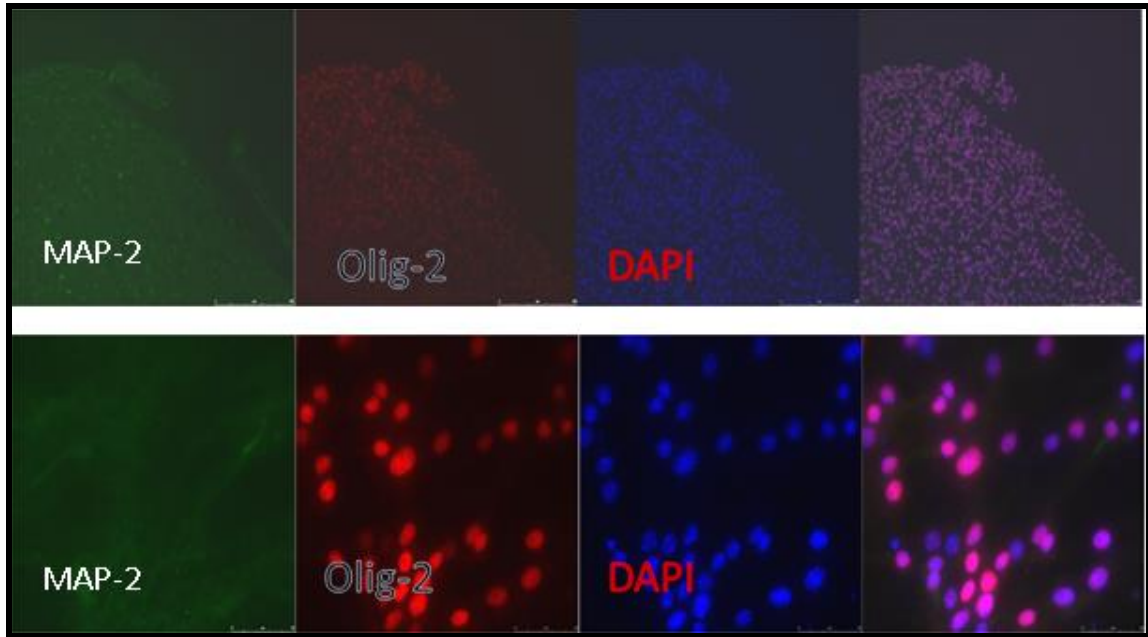


Figura 51: Doble inmunofluorescencia para MAP-2 (FITC-verde) y Olig-2 (Cy5-rojo). En azul marcaje con DAPI para la visualización de núcleos celulares.

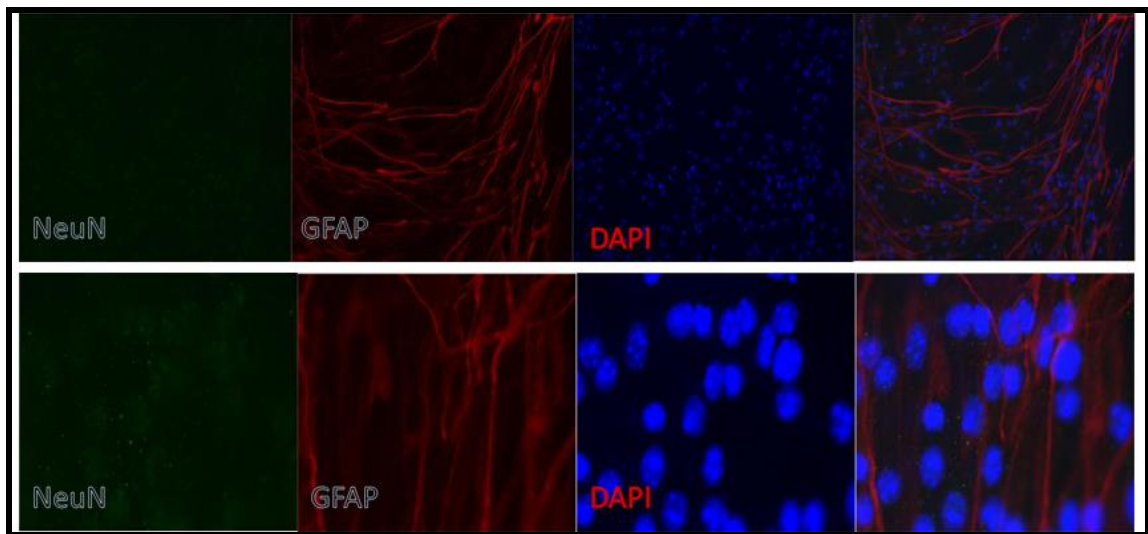


Figura 52: Doble inmunofluorescencia para NeuN (FITC-verde) y GFAP (Cy5-rojo). En azul marcaje con DAPI para la visualización de núcleos celulares.

En conjunto, los datos obtenidos sugieren que la MGE criopreservada *in toto*, es la mejor condición para realizar una correcta criopreservación de estos precursores GABAérgicos procedentes de la MGE.

3.4 Trasplante de precursores neuronales derivados de la MGE y criopreservados.

Es importante que los precursores, además de proliferar *in vitro*, mantengan su potencial de migración y posterior diferenciación *in vivo*, ya que se ha observado que éste se ve restringido dependiendo del tiempo en cultivo[109]. Para comprobar si las células criopreservadas *in toto* eran capaces de mantener las mismas propiedades al ser trasplantadas que cuando están recién aisladas[86], se realizaron unas series de trasplantes en animales WT neonatos y adultos (n=6, tanto en neonatos como en adultos). Los animales trasplantados con la MGE criopreservada *in toto* fueron sacrificados a las 4 semanas del trasplante, tiempo suficiente para que se produzca la correcta maduración y diferenciación de las células trasplantadas. La tasa de supervivencia celular tras el trasplante fue del $11,39 \pm 1,07\%$. Las células criopreservadas *in toto* fueron capaces de distribuirse por toda la corteza y el hipocampo, migrar largas distancias, cubriendo una distancia máxima media de $450 \pm 50\mu\text{m}$, similar a lo publicado anteriormente, sin que observáramos diferencias en migración en el eje antero-posterior [80, 85, 86]. Además mostraron una morfología madura similar a lo publicado anteriormente en el cerebro de animales neonatos WT [86], con largas y complejas ramificaciones características de interneuronas, tanto en animales neonatos como adultos (Figura 46). Por último, nunca observamos ningún proceso de transformación que derivase en un tumor, incluso un año después de producirse el trasplante (Figura 47)

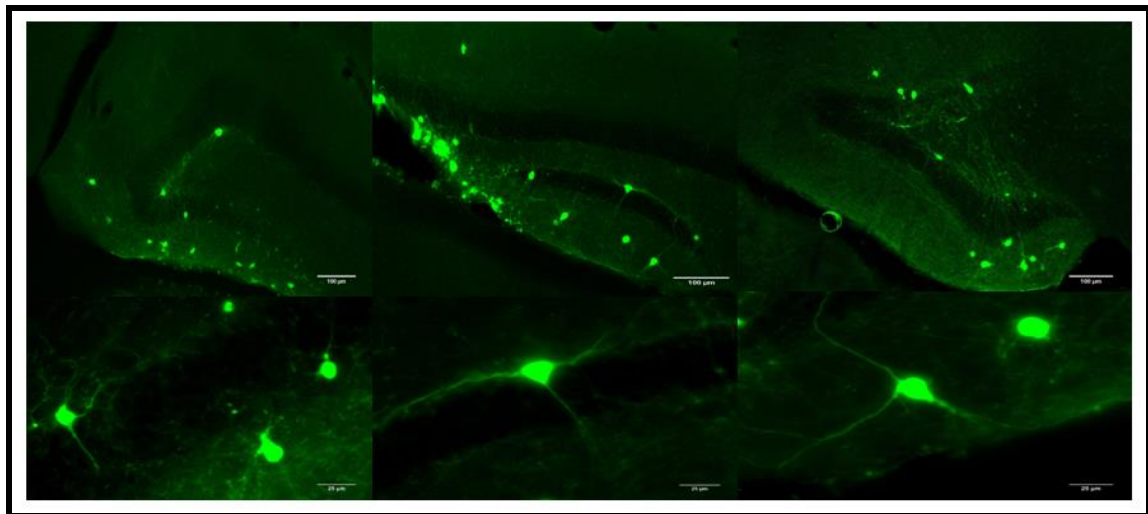


Figura 53: Células GFP procedente de la MGE criopreservadas *in toto* y trasplantadas en animales adultos a las 3-4 semanas del trasplante en el hipocampo. Imágenes de Microscopía de Fluorescencia aumentadas a 10x y 40x .

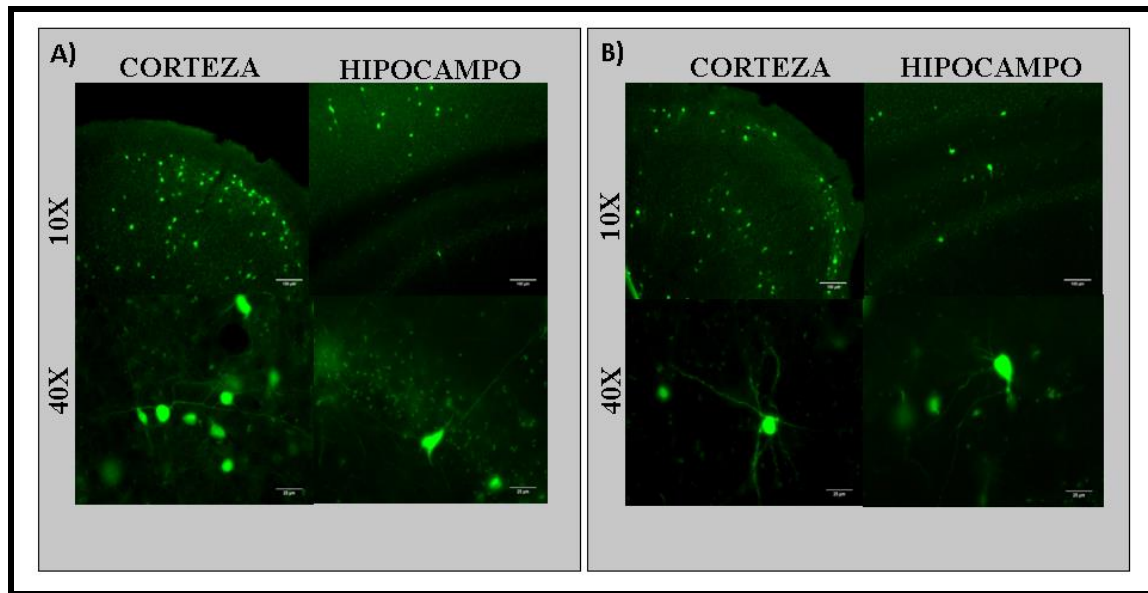


Figura 54: A) Células GFP procedentes de la MGE criopreservadas *in toto* y trasplantadas en animales neonatos 3-4 semanas después del trasplante B) Células GFP procedentes de la MGE criopreservadas *in toto* y trasplantadas en animales neonatos un año después del trasplante

3.5 Evaluación histopatológica después del trasplante

Por último, para comprobar la adquisición *in vivo* de las propiedades moleculares de interneuronas maduras por parte de las células criopreservadas *in toto* se realizó una serie de análisis inmunohistoquímicos de marcadores típicos de las principales subpoblaciones de interneuronas GABAérgicas como son PV, SST y CR, y que abarcarían casi el 100% de todas la interneuronas GABAérgicas.

