

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



# **TERAPIA CELULAR EN MODELOS DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON**

**Tesis presentada por  
Miquel Bosch Pita  
para optar al título de  
Doctor en Bioquímica**



Esta tesis ha sido realizada bajo la dirección del Dr. Jordi Alberch y el Dr. Josep M. Canals, en el Departamento de Biología Celular y Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona.

Dr. Jordi Alberch Vié

Dr. Josep M. Canals Coll

Miquel Bosch Pita

Barcelona, Abril de 2005



**A la meva mare**

**Al meu pare**

**A la meva germana**

**A la meva iaia**

**A la Vicky**



## AGRAÏMENTS

La realització d'una tesi doctoral és molt més que la obtenció d'un determinat títol. És una aventura personal, una experiència vital farcida de moments durs i d'instantes esplèndids. És un viatge que, com tots els viatges, el més important no és el destí final, sinó tot allò que et trobes durant el camí. I en aquest camí, enmig de les provetes, dels cervells i de les cèl·lules, m'hi he trobat un conjunt de persones a les que vull agrair profundament el seu suport, la seva ajuda i la seva presència al meu costat.

Abans de tot, vull expressar el meu agraïment i la meva admiració pels meus directors de tesi. Vull agrair al Jordi i al Pep la oportunitat que m'han brindat de poder treballar aquests anys al seu laboratori, on he après com funciona realment el difícil món de la recerca. Vull agrair al Jordi tot allò que ens ha inculcat als que hem treballat amb ell, sobretot el seu esperit lluitador i tenaç, i les ganes de fer les coses ben fetes, amb rigor i sentit comú. Vull agrair molt especialment al Pep, que ha estat el meu mestre durant aquests quatre anys. Ell ha estat qui m'ha ensenyat gairebé tot el que he après al laboratori. Amb ell he treballat colze-amb-colze en el complicat món de les "stem cells". Ha estat "jefe" i company de poiata a la vegada. D'ell no només he après una àmplia varietat de tècniques experimentals, sinó també el seu esperit de treball, de lluita, de solucionar problemes, d'*implementar* noves tècniques, la seva creativitat, el seu inesgotable entusiasme i la seva inacabable gosadia. Vull donar les gràcies també a l'altra "jefa" del laboratori, l'Esther, per la seva ajuda i el seu suport en tot moment i pel seu bon humor.

El més profund agraïment i la més sincera estimació és per les meves dues companyes, la Susana i la Núria. Vam entrar junts al laboratori i hem fet junts aquest viatge de quatre anys. Hem compartit moltes experiències, hem disfrutat molt dels bons moments i ens hem recolzat en els dolents. Hem après, hem lluitat junts i hem forjat una veritable amistat. Totes dues han fet que el viatge que hem realitzat plegats fos d'allò més agradable.

Vull donar també les gràcies de forma especial al J.R., per la seva sincera amistat i per la