Los datos mostraron como las células fueron capaces de diferenciarse de forma muy similar a lo que ocurría en los animales trasplantados con células no criopreservadas. La cuantificación del número de células GFP+ procedentes de células procedentes de la MGE criopreservadas *in toto* que colocalizaron con los diferentes marcadores empleados obteniendo un diferenciación hacia los distintos marcadores moleculares. (Tabla 8) (Figura 55)

TABLA 8 Subtipos de Interneuronas	Hipocampo	Corteza
	Neonatos+ MGE <i>in toto</i> criopreservada	Neonatos+ MGE <i>in toto</i> criopreservada
Parvalbumina (PV)	31,08± 4,27%	30,9 ± 4,15%
Somastotatina (SST)	35,93 ±4,54%	31,38 ± 4,32%
NeuropéptidoY (NpY)	18,15 ±2,50%	19,95 ± 3,44%
Calretinina(CR)	8,35 ± 0,95%	10,5 ± 1,3%

Tabla 8: Porcentajes de expresión de los principales marcadores moleculares de interneuronas de las células procedentes de la MGE criopreservada *in toto* en animales neonatos

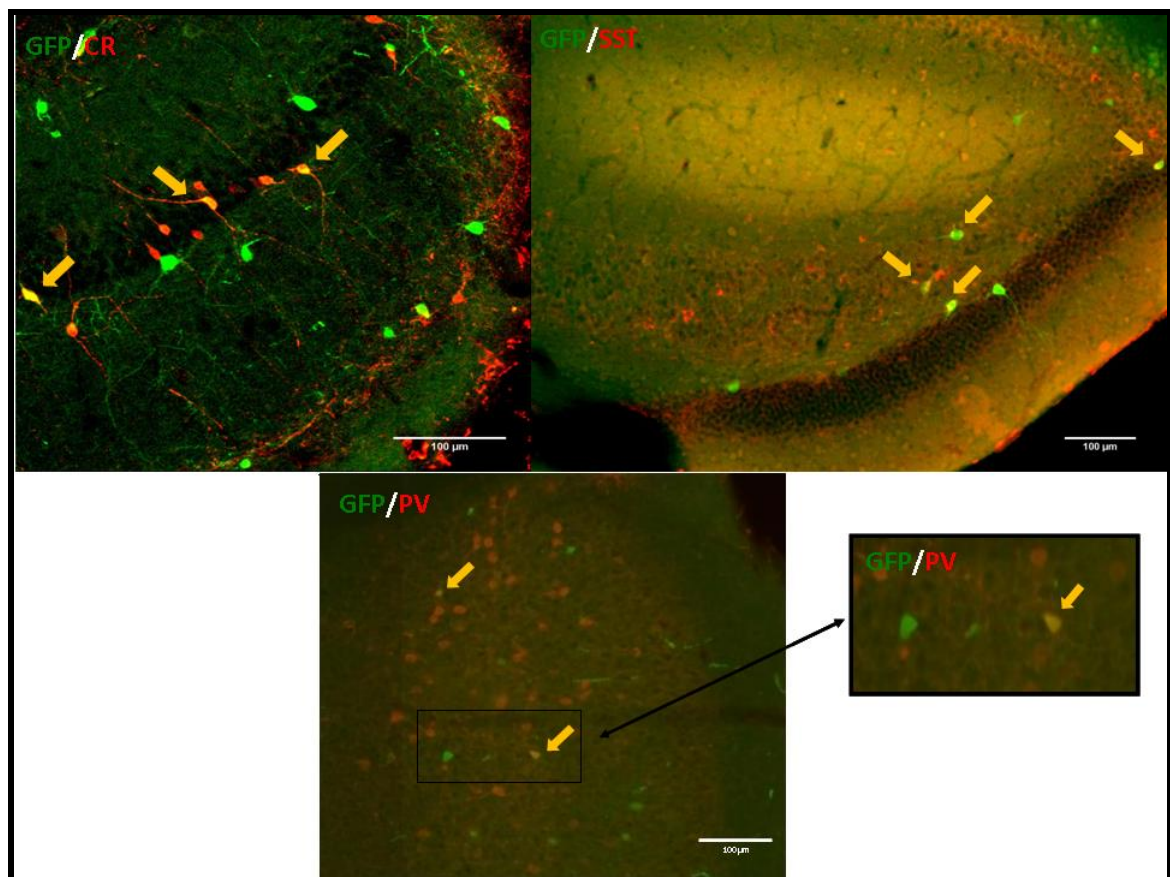


Figura 55: Caracterización molecular de las células derivadas de la MGE criopreservada *in toto* (Síndrome de West) Colocalización inmunohistoquímica de las células GFP positivas provenientes de la MGE con los típicos marcadores de las interneuronas CR; PV y SST. Las flechas señalan las células doble positivas. Barra de escala 100 μm

Discusión

El desarrollo de la terapia celular proporciona nuevas alternativas para el tratamiento de muy diversas neuropatologías, incluida la epilepsia y más en concreto las EEIs [86, 89]. A día de hoy, los protocolos de actuación contra la mayoría de las EEIs se basan en la cirugía o el tratamiento con fármacos, cuya aplicación se ve limitada por el alto índice de farmacoresistencias, sus efectos secundarios indeseables y los problemas psicomotores que puede ocasionar una cirugía en los niños. [1].

Hay que notar que en una gran mayoría de los casos de EEIs se producen por alteraciones en el sistema GABAérgicos o en la correcta migración de sus precursores [14, 110-115], debido en muchos casos a la existencia de diferentes tipos de mutaciones en factores de transcripción clave, como por ejemplo ARX o LHX6[14, 16, 19, 24-28, 116-121]. Por ello, nos propusimos como objetivo principal de la presente Tesis doctoral estudiar si los trasplantes de precursores GABAérgicos derivados de la MGE son capaces de revertir total o parcialmente los fenotipos inherentes a dos modelos de EEIs, como son el de Síndrome de West (causado por mutaciones en *Arx*) [5, 22] y en otro de encefalopatía juvenil causado por una expresión hipomórfica de *Lhx6*[25]. Con este fin, realizamos diferentes ensayos y análisis con los que verificar si los progenitores GABAérgicos son capaces de mejorar sustancialmente los síntomas a nivel fisiológico, morfológico y de comportamiento que conllevan estas patologías.

La elección del tipo celular a trasplantar se basó en sus múltiples propiedades, ya mencionadas en la introducción. Principalmente, cumple con los criterios de migración, distribución, diferenciación, integración, funcionalidad-actividad y seguridad necesarios para realizar una apropiada terapia celular[33, 86]. Además, estos progenitores se diferencian hacia aquellos tipos celulares defectivos en las EEIs de nuestro estudio. Hasta ahora, se han publicado diversos intentos de terapia celular para el tratamiento de la epilepsia, en donde se realizaron trasplantes en modelos animales utilizando tipos celulares como 1) células inmortalizadas y genéticamente modificadas para producir GABA [69, 122, 123], 2) ESCs modificadas para liberar adenosina [124] o cuya diferenciación es dirigida hacia interneuronas por medio de la sobreexpresión de Nkx2.1[125, 126] 3) tejido fetal rico en GABA[68, 73] o 4) precursores derivados del hipocampo y el estriado [65, 66, 127-132]. Sin embargo, ninguno de estos trabajos demostró una migración significativa de células fuera del sitio de inyección, ni un número sustancial de interneuronas GABAérgicas nuevas, ni evidencias de una

modificación selectiva de la transmisión sináptica en el cerebro huésped o la supresión total de crisis espontáneas no inducidas.

Por el contrario, trabajos anteriores de nuestro grupo [36, 86] y de otros laboratorios [91, 95], han demostrado que el trasplante de células derivadas de la MGE puede ser eficaz para modular estados epileptiformes en algunos modelos animales, gracias a su gran capacidad para generar interneuronas GABAérgicas. Estos trabajos han demostrado además cómo estas células son capaces de migrar y distribuirse adecuadamente por todo el parénquima cerebral e integrarse funcionalmente en los circuitos del huésped, amplificando de esta manera el nivel inhibitorio en un cerebro receptor normal [86]. Por otra parte, también se ha demostrado que reducen los niveles de ansiedad [90]; y, como se dijo anteriormente, modifican los estados epileptiformes en modelos animales adultos [36, 91]. Estos resultados previos de nuestro grupo sugieren fuertemente el gran potencial anticonvulsivante y antiepileptogénico de los precursores GABAérgicos de la MGE, demostrando su habilidad de diferenciarse en células capaces de sintetizar y liberar GABA tras su trasplante en un ambiente tanto normal [34-36, 86] como comprometido[35].

Por otra parte, estudios muy recientes (mientras se escribía esta Tesis), del grupo del Dr Baraban, han demostrado cómo el trasplante de los precursores GABAérgicos derivados de la MGE en un modelo de epilepsia de lóbulo temporal (ELT) crónica en adulto es capaz de reducir las crisis epilépticas, así como revertir el comportamiento anormal asociado [91]. Baraban, ya había realizado anteriormente estos trasplantes en el cerebro neonatal con el fin de prevenir los futuros defectos epileptiformes de un modelo de ratón de canalopatía juvenil-adulta [89].

Con estos datos, y dados los antecedentes, hemos realizado los trasplantes en modelos transgénicos de EEIs, ya que faltaba por comprobar el efecto que tendrían estas células al ser trasplantadas en modelos en donde se encuentra mutado algún gen relacionado con la migración y disposición espacial de las interneuronas, desde el desarrollo hasta el mismo momento del nacimiento. Es decir, encefalopatías epilépticas que desde el mismo momento del nacimiento presentan fuertes alteraciones y por tanto los trasplantes se realizan cuando ya existe un estado avanzado de la enfermedad y en un ambiente mutado que puede afectar al desarrollo de las células trasplantadas. Por ello, optamos por un primer modelo del llamado SW, el cual tiene una mutación en el gen *Arx*; que regula la migración y correcta disposición de los precursores neuronales en la corteza. Estos

animales recapitulan completamente el fenotipo de la enfermedad en humanos [5, 16, 22, 117]. El segundo modelo tiene afectado el gen *Lhx6*, en concreto tiene los niveles de expresión reducidos (hipomórficos *Lhx6*) [25]. Estos genes codifican factores de transcripción que juegan papeles críticos en la regulación de la especificidad y diferenciación de neuronas GABAérgicas y Colinérgicas en la EG.[24, 25]

Nuestros resultados ponen de manifiesto que las células procedentes de la MGE trasplantadas son capaces de migrar largas distancias desde el punto de inyección, diferenciarse en interneuronas, substituyendo una pérdida previa de las mismas, lo que logra revertir las alteraciones cerebrales a nivel morfológico, electrofisiológico y los comportamientos anómalos como ansiedad e hiperactividad en los animales modelo, pese a desarrollarse los precursores en un ambiente anómalo. A continuación, vamos a discutir en detalle los resultados obtenidos en cada apartado.

1. Trasplante de precursores GABAérgicos en modelos animales de EEI.

Los resultados obtenidos a partir de los trasplantes de precursores GABAérgicos derivados de la MGE en los modelos animales de SW (*Arx*) y de deficiencia de *Lhx6*, factores de transcripción claves para el desarrollo de las interneuronas, demuestran que estos precursores son capaces recuperar parcialmente y en algunos casos totalmente el déficit inherente de determinados subtipos de interneuronas en el estriado, el hipocampo y la corteza. Así, en el caso del modelo de SW los subtipos de interneuronas en los que se logró una completa recuperación fueron las subpoblaciones de PV en el estriado; SST en hipocampo y estriado; y NpY en hipocampo, corteza y estriado. Mientras que el modelo de deficiencia de *Lhx6* los resultados demuestran una recuperación completa para todos los subtipos de interneuronas en la corteza, mientras que en el hipocampo solo observamos una ligera mejoría.

Los datos sugieren que gracias a esta recuperación en el número de interneuronas se revierte a una situación casi normal en la actividad cerebral y se reducen los comportamientos de ansiedad e hiperactividad que presentan los animales con la mutación. Para nuestro conocimiento, es la primera vez que se logra recupera parte del fenotipo en un animal modelo de SW, el cual padece mutaciones que afectan a la

migración y número de interneuronas desde el mismo momento de su nacimiento. También es la primera vez que se observa una recuperación de comportamiento tras el trasplante en el cerebro neonatal, así como efectos en la actividad cortical y el espectro de ondas mediante EEG, lo que supone un gran avance para la posible futura aplicación clínica de estos precursores en el tratamiento del SW y por ende en otras EElS.

1.1. Supervivencia y migración de los precursores derivados de la MGE.

Tal como sucede en trabajos previos del grupo y de otros laboratorios [34-36, 86] las células trasplantadas logran sobrevivir en un alto porcentaje sin presentar signos de formación de tumores a lo largo del tiempo; demostrándose la gran estabilidad y seguridad de estos trasplantes. La supervivencia media de las células trasplantadas en el modelo de SW fue entorno al 18% (n=5), mientras que en el modelo hipomórfico para *Lhx6* se obtuvo una supervivencia de entorno al 25% (n=5), porcentajes similares al obtenido en otros modelos de epilepsia usados por nuestro grupo anteriormente y también por otros, ($19,9 \pm 3,9$ % [86]; $18 \pm 2,6$ % [35, 36]; aproximadamente 25% [88]; $14,8 \pm 1,3$ % [91])

Aunque estos porcentajes son bastante similares entre sí, existen algunas diferencias apreciables. Uno de los factores que podrían influir significativamente en las diferencias de supervivencia encontradas es la cantidad de células trasplantadas [133]. Se ha publicado recientemente que existe un número máximo de células que sobreviven en un trasplante de precursores derivados de la MGE, ya que existe un límite de saturación en la corteza cerebral para el número de interneuronas. Este límite ronda el 20% por encima del número normal de interneuronas que presenta el cortex. Así, un aumento del número de células trasplantadas no se correspondería necesariamente con un aumento de supervivencia y de nuevas interneuronas. Es decir, puede ser que la bajada de supervivencia en algunos casos sea debida a superar con creces el límite máximo de células que soporta la corteza cerebral, ya que habiendo introducido en exceso interneuronas, estas mueren y producen una bajada relativa de supervivencia.

El número de células que trasplantamos está algo por encima del punto de saturación, por lo que siempre obtenemos valores de entre un 15-18% de supervivencia en el modelo de SW, que se aproxima bastante al 20% máximo de aceptación de nuevas células. Sin

embargo la supervivencia que se produce en el modelo hipomórfico de *Lhx6* es entorno al 25%, algo superior a la del modelo de SW. Ello podría deberse a que la mayor deficiencia que se observa en casi todos los subtipos de interneuronas en este modelo permitiría un mayor margen de entrada de nuevas células y por lo tanto una mayor supervivencia. Otra posibilidad es que la deficiencia en LHX6 sea más permisiva que una reducción de ARX, lo que nos permite obtener unos valores algo más alto de supervivencia, pero siendo siempre valores entorno al $20 \pm 5\%$ de aceptación de nuevas células. No obstante, para confirmar estas posibilidades se debería realizar nuevos trasplantes en paralelo en ambos modelos animales con exactamente el mismo número y lote de células.

Por otra parte, las inyecciones que producimos en cada uno de los hemisferios fueron suficientes para abarcar la mayor parte de las regiones de interés, sin haber causado defecto o alteraciones morfológicas apreciables en el cerebro, y sin apreciar que las mutaciones de cada uno de los modelo afecten a la migración de las células trasplantadas, pese a que estos genes si afectan de forma sustancial a la migración tangencial de las células endógenas [5, 14, 17, 22, 24, 25]. De estos se deduce que el ambiente defectivo en estos factores no influyen a las células trasplantadas o bien en el momento que se realizan los trasplantes los factores no son necesarios para la correcta migración de los precursores trasplantados.

1.2. Diferenciación de los precursores hacia interneuronas maduras

Las células provenientes de la MGE expresan marcadores específicos de interneuronas maduras al mes del trasplante en el cerebro adulto o neonatal [36, 86]. Las cuantificaciones publicadas indican que al menos un 70% de todas las células trasplantadas son interneuronas GABAérgicas, aunque si hablamos en términos de diferenciación hacia neuronas se estima que más de un 90% de estas son interneuronas GABAérgicas, y el resto, entorno al 10-15% se diferencian hacia oligodendrocitos y un 5-10% hacia endotelio [86]. También hay que tener en cuenta que el porcentaje podría ser aun mayor ya que hay que recordar que hemos usado para la detección un anticuerpo contra GAD67, la enzima responsable de sintetizar GABA, en lugar de usar un anticuerpo directo contra GABA, debido a los tradicionales problemas que presenta su

inmunodetección. Recordar que para su detección se haría necesario fijar con glutaraldehído que provoca autofluorescencia, sin embargo en nuestros experimentos hemos fijado con paraformaldehído para preservar el restos de antígenos que necesitábamos estudiar y reducir el nivel de autofluorescencia. Nuestros resultados de cuantificación de dobles positivas para GAD67 muestran una concordancia con los trabajos publicado anteriormente, como se puede observar en la tabla 3 en el apartado de resultados [36, 86].

Por otro lado, destacar que hemos observado que el proceso de diferenciación natural y espontáneo hacia interneuronas GABAérgicas de los precursores derivados de la MGE ha permitido el reemplazo de varios subtipos de interneuronas deficitarios en los dos modelos de EEI que hemos estudiado en la presente Tesis doctoral [22]. Hay que destacar que las células trasplantadas en un entorno defectivo de *ARX* son capaces de diferenciarse y mantenerse en gran número, recuperando parcialmente y en algunos casos totalmente el déficit inherente de determinados subtipos de interneuronas en el estriado, el hipocampo y la corteza. Así, en el caso del modelo de SW los subtipos de interneuronas en los que se logró una completa recuperación fueron las subpoblaciones de PV en el estriado; SST en hipocampo y estriado; y NpY en hipocampo, corteza y estriado. Mientras que el modelo de deficiencia de *Lhx6* los resultados demuestran una recuperación completa para todos los subtipos de interneuronas en la corteza, mientras que en el hipocampo solo observamos una ligera mejoría, en donde no logramos recuperar el número de células del huésped, pudiéndose pensar que la mutación en *Lhx6* sea más permisiva en la corteza, mientras que en el hipocampo la mutación afecte a las células trasplantadas de algún modo y no sea tan permisiva, ya que se ha observado como en hipocampo la supervivencia y diferenciación hacia los distintos subtipos de interneuronas como vemos en la tabla 5 es similar a lo que sucede en un animal WT. Esto esta en consonancia a los resultados obtenidos en densidades, en donde las densidades obtenidas para PV y STT son similares a los hipomórficos *Lhx6* no trasplantados.

Por otro lado, en los resultados de densidad de NpY de ambos modelos se observa como los porcentajes de células GFP+ que expresan NpY procedentes del trasplantes respecto al total de NpY presentes (ver figuras 26 y 39), no son del todo concordante con los aumentos de densidad que se producen en los animales trasplantados con células procedentes de la MGE, lo que nos lleva a pensar que nuestras células además de sustituir los déficit de interneuronas, podrían actuar protegiendo las células endógenas de manera

que el aumento en densidad de NpY sea debido a la nuevas interneuronas y a interneuronas endógenas que no se degeneran. Una posible explicación a este efecto protector que ejercen las células trasplantadas mediante la secreción de factores, o al evitar la muerte de este subtipo celular debido a la reducción de la actividad epileptiforme, produciéndose una bajada de la citotoxicidad debida a la actividad epileptiforme.

Por otra parte, hemos observado que el porcentaje de generación de algunos subtipos de interneuronas puede verse afectado por un entorno defectivo en *Arx* o bien por la actividad epileptiforme que se produce, comparándolo con la diferenciación en un animal control o con resultados publicados previos en otros modelos animales (tabla 3 y 5) [36, 86]. Es llamativa la tendencia al incremento en número y expresión de células NpY+ y SST+, debido seguramente a la reactividad que se produce de estos marcadores en un ambiente epileptogénico, resultado que se encuentra en consonancia con la IR encontrada en las células endógenas para estos marcadores como comentaremos mas adelante [106, 107, 134-136]. La sobreexpresión de NpY y SST, o el mayor número de células positivas para estos marcadores, es concordante con resultados descritos en varios modelos de epilepsia, como pueden ser los de ELT por pilocarpina y kainato, u otros modelos como el de ablación de interneuronas por SSP-Saporina [36, 137].

Sin embargo, en el caso del modelo deficiente en *Lhx6* no se ha observado una sobreexpresión de NpY en la corteza, por lo que nos indicaría que en este caso no existe una reactividad aparente en estos animales deficientes para *Lhx6*.

Otros porcentajes de generación de los diferentes subtipos que se han visto modificados por un entorno genéticamente modificado ha sido la diferenciación hacia SST y CB de las células trasplantadas, en el caso del modelo de SW, y la diferenciación hacia PV en el caso del modelo deficiente en *Lhx6*, resultado que se encuentra en consonancia con la IR obtenida para este marcador en las células trasplantadas en el ambiente deficiente de *Lhx6* como comentaremos más adelante. Estas modificaciones en la generación de los diferentes subtipos pueden deberse a cambios en los programas de diferenciación bajo las nuevas condiciones patológicas.

En este sentido existen estudios donde hay tendencia de un aumento del porcentaje de algunos subtipos como es el caso del modelo de kainato donde se produce una

diferenciación hacia CR+[138-141], lo que encajaría en lo dicho anteriormente donde la diferenciación hacia los diferentes subtipos se encuentra influenciada por el ambiente donde se encuentre.

1.3. Estudios morfológicos de las células trasplantadas

Hasta la fecha no se habían realizado ningún tipo de estudio morfológico ni de inmunoreactividad (IR) en las células trasplantadas procedentes de la MGE. Nosotros hemos realizado estudios de inmunoreactividad a nivel celular en el soma, analizando las células trasplantadas en animales WT y animales mutantes, para de esa forma comprobar si el ambiente mutante influye también en la expresión final de los distintos marcadores. Observamos diferencias de expresión en PV, SST, NpY y CB en los somas de las células trasplantadas respecto a los de una célula endógena desarrollada naturalmente dentro de un animal WT, donde no existe un déficit de interneuronas y la expresión de los marcadores en las células trasplantadas se encuentran disminuido en comparación con las endógenas del propio animal.

Del mismo modo, comprobamos diferencias en los niveles de expresión de todos los marcadores (PV, SST, NpY y CB) entre las interneuronas endógenas de los animales *Arx* CGC7 y los deficientes en *Lhx6* y las endógenas de un ratón WT.

En el caso del modelo de SW se ha observado como existe un aumento de IR en las células endógenas que expresan NpY y SST, que sin ser la diferencias significativa respecto al WT, muestra un resultado en consonancia a lo dicho anteriormente, en el que se ha observado como la expresión de NpY y SST se encuentra aumentada en ambientes epiloogénicos. Se cree que este aumento de expresión de estos marcadores es en respuesta al ambiente [106, 107, 134-136]. En el caso de las células trasplantadas en el modelo de SW, se encuentran con una IR siempre por debajo a las endógenas como ocurre en los animales WT trasplantados. Estos resultados nos sugiere la existencia de algún factor propio del animal huésped que regule la expresión de los distintos marcadores en una célula trasplantada.

Esta sugerencia de regulación por parte del huésped hacia las células trasplantadas, se pone de manifiesto en el modelo de deficiencia en *Lhx6*, donde la mayoría de las células trasplantadas tienen un IR por debajo de las endógenas. Sin embargo, como hemos dicho anteriormente, si nos fijamos en la IR de la PV en la células trasplantadas en un animal hipomórficos *Lhx6* está más alta que la IR de las endógenas del propio mutante, lo que se

encuentra en consonancia con la diferenciación en corteza que se produce hacia las PV en comparación a un WT(tabla 5). Este resultado nos sugiere que existe un factor de regulación negativa que en un ambiente WT regule la diferenciación hacia PV, pero en un ambiente mutantes hipomórfico *Lhx6* este factor, o no exista o tenga algún problema, permitiendo a las células trasplantadas diferenciarse en mayor número hacia PV y tener una mayor expresión de PV

Además de analizar la IR, tal como hemos comentado anteriormente, también estudiamos si el ambiente defectivo en *ARX* o *LHX6* influye en el desarrollo terminal de las células trasplantadas y en la adquisición de su morfología madura. Para ello, nos basamos en el análisis de Sholl, que ofrece una serie de parámetros con los que hemos observado que las células PV+ trasplantadas procedentes de la MGE presentan una morfología similar en un ambiente mutante a la que adquieren en un ambiente control. Ello sugiere que la morfología podría estar determinada a nivel intrínseco y no tener tanta influencia los factores externos a los que están expuestas las células en un ambiente mutante, a diferencia de lo que sí ocurre en los patrones de diferenciación y expresión de las diferentes poblaciones y marcadores estudiados. Aunque estos estudios de morfología hay que realizarlos en el futuro más exhaustivamente, estudiando la morfología en otros subtipos de interneuronas, como SST y CR.

1.4. Efectos sobre el comportamiento.

El modelo animal de SW presenta una serie de anomalías en su comportamiento descritas previamente por el grupo que lo desarrolló [20, 22]. Son animales que muestran una marcada hiperactividad y altos niveles de ansiedad-miedo al analizarse en el campo abierto y el laberinto elevado en cruz. De forma similar, en la presente Tesis hemos mostrado que los mutantes para *Lhx6* también presentan ciertas alteraciones en su comportamiento, comparados con los animales control, pero que no son tan evidentes como en el modelo de SW, al no observarse diferencias en el análisis de la prueba de campo abierto, lo que nos hace pensar que la mutación no provoca hiperactividad en estos mutantes para *Lhx6*, pero sin embargo tienen una tendencia similar a lo que ocurre en el modelo de SW al realizarse la prueba de laberinto elevado en cruz, que sin ser significativas las diferencias nos pueden mostrar que estos animales tienen una mayor ansiedad, cuyas diferencias podríamos verlas acentuada cuando en los animales

hipomórficos presentaran crisis epilépticas, a una edad mayor a la que se han realizado los estudios en la presente Tesis doctoral.

Los estudios de locomoción mediante Rotorod han revelado que los animales *Arx GCG7* aparentemente tiene un problema motor, ya que su latencia de caída es menor, tal como estaba publicado [22, 116]. Sin embargo, nuestras observaciones y resultados nos hacen pensar que las diferencias de latencia en la prueba de Rotarod se deben a la propia hiperactividad que presentan los animales *Arx GCG7* como se ha observado en las pruebas de campo abierto y el laberinto de cruz elevada. Para afirmar esto nos basamos que no existe defecto muscular en estos animales y que los animales presentan una mejoría en latencia con el entrenamiento. Por lo que la condición de hiperactividad y ansiedad haría que los animales se tiraran del rotarod mas que caerse, provocando que los animales *Arx GCG7* tengan un menor tiempo de latencia, pero la mejoría en latencia con el entrenamiento es similar en todos los grupos (figuras 9C y 9D)

Nuestros resultados en las diferentes pruebas de comportamiento están en concordancia con lo publicado anteriormente, ya que los animales mutantes trasplantados mostraron una reducción de ansiedad. Trabajos recientes han demostrado que los trasplantes con precursores GABAérgicos son capaces de reducir los niveles de ansiedad en ratones normales cuando son trasplantados a edades tempranas [90]. Muy recientemente, mientras se escribía esta Tesis, se ha observado también cómo estas células son capaces de controlar comportamientos anormales de hiperactividad y agresividad concomitantes al modelo de ELT por pilocarpina [91]. Incluso trasplantes con células humanas embrionarias diferenciadas hacia precursores GABAérgicos, son capaces de revertir el déficit de aprendizaje y memoria presente en un modelo animal que tiene afectada las funciones cognitivas tras inyectarle saponina [95].

Nuestros datos sugieren fuertemente una correlación positiva entre el incremento en el número de interneuronas, o la recuperación de determinadas subpoblaciones de estas, con las mejoras en el comportamiento a nivel de ansiedad y habituación a nuevos ambientes. Sería interesante estudiar en profundidad esta recuperación en la conducta y extender los estudios a otras pruebas de comportamiento, tales como ensayos de memoria espacial, test de Morris, etc... en donde se evalúe la capacidad cognitiva de aprendizaje y memoria.

1.5. Efectos sobre la actividad electrofisiológica (EEGs).

Los datos indican que las células trasplantadas no solo revierten el déficit de interneuronas en los modelos, sino que a nivel de comportamiento también median una mejoría. Ello sugiere fuertemente una posible modulación de la actividad cerebral del huésped por parte de las células trasplantadas.

Estudios previos del grupo [36, 86] han demostrado que las células de las MGE después de su trasplante en el cerebro neonatal o adulto adquieren características electrofisiológicas de interneuronas maduras al analizarse por patch clamp. Son además capaces de formar contactos sinápticos, lo que ha sido confirmado por microscopía electrónica en animales neonatos [142] y adultos (datos no mostrados de nuestro grupo). Así mismo, mediante patch clamp y EEG se ha demostrado que estas células pueden mediar efectos a nivel electrofisiológico en algunos modelos de neuropatologías [36, 91]. Con estos datos en mano nos planteamos estudiar el efecto de las células trasplantadas a nivel electrofisiológico mediante la realización de EEGs en el modelo de SW. Ello supone que por primera vez se realizó un análisis del espectro de ondas en este modelo animal, así como de la posible modulación de la actividad cerebral a nivel de las ondas por parte de las células trasplantadas.

No obstante, como mencionamos en la introducción, otros animales mutantes para el gen *Arx* si han sido analizados, knock-out para *Arx*, mostrando registros alterados de EEGs, con una actividad anormal en hipocampo y corteza [21]. Se observan alteraciones en las frecuencias de los ritmos Delta y Theta, mientras que en nuestro modelo *Arx* GCG7 hemos observado alteraciones en frecuencias, como son Alfa, Beta y Gamma. Especialmente llamativa es la actividad de fondo, o el espectro de ondas, donde se observan anomalías en los ritmos. Al realizar el análisis de la FFT del espectro de ondas en estos animales muestran un desplazamiento a la derecha del espectro con reducción en la ondas Delta, y un incremento de las ondas Theta, Beta y Gamma [21], siendo similar a lo encontrado en nuestro animales *Arx* GCG7 no trasplantado, que muestran también un desplazamiento a la derecha del espectro pero con reducción en las ondas Delta y Theta y un incremento muy significativos de las ondas Beta y Gamma. Además se ha observado un aumento del número de picos o “spikes” presentes en los animales mutantes, en ambos modelos de SW. Otro de los elementos que se ha encontrado alterado en estos animales es que el intervalo a la que se producen los “spikes” son muy cortos, existiendo grupos de disparos en un breve periodo de tiempo (track de spikes o grupos de

picos), lo que provoca un funcionamiento anómalo del cerebro en su conjunto y llagándoles a producir crisis epilépticas de las cuales algunos no llegan a recuperarse, lo que causa su muerte. Nuestro análisis del registro de EEG a nivel de spikes y el espectro de ondas confirmó que los animales *ARX GCG7* también presentan estas alteraciones anteriormente mencionadas.

Muy significativamente, las células trasplantadas fueron capaces de revertir parcialmente esta situación anómala, llegando a aumentar los tiempos entre grupos de spikes, disminuir la frecuencia de spikes, e incluso casi recuperan totalmente la actividad en los registros de los ritmos Delta y Theta que tendían a desaparecer o se encontraban desplazados hacia la derecha en los animales mutantes. Estos resultados son consistentes con lo publicado anteriormente, en donde los análisis electrofisiológicos de las IPSC muestran que las células derivadas de la MGE son capaces de modificar la actividad de los circuitos inhibitorios en un entorno alterado [35]. Por lo que nuevamente se puede considerar que estos trasplantes como un método excelente para la modulación del sistema inhibitorio y la actividad cerebral.

2. Desarrollo de un protocolo de Criopreservación.

La tercera parte de la Tesis doctoral ha sido el desarrollo de protocolos de criopreservación que nos permitan disponer de una fuente permanente de células derivadas de la MGE para cuando sean necesarias, manteniendo sus características de migración, actividad y diferenciación intrínsecas, y sin que se vea afectada la viabilidad celular.

2.1. Protocolos de Criopreservación

Se establecieron cuatro condiciones de criopreservación (ver material y métodos), eligiendo en todas ellas al DMSO al 10% como crioprotector, ya que en la literatura siempre ha aparecido como el más utilizado y el que mejor resultados proporciona al criopreservar células neuronales similares a las nuestras. Los resultados obtenidos sugieren que los cultivos procedentes de precursores criopreservados *in toto* sería la forma óptima de criopreservación. (Tabla 4). Ello se basa en varios resultados positivos: Por una parte, el alto rendimiento obtenido ($\approx 80\%$) junto a una adecuada viabilidad celular ($\approx 80\%$). Por otro lado, los análisis en cultivo demostraron que la formación de NE no se ve alterada por este proceso de criopreservación, llegando a constituirse las NE a los tres días después de poner las células en cultivo. La capacidad de renovación tampoco se vio alterada, pudiendo realizarse múltiples pases y volviendo a formarse las NE con una calidad y tamaño adecuado. Al contrario de lo que ocurre en el resto de condiciones de cultivo ensayadas, en donde no llegan a formarse en ningún momento las NE, o cuando se forman presentan un aspecto y tamaño irregular, y su tiempo de formación se alarga; o en el caso de la condición 3 que se forma NE después de la descongelación pero que cuando son sometidas a un pase (P1) no vuelven a formarse NE. Ello sugiere que la congelación afecta tanto a la velocidad de división celular, como a la viabilidad y número de células madres y a las células amplificadoras transitorias (TAC, del inglés *transient amplifying cells*).

Los explantes de MGE que fueron criopreservados *in toto* presentan un rápido crecimiento *in vitro*, lo que sugiere que las células amplificadoras se encuentran intactas y permiten una mayor proliferación. Otra posible explicación al rápido crecimiento de las NE y un mayor número de ellas es que se haya producido una mejor preservación de las células madres de largo plazo o que estas mantengan mejor su capacidad de autorenovación. Ello encaja con el hecho de que al realizar múltiples pases las NE

vuelvan a formarse a los tres días rápidamente con un mayor número de NE, a diferencia de lo que sucede en las otras condiciones en las cuales las células madre a largo plazo morirían y solo se mantendrían por poco tiempo las TAC, lo que permitiría unos pases iniciales, pero conllevaría la posterior degeneración del cultivo, como así ocurre.

La mejor preservación de las células madre de largo plazo podría explicarse por la diferencia de tiempo en la entrada del DMSO en el tejido cuando congelamos la MGE *in toto*. Otra posibilidad es que estamos evitando el daño que se puede producir en la membrana celular cuando se realiza la disgregación mecánica antes de proceder a la criopreservación. Es posible que el DMSO dañe más fácilmente a la célula recién disgregada, al tener dañada la membrana celular, y que la entrada de DMSO sea más rápida o entre en mayor cantidad, resultando perjudicial para la célula. Por último, las células derivadas de la MGE que fueron criopreservadas *in toto* conservan las señales paracrinas celulares y los contactos inter-celulares que podrían ser claves para una mejor preservación de las propiedades de las células madre[80].

Por otro lado, los estudios de inmunocaracterización de los cultivos realizados fueron satisfactorios, indicándonos la colocalización de Nestina y GFAP en la práctica totalidad de las células en cultivo (Figura 40). No se apreció células marcadas exclusivamente para GFAP que indicarían la presencia de astrositos y por tanto una diferenciación terminal de los cultivos. Ello sugiere que las células preservadas *in toto* mantienen sus propiedades como progenitoras en estas condiciones de cultivo, uno de los principales requisitos para la puesta a punto de nuestro sistema de preservación. Además se observó un porcentaje muy pequeño de células positivas para MAP-2 (5-7%), sugiriendo que las condiciones de cultivo están manteniendo un estado de indiferenciación en la mayoría de las células.

2.2. Trasplantes en ratones de Células procedentes de la MGE criopreservadas.

Con el fin de comprobar que las células procedentes de la MGE criopreservadas *in toto* siguen siendo capaces de diferenciarse hacia los diferentes subtipos de interneuronas, realizamos una serie de trasplantes en animales neonatos y adulto. Nuestros resultados indican que esta condición de criopreservación *in toto* es capaz de mantener intactas las propiedades de migración y diferenciación de las células de la MGE, al observarse como las células procedentes de la MGE y criopreservadas *in toto* fueron capaces de diferenciarse hacia los principales subtipos de interneuronas GABAérgicas, como CR,

PV y SST. Así mismo se ha observado cómo han sido capaces de migrar largas distancias desde la zona de inyección, y que los porcentajes de diferenciación no se han visto afectado por el proceso de Criopreservación. Por último, se ha comprobado que son capaces de sobrevivir en un cerebro adulto durante más de un año sin presentar signos de formación de tumores, demostrando que incluso con un proceso de criopreservación previo al trasplante siguen teniendo una gran estabilidad y seguridad los trasplantes.

3. APLICABILIDAD CLÍNICA DE LOS RESULTADOS

Hasta donde tenemos conocimiento, hemos sido los primeros en realizar este tipo de trasplante en un modelo de encefalopatía que afecta a ratones neonatos, en donde el trasplante se realiza de forma posterior a la pérdida de interneuronas y problemas psicomotrices inherente de esta patología. Este resultado es completamente novedoso y con una diferencia importante a los llevados a cabo por otros grupos en ratones modelo neonatos, como el grupo del Dr. Baraban, que realizó el trasplante en animales neonatos con el fin de prevenir los futuros defectos epileptiformes de un modelo de ratón de canalopatía juvenil-adulta. Estos ratones portaban una mutación de pérdida de función en un canal de potasio (*kv1.1/kcna1*), lo que les provoca a las 4-5 semanas de edad crisis epilépticas [89]. Así, los trasplantes realizados por este grupo son previos a la aparición de las crisis y el desarrollo de las células es en un ambiente normal.

Este aspecto es de suma importancia en la clínica, donde la mayoría de las intervenciones se realizan cuando los defectos, daños o problemas derivados de la enfermedad son evidentes y en un estadio avanzado, de forma similar a lo que hemos realizados en nuestros modelos. Por tanto, nuestros resultados demuestran que es posible abordar terapéuticamente este tipo de patologías cuando ya son evidentes sus síntomas.

Sin embargo, aunque los resultados obtenidos creemos que arrojan resultados muy positivos y relevantes, antes de poder aplicar en la clínica este tipo de terapia, primero necesitamos ampliar el número de animales, en el caso de los modelos usados, y ver la supervivencia de estos animales a lo largo del tiempo, de modo que veamos un efecto duradero en el tiempo, y segundo los precursores GABAérgicos criopreservados tendríamos que trasplantarlos en ambientes epileptogénicos y ambientes genéticos como los modelo usados en la presente Tesis doctoral, de manera que observemos si las células criopreservadas reproducen de igual forma que las células trasplantadas en fresco;

y tercero necesitaríamos ensayar con células humanas para observar si se comportan igual que las células murinas. En nuestro laboratorio, ya se están llevando a cabo este tipo de experimentos, de forma que den más solidez a los resultados obtenidos en la presente Tesis doctoral.

Finalmente, hay que recordar que aunque los resultados obtenidos son prometedores, no se debe ignorar que al realizar un ensayo clínico hay que establecer muy bien todos los parámetros, tener los conocimientos suficientes y que las herramientas necesarias estén puesta a punto para obtener el éxito del ensayo. Los modelos animales nos facilitan la elección para determinar qué estrategia se debe desarrollar y cómo se debe aplicar, pero siempre hay que tener en cuenta que nunca un ensayo en modelos animales nos garantiza la eficacia y posibles efectos secundarios en los tratamientos de encefalopatías en humanos. De manera que espero que le presente tesis doctoral ayude a encontrar un camino que podamos seguir y que con nuestros esperanzadores resultados y basándonos en la terapia celular logremos, al menos, mejorar la calidad de vida de los pacientes y sus familiares a medio plazo.

Igualmente hay que indicar que el tipo de estrategia terapéutica que proponemos cumple la mayoría de los requisitos para una buena terapia celular: (1) supervivencia de las células trasplantadas a largo plazo; (2) migración de las mismas hasta la capa celular apropiada; (3) diferenciación hacia el fenotipo correcto y en número suficiente; (4) integración en los circuitos locales del huésped, (5) una plena funcionalidad, estableciendo conexiones con las células huésped y otras células trasplantadas, siendo capaces de modificar la actividad neuronal del receptor y revertir comportamiento anómalos en el huésped; (6) seguridad, al no formar tumores ni aparentes efectos secundarios, y por último (7) Disponibilidad para su uso en Terapia, al conseguir implementar un protocolo de criopreservación viable.

Conclusiones Tesis

1. El trasplante de precursores GABAérgicos derivados de la MGE a edad perinatal reemplaza la pérdida de interneuronas que padecen los modelos animales de EEIs generados por mutaciones en los genes *Arx* y *Lhx6*.
2. La migración y adquisición de una morfología madura de interneurona por parte de las células derivadas de la MGE trasplantadas no se ve alterada a causa de las mutaciones en *Arx* o *Lhx6*.
3. La expresión de SST, PV y NPY en las células derivadas del trasplante se encuentra elevada en respuesta a un ambiente epileptogénico causado por mutaciones en *Arx* y *Lhx6*.
4. El trasplante de precursores GABAérgicos derivados de MGE en el modelo animal de síndrome de West por mutaciones en *Arx* es capaz de corregir los comportamientos anómalos que sufre a nivel de hiperactividad y ansiedad.
5. Existe una correlación positiva entre estas mejoras en el comportamiento con la reducción de los espasmos epilépticos y la recuperación de la actividad rítmica cerebral que se observa tras el trasplante de precursores GABAérgicos de la MGE
6. La criopreservación de la MGE *in toto* en presencia de 10% de DMSO permite mantener intactas las características de migración y diferenciación de los precursores GABAérgicos.
7. El trasplante de precursores GABAérgicos derivados de la MGE es una aproximación terapéutica válida para el tratamiento de EEIs en cuya etiología se encuentren las alteraciones del sistema GABAérgico.

Bibliografía

1. Jr., J.E., *ILAE classification of epilepsy syndromes*. Epilepsy Research, 2006. **70S**: p. S5–S10.
2. Dulac, O., *Epileptic Encephalopathy*. Epilepsia, 2001. **42**(Suppl. 3): p. 23-26.
3. Depienne C, G.-A.I., Baulac S, LeGuern E., *Genes in infantile epileptic encephalopathies*. National Center for Biotechnology Information (US), 2012.
4. Paschou P, S.E., Karagiannidis I, Rizzo R, Tarnok Z, Wolanczyk T, Hebebrand J, Nöthen MM, Lehmkuhl G, Farkas L, Nagy P, Szymanska U, Lykidis D, Androutsos C, Tsironi V, Koumoula A, Barta C, Klidonas S, Ypsilantis P, Simopoulos C; TSGeneSEE Consortium, Skavdis G, Grigoriou M., *Evaluation of the LIM homeobox genes LHX6 and LHX8 as candidates for Tourette syndrome*. Genes Brain Behav., 2012. **11**(4): p. 444-51.
5. Kitamura K, Y.M., Sugiyama N, Miura H, Iizuka-Kogo A, Kusaka M, Omichi K, Suzuki R, Kato-Fukui Y, Kamiirisa K, Matsuo M, Kamijo S, Kasahara M, Yoshioka H, Ogata T, Fukuda T, Kondo I, Kato M, Dobyns WB, Yokoyama M, Morohashi K., *Mutation of ARX causes abnormal development of forebrain and testes in mice and X-linked lissencephaly with abnormal genitalia in humans*. Nat Genet., 2002. **32**(3): p. 359-69.
6. Stromme, P., et al., *Mutations in the human ortholog of Aristaless cause X-linked mental retardation and epilepsy*. Nat Genet, 2002. **30**(4): p. 441-5.
7. West, W.J., *On a peculiar form of infantile convulsions*. Lancet, 1841. **1**: p. 724-725.
8. Kato, M., *A new paradigm for West syndrome based on molecular and cell biology*. Epilepsy Res, 2006. **70 Suppl 1**: p. S87-95.
9. Orphanet *Informe periódico de Orphanet*. Serie de Enfermedades Raras, 2013. **2**.
10. Cho, G., et al., *Distinct DNA binding and transcriptional repression characteristics related to different ARX mutations*. Neurogenetics, 2012.
11. Gecz, J., D. Cloosterman, and M. Partington, *ARX: a gene for all seasons*. Curr Opin Genet Dev, 2006. **16**(3): p. 308-16.
12. Tod Fullston, L.B., Tracey Willis, Sunny Philip, Lesley MacPherson, Merran Finnis, Jozef Gecz, and Jenny Morton, *Ohtahara syndrome in a family with an ARX protein truncation mutation (c.81C>G/p.Y27X)*. Eur J Hum Genet., 2010. **18**(2): p. 157–162.
13. Biressi S, M.G., Collombat P, Tagliafico E, Monteverde S, Benedetti L, Cusella De Angelis MG, Mansouri A, Ferrari S, Tajbakhsh S, Broccoli V, Cossu G, *The homeobox gene Arx is a novel positive regulator of embryonic myogenesis*. Cell Death Differ., 2008. **15**(1): p. 94-104.
14. Colasante G, C.P., Raimondi V, Bonanomi D, Ferrai C, Maira M, Yoshikawa K, Mansouri A, Valtorta F, Rubenstein JL, Broccoli V., *Arx is a direct target of Dlx2 and thereby contributes to the tangential migration of GABAergic interneurons*. J Neurosci., 2008. **28**(42): p. 10674-86.
15. Friocourt G, K.S., Tabata H, Yozu M, Takahashi T, Antypa M, Raguénès O, Chelly J, Férec C, Nakajima K, Parnavelas JG., *Cell-autonomous roles of ARX in cell proliferation and neuronal migration during corticogenesis*. J Neurosci., 2008. **28**(22): p. 5794-805.
16. Friocourt, G., et al., *The role of ARX in cortical development*. Eur J Neurosci, 2006. **23**(4): p. 869-76.
17. Colombo, E., et al., *Inactivation of Arx, the murine ortholog of the X-linked lissencephaly with ambiguous genitalia gene, leads to severe disorganization of*

- the ventral telencephalon with impaired neuronal migration and differentiation. J Neurosci*, 2007. **27**(17): p. 4786-98.
18. Collombat P, M.A., Hecksher-Sorensen J, Serup P, Krull J, Gradwohl G, Gruss P., *Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development. Genes Dev.* , 2003. **17**(20): p. 2591-603.
 19. Marsh E, F.C., Gomez E, Nasrallah I, Minarcik J, Sudi J, Christian SL, Mancini G, Labosky P, Dobyns W, Brooks-Kayal A, Golden JA., *Targeted loss of Arx results in a developmental epilepsy mouse model and recapitulates the human phenotype in heterozygous females. Brain.* , 2009. **132**(Pt 6): p. 1563-76.
 20. Price, M.G., et al., *A triplet repeat expansion genetic mouse model of infantile spasms syndrome, Arx(GCG)10+7, with interneuronopathy, spasms in infancy, persistent seizures, and adult cognitive and behavioral impairment. J Neurosci*, 2009. **29**(27): p. 8752-63.
 21. Marsh, E.D. and J.A. Golden, *Developing an animal model for infantile spasms: pathogenesis, problems and progress. Dis Model Mech*, 2009. **2**(7-8): p. 329-35.
 22. Kitamura, K., et al., *Three human ARX mutations cause the lissencephaly-like and mental retardation with epilepsy-like pleiotropic phenotypes in mice. Hum Mol Genet*, 2009. **18**(19): p. 3708-24.
 23. Paciorkowski AR, T.L., Dobyns WB., *Genetic and biologic classification of infantile spasms. Pediatr Neurol.* , 2011. **45**(6): p. 355-67.
 24. Liodis P, D.M., Grigoriou M, Akufo-Addo C, Yanagawa Y, Pachnis V., *Lhx6 activity is required for the normal migration and specification of cortical interneuron subtypes. J Neurosci.*, 2007. **27**(12): p. 3078-89.
 25. Neves G, S.M., Liodis P, Achimastou A, Denaxa M, Roalfe G, Sesay A, Walker MC, Pachnis V., *The LIM Homeodomain Protein Lhx6 Regulates Maturation of Interneurons and Network Excitability in the Mammalian Cortex. Cereb Cortex.*, 2013. **23**(8): p. 1811-23.
 26. Grigoriou M, T.A., Sharpe PT, Pachnis V., *Expression and regulation of Lhx6 and Lhx7, a novel subfamily of LIM homeodomain encoding genes, suggests a role in mammalian head development. Development.*, 1998. **125**(11): p. 2063-74.
 27. Frangkouli A, v.W.N., Lopes R, Kessarar N, Pachnis V., *LIM homeodomain transcription factor-dependent specification of bipotential MGE progenitors into cholinergic and GABAergic striatal interneurons. Development.*, 2009. **136**(22): p. 3841-51.
 28. Zhao, Y., et al., *Distinct molecular pathways for development of telencephalic interneuron subtypes revealed through analysis of Lhx6 mutants. J Comp Neurol*, 2008. **510**(1): p. 79-99.
 29. R., R., *ACTH therapy of West syndrome: Finnish views. Brain Dev.* , 2001. **23**(7): p. 642-6.
 30. H, J., *Justification of vigabatrin administration in West syndrome patients? Warranting a re-consideration for improvement in their quality of life. Clin Neurol Neurosurg.* , 2009. **111**(2): p. 111-4.
 31. Agency, E.M., *Buccolam midazolam*, E.M. Agency, Editor 2011, European Medicines Agency.
 32. Elena Arce-Portillo, M.R.-C., Beatriz Muñoz-Cabello, Bárbara Blanco-Martínez, and L.R.-D.P. Marcos Madruga-Garrido, Ramón Candau Fernández-Mensaque, *Síndrome de West: etiología, opciones terapéuticas, evolución clínica y factores pronósticos. Rev Neurol*, 2011. **52**(2): p. 81-89.

33. Alvarez Dolado, M. and V. Broccoli, *GABAergic neuronal precursor grafting: implications in brain regeneration and plasticity*. *Neural Plast*, 2011. **2011**: p. 384216.
34. Calcagnotto, M.E., et al., *Effect of neuronal precursor cells derived from medial ganglionic eminence in an acute epileptic seizure model*. *Epilepsia*, 2010. **51 Suppl 3**: p. 71-5.
35. Calcagnotto, M.E., et al., *Grafting of GABAergic precursors rescues deficits in hippocampal inhibition*. *Epilepsia*, 2010. **51 Suppl 3**: p. 66-70.
36. Zipancic, I., et al., *Transplant of GABAergic precursors restores hippocampal inhibitory function in a mouse model of seizure susceptibility*. *Cell Transplant*, 2010. **19**(5): p. 549-64.
37. Lovell-Badge, R., *The future for stem cell research*. *Nature*, 2001. **414**(6859): p. 88-91.
38. Temple, S., *The development of neural stem cells*. *Nature*, 2001. **414**(6859): p. 112-7.
39. Gage, F.H., *Mammalian neural stem cells*. *Science*, 2000. **287**(5457): p. 1433-8.
40. Evans, M.J. and M.H. Kaufman, *Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos*. *Nature*, 1981. **292**(5819): p. 154-6.
41. Martin, G.R., *Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981. **78**(12): p. 7634-8.
42. Donovan, P.J. and J. Gearhart, *The end of the beginning for pluripotent stem cells*. *Nature*, 2001. **414**(6859): p. 92-7.
43. Bjorklund, L.M., et al., *Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(4): p. 2344-9.
44. Olsson, M., et al., *Extensive migration and target innervation by striatal precursors after grafting into the neonatal striatum*. *Neuroscience*, 1997. **79**(1): p. 57-78.
45. Kanatsu-Shinohara, M., et al., *Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis*. *Cell*, 2004. **119**(7): p. 1001-12.
46. Shambloott, M.J., et al., *Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(23): p. 13726-31.
47. Ming, G.L. and H. Song, *Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system*. *Annu Rev Neurosci*, 2005. **28**: p. 223-50.
48. Doetsch, F., J.M. Garcia-Verdugo, and A. Alvarez-Buylla, *Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain*. *J Neurosci*, 1997. **17**(13): p. 5046-61.
49. Alvarez-Buylla, A., B. Seri, and F. Doetsch, *Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain*. *Brain Res Bull*, 2002. **57**(6): p. 751-8.
50. Liu Z, M.L., *Olfactory bulb core is a rich source of neural progenitor and stem cells in adult rodent and human*. *J Comp Neurol*, 2003. **459**(4): p. 368-91.
51. Honchar, M.P., J.W. Olney, and W.R. Sherman, *Systemic cholinergic agents induce seizures and brain damage in lithium-treated rats*. *Science*, 1983. **220**(4594): p. 323-5.
52. Jope, R.S., R.A. Morrisett, and O.C. Snead, *Characterization of lithium potentiation of pilocarpine-induced status epilepticus in rats*. *Exp Neurol*, 1986. **91**(3): p. 471-80.

53. Milgram, N.W., et al., *Establishment of status epilepticus by limbic system stimulation in previously unstimulated rats*. *Exp Neurol*, 1985. **88**(2): p. 253-64.
54. McIntyre, D.C., K.A. Stokes, and N. Edson, *Status epilepticus following stimulation of a kindled hippocampal focus in intact and commissurotomized rats*. *Exp Neurol*, 1986. **94**(3): p. 554-70.
55. White, H.S., *Preclinical development of antiepileptic drugs: past, present, and future directions*. *Epilepsia*, 2003. **44 Suppl 7**: p. 2-8.
56. Martin, J.L. and R.S. Sloviter, *Focal inhibitory interneuron loss and principal cell hyperexcitability in the rat hippocampus after microinjection of a neurotoxic conjugate of saporin and a peptidase-resistant analog of Substance P*. *J Comp Neurol*, 2001. **436**(2): p. 127-52.
57. Martin LJ, L.Z., *Adult olfactory bulb neural precursor cell grafts provide temporary protection from motor neuron degeneration, improve motor function, and extend survival in amyotrophic lateral sclerosis mice*. *J Neuropathol Exp Neurol.*, 2007. **66**(11): p. 1002-18.
58. Takahashi K, Y.S., *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. *Cell.*, 2006. **126**(4): p. 663-76.
59. Martino, G. and S. Pluchino, *The therapeutic potential of neural stem cells*. *Nat Rev Neurosci*, 2006. **7**(5): p. 395-406.
60. SeveralAuthors, *Numero dedicado integramente a la terapia celular aplicada al sistema nervioso*. *NeuroRx*, 2004. **1**(4).
61. Bjorklund, A. and O. Lindvall, *Cell replacement therapies for central nervous system disorders*. *Nat Neurosci*, 2000. **3**(6): p. 537-44.
62. Kriegstein, A.R. and A. Pitkanen, *Commentary: the prospect of cell-based therapy for epilepsy*. *Neurotherapeutics*, 2009. **6**(2): p. 295-9.
63. Raedt, R., et al., *Cell therapy in models for temporal lobe epilepsy*. *Seizure*, 2007. **16**(7): p. 565-78.
64. Ruschenschmidt, C., et al., *Functional properties of ES cell-derived neurons engrafted into the hippocampus of adult normal and chronically epileptic rats*. *Epilepsia*, 2005. **46 Suppl 5**: p. 174-83.
65. Shetty, A.K. and B. Hattiangady, *Concise review: prospects of stem cell therapy for temporal lobe epilepsy*. *Stem Cells*, 2007b. **25**(10): p. 2396-407.
66. Shetty, A.K., V. Zaman, and B. Hattiangady, *Repair of the injured adult hippocampus through graft-mediated modulation of the plasticity of the dentate gyrus in a rat model of temporal lobe epilepsy*. *J Neurosci*, 2005. **25**(37): p. 8391-401.
67. Hattiangady, B., M.S. Rao, and A.K. Shetty, *Grafting of striatal precursor cells into hippocampus shortly after status epilepticus restrains chronic temporal lobe epilepsy*. *Exp Neurol*, 2008. **212**(2): p. 468-81.
68. Loscher, W., et al., *Seizure suppression in kindling epilepsy by grafts of fetal GABAergic neurons in rat substantia nigra*. *J Neurosci Res*, 1998. **51**(2): p. 196-209.
69. Thompson, K.W., *Genetically engineered cells with regulatable GABA production can affect afterdischarges and behavioral seizures after transplantation into the dentate gyrus*. *Neuroscience*, 2005. **133**(4): p. 1029-37.
70. Thompson, K.W. and L.M. Suchomelova, *Transplants of cells engineered to produce GABA suppress spontaneous seizures*. *Epilepsia*, 2004. **45**(1): p. 4-12.

71. Amariglio, N., et al., *Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient*. PLoS Med, 2009. **6**(2): p. e1000029.
72. Butt, S.J., et al., *Transcriptional regulation of cortical interneuron development*. J Neurosci, 2007. **27**(44): p. 11847-50.
73. Fine, A., B.S. Meldrum, and S. Patel, *Modulation of experimentally induced epilepsy by intracerebral grafts of fetal GABAergic neurons*. Neuropsychologia, 1990. **28**(6): p. 627-34.
74. Stevens, J.R., et al., *Cerebral transplants for seizures: preliminary results*. Epilepsia, 1988. **29**(6): p. 731-7.
75. Gelman DM, M.F., Nóbrega-Pereira S, Pierani A, Kessar N, Marín O., *The embryonic preoptic area is a novel source of cortical GABAergic interneurons*. J Neurosci., 2009. **29**(29): p. 9380-9.
76. Marin, O. and J.L. Rubenstein, *A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon*. Nat Rev Neurosci, 2001. **2**(11): p. 780-90.
77. Xu, Q., et al., *Origins of cortical interneuron subtypes*. J Neurosci, 2004. **24**(11): p. 2612-22.
78. Flames, N., et al., *Delineation of multiple subpallial progenitor domains by the combinatorial expression of transcriptional codes*. J Neurosci, 2007. **27**(36): p. 9682-95.
79. Butt, S.J., et al., *The temporal and spatial origins of cortical interneurons predict their physiological subtype*. Neuron, 2005. **48**(4): p. 591-604.
80. Wichterle, H., et al., *In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain*. Development, 2001. **128**(19): p. 3759-71.
81. Wonders, C.P., et al., *A spatial bias for the origins of interneuron subgroups within the medial ganglionic eminence*. Dev Biol, 2008. **314**(1): p. 127-36.
82. Miyoshi G, B.S., Takebayashi H, Fishell G., *Physiologically distinct temporal cohorts of cortical interneurons arise from telencephalic Olig2-expressing precursors*. J Neurosci., 2007. **27**(29): p. 7786-98.
83. Nery S, F.G., Corbin JG., *The caudal ganglionic eminence is a source of distinct cortical and subcortical cell populations*. Nat Neurosci. , 2002. **5**(12): p. 1279-87.
84. Miyoshi G, H.-L.J., Karayannis T, Sousa VH, Butt SJ, Battiste J, Johnson JE, Machold RP, Fishell G., *Genetic fate mapping reveals that the caudal ganglionic eminence produces a large and diverse population of superficial cortical interneurons*. J Neurosci., 2010. **30**(5): p. 1582-94.
85. Wichterle, H., et al., *Permissive corridor and diffusible gradients direct medial ganglionic eminence cell migration to the neocortex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(2): p. 727-32.
86. Alvarez-Dolado, M., et al., *Cortical inhibition modified by embryonic neural precursors grafted into the postnatal brain*. J Neurosci, 2006. **26**(28): p. 7380-9.
87. Wichterle, H., et al., *Young neurons from medial ganglionic eminence disperse in adult and embryonic brain*. Nat Neurosci, 1999. **2**(5): p. 461-6.
88. Tanaka DH, T.K., Kubo K, Nabeshima T, Nakajima K., *GABAergic precursor transplantation into the prefrontal cortex prevents phencyclidine-induced cognitive deficits*. J Neurosci. , 2011. **31**(40): p. 14116-25.
89. Baraban, S.C., et al., *Reduction of seizures by transplantation of cortical GABAergic interneuron precursors into Kv1.1 mutant mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(36): p. 15472-7.

90. Valente MF, R.S., Calcagnotto ME, Ruiz L, Mello LE, Frussa-Filho R, Longo BM., *Postnatal transplantation of interneuronal precursor cells decreases anxiety-like behavior in adult mice*. Cell Transplant. , 2012: p. [Epub ahead of print].
91. Hunt RF, G.K., Rubenstein JL, Alvarez-Buylla A, Baraban SC., *GABA progenitors grafted into the adult epileptic brain control seizures and abnormal behavior*. Nat Neurosci., 2013. **16**(6): p. 692-7.
92. Moore KA, K.T., Karchewski LA, Scholz J, Baba H, Woolf CJ., *Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord*. J Neurosci., 2002. **22**(15): p. 6724-31.
93. Lee JW, J.S., Furmanski O, Gajavelli S, Sagen J., *Predifferentiated GABAergic neural precursor transplants for alleviation of dysesthetic central pain following excitotoxic spinal cord injury*. Front Physiol., 2012. **3**: p. 167.
94. Chen YJ, V.D., Wang Y, Visel A, Silberberg SN, Nicholas CR, Danjo T, Pollack JL, Pennacchio LA, Anderson S, Sasai Y, Baraban SC, Kriegstein AR, Alvarez-Buylla A, Rubenstein JL., *Use of "MGE enhancers" for labeling and selection of embryonic stem cell-derived medial ganglionic eminence (MGE) progenitors and neurons*. PLoS One., 2013. **8**(5): p.:e61956. doi: 10.1371/journal.pone.0061956.
95. Liu Y, W.J., Liu H, Krencik R, Zhang X, Ma L, Zhou GM, Ayala M, Zhang SC., *Medial ganglionic eminence-like cells derived from human embryonic stem cells correct learning and memory deficits*. Nat Biotechnol. , 2013. **31**(5): p. 440-7.
96. Negishi, T., et al., *Cryopreservation of brain tissue for primary culture*. Exp Anim, 2002. **51**(4): p. 383-90.
97. Petite, D. and M.C. Calvet, *Cryopreserved GABAergic neurons in cultures of rat cerebral cortex and mesencephalon: a comparative morphometric study with anti-GABA antibodies*. Brain Res, 1997. **747**(2): p. 279-89.
98. Reubinoff, B.E., et al., *Effective cryopreservation of human embryonic stem cells by the open pulled straw vitrification method*. Hum Reprod, 2001. **16**(10): p. 2187-94.
99. Negishi T, I.Y., Kawamura S, Kuroda Y, Yoshikawa Y., *Cryopreservation of brain tissue for primary culture*. Exp Anim. , 2002. **51**(4): p. 383-90.
100. Higgins AZ, C.D., LaPlaca MC, Karlsson JO., *Effects of freezing profile parameters on the survival of cryopreserved rat embryonic neural cells*. J Neurosci Methods. , 2011. **201**(1): p. 9-16.
101. Petite D, C.M., *Cryopreserved GABAergic neurons in cultures of rat cerebral cortex and mesencephalon: a comparative morphometric study with anti-GABA antibodies*. Brain Res. , 1997. **747**(2): p. 279-89.
102. Chauvière L, R.N., Thinus-Blanc C, Bartolomei F, Esclapez M, Bernard C., *Early deficits in spatial memory and theta rhythm in experimental temporal lobe epilepsy*. J Neurosci. , 2009. **29**(17): p. 5402-10.
103. Tejada S, G.J., Rial RV, Coenen AM, Gamundí A, Esteban S., *Electroencephalogram functional connectivity between rat hippocampus and cortex after pilocarpine treatment*. Neuroscience., 2010. **165**(2): p. 621-31.
104. Aydin-Abidin S, Y.M., Abidin I, Akca M, Cansu A., *Comparison of focally induced epileptiform activities in C57BL/6 and BALB/c mice by using in vivo EEG recording*. Neurosci Lett., 2011. **504**(2): p. 165-9.
105. Asada, H., et al., *Mice lacking the 65 kDa isoform of glutamic acid decarboxylase (GAD65) maintain normal levels of GAD67 and GABA in their brains but are susceptible to seizures*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **229**(3): p. 891-5.

106. Vezzani, A. and G. Sperk, *Overexpression of NPY and Y2 receptors in epileptic brain tissue: an endogenous neuroprotective mechanism in temporal lobe epilepsy?* *Neuropeptides*, 2004. **38**(4): p. 245-52.
107. Olesen MV, C.S., Gøtzsche CR, Holst B, Kokaia M, Woldbye DP., *Y5 neuropeptide Y receptor overexpression in mice neither affects anxiety- and depression-like behaviours nor seizures but confers moderate hyperactivity.* *Neuropeptides.*, 2012. **46**(2): p. 71-9.
108. SHOLL A, U.A., *Pattern discrimination and the visual cortex.* *Nature*, 1953. **171**(4348): p. 387-8.
109. Skogh, C., M. Parmar, and K. Campbell, *The differentiation potential of precursor cells from the mouse lateral ganglionic eminence is restricted by in vitro expansion.* *Neuroscience*, 2003. **120**(2): p. 379-85.
110. Houser, C.R., *GABA neurons in seizure disorders: a review of immunocytochemical studies.* *Neurochem Res*, 1991. **16**(3): p. 295-308.
111. Gupta, A., Y. Wang, and H. Markram, *Organizing principles for a diversity of GABAergic interneurons and synapses in the neocortex.* *Science*, 2000. **287**(5451): p. 273-8.
112. Baulac, S., et al., *First genetic evidence of GABA(A) receptor dysfunction in epilepsy: a mutation in the gamma2-subunit gene.* *Nat Genet*, 2001. **28**(1): p. 46-8.
113. Jiang, M., et al., *GABAergic neurons that pioneer hippocampal area CA1 of the mouse: morphologic features and multiple fates.* *J Comp Neurol*, 2001. **439**(2): p. 176-92.
114. Treiman, D.M., *GABAergic mechanisms in epilepsy.* *Epilepsia*, 2001. **42 Suppl 3**: p. 8-12.
115. G., D.C., *Development of cortical GABAergic circuits and its implications for neurodevelopmental disorders.* *Clin Genet.* , 2007. **72**(1): p. 1-8.
116. Okazaki S, O.M., Kuki I, Kawawaki H, Koriyama T, Ri S, Ichiba H, Hai E, Inoue T, Nakamura H, Goto Y, Tomiwa K, Yamano T, Kitamura K, Itoh M., *Aristaless-related homeobox gene disruption leads to abnormal distribution of GABAergic interneurons in human neocortex: evidence based on a case of X-linked lissencephaly with abnormal genitalia (XLAG).* *Acta Neuropathol.* , 2008. **116**(4): p. 453-62.
117. Friocourt, G. and J.G. Parnavelas, *Mutations in ARX Result in Several Defects Involving GABAergic Neurons.* *Front Cell Neurosci*, 2010. **4**: p. 4.
118. Shoubridge, C., T. Fullston, and J. Gecz, *ARX spectrum disorders: making inroads into the molecular pathology.* *Hum Mutat*, 2010. **31**(8): p. 889-900.
119. Shoubridge C, T.M., Seiboth G, Gécz J, *ARX homeodomain mutations abolish DNA binding and lead to a loss of transcriptional repression.* *Hum Mol Genet.* , 2012. **21**(7): p. 1639-47.
120. Flandin P, Z.Y., Vogt D, Jeong J, Long J, Potter G, Westphal H, Rubenstein JL., *Lhx6 and Lhx8 coordinately induce neuronal expression of Shh that controls the generation of interneuron progenitors.* *Neuron*, 2011. **70**(5): p. 939-50.
121. Denaxa M, S.P., Pachnis V., *The LIM homeodomain transcription factors Lhx6 and Lhx7 are key regulators of mammalian dentition.* *Dev Biol.*, 2009. **333**(2): p. 324-36.
122. Gernert, M., et al., *Genetically engineered GABA-producing cells demonstrate anticonvulsant effects and long-term transgene expression when transplanted into the central piriform cortex of rats.* *Exp Neurol*, 2002. **176**(1): p. 183-92.

123. Thompson, K., et al., *Conditionally immortalized cell lines, engineered to produce and release GABA, modulate the development of behavioral seizures.* Exp Neurol, 2000. **161**(2): p. 481-9.
124. Li T, S.J., Lusardi T, Koch P, Lan JQ, Wilz A, Segschneider M, Simon RP, Brüstle O, Boison D., *Suppression of kindling epileptogenesis by adenosine releasing stem cell-derived brain implants.* Brain, 2007. **130**(Pt 5): p. 1276-88.
125. Anderson, S.A., et al., *Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences.* Development, 2001. **128**(3): p. 353-63.
126. Anderson, S.A., et al., *Distinct origins of neocortical projection neurons and interneurons in vivo.* Cereb Cortex, 2002. **12**(7): p. 702-9.
127. Shetty, A.K. and B. Hattiangady, *Restoration of calbindin after fetal hippocampal CA3 cell grafting into the injured hippocampus in a rat model of temporal lobe epilepsy.* Hippocampus, 2007a. **17**(10): p. 943-56.
128. Shetty, A.K. and D.A. Turner, *Development of fetal hippocampal grafts in intact and lesioned hippocampus.* Prog Neurobiol, 1996. **50**(5-6): p. 597-653.
129. Shetty, A.K. and D.A. Turner, *Development of long-distance efferent projections from fetal hippocampal grafts depends upon pathway specificity and graft location in kainate-lesioned adult hippocampus.* Neuroscience, 1997a. **76**(4): p. 1205-19.
130. Shetty, A.K. and D.A. Turner, *Fetal hippocampal cells grafted to kainate-lesioned CA3 region of adult hippocampus suppress aberrant supragranular sprouting of host mossy fibers.* Exp Neurol, 1997b. **143**(2): p. 231-45.
131. Shetty, A.K. and D.A. Turner, *Fetal hippocampal grafts containing CA3 cells restore host hippocampal glutamate decarboxylase-positive interneuron numbers in a rat model of temporal lobe epilepsy.* J Neurosci, 2000a. **20**(23): p. 8788-801.
132. Shetty, A.K., V. Zaman, and D.A. Turner, *Pattern of long-distance projections from fetal hippocampal field CA3 and CA1 cell grafts in lesioned CA3 of adult hippocampus follows intrinsic character of respective donor cells.* Neuroscience, 2000b. **99**(2): p. 243-55.
133. Southwell DG, P.M., Galvao RP, Jones DL, Froemke RC, Sebe JY, Alfaro-Cervello C, Tang Y, Garcia-Verdugo JM, Rubenstein JL, Baraban SC, Alvarez-Buylla A., *Intrinsically determined cell death of developing cortical interneurons.* Nature., 2012. **491**(7422): p. 109-13.
134. Nagaki S, F.F., Sakamoto Y, Higuchi H, Miki N, Miki N, Ono M, Sadamatsu M, Kato N, Osawa M., *Upregulation of brain somatostatin and neuropeptide Y following lidocaine-induced kindling in the rat.* Brain Res., 2000. **852**(2): p. 470-4.
135. Tallent MK, Q.C., *Somatostatin: an endogenous antiepileptic.* Mol Cell Endocrinol., 2008. **286**(1-2): p. 96-103.
136. Drexel M, K.E., Wieselthaler-Hözl A, Preidt AP, Sperk G., *Somatostatin and neuropeptide Y neurons undergo different plasticity in parahippocampal regions in kainic acid-induced epilepsy.* J Neuropathol Exp Neurol. , 2012. **71**(4): p. 312-29.
137. Richardson, R.M., et al., *Developing cell transplantation for temporal lobe epilepsy.* Neurosurg Focus, 2008. **24**(3-4): p. E17.
138. Sloviter, R.S., *Possible functional consequences of synaptic reorganization in the dentate gyrus of kainate-treated rats.* Neurosci Lett, 1992. **137**(1): p. 91-6.

139. Lowenstein, D.H., M.S. Seren, and F.M. Longo, *Prolonged increases in neurotrophic activity associated with kainate-induced hippocampal synaptic reorganization*. Neuroscience, 1993. **56**(3): p. 597-604.
140. Lerma, J., *Roles and rules of kainate receptors in synaptic transmission*. Nat Rev Neurosci, 2003. **4**(6): p. 481-95.
141. Sloviter, R.S., et al., *Kainic acid-induced recurrent mossy fiber innervation of dentate gyrus inhibitory interneurons: possible anatomical substrate of granule cell hyper-inhibition in chronically epileptic rats*. J Comp Neurol, 2006. **494**(6): p. 944-60.
142. Wichterle H, G.-V.J., Herrera DG, Alvarez-Buylla A., *Young neurons from medial ganglionic eminence disperse in adult and embryonic brain*. Nat Neurosci., 1999. **2**(5): p. 461-6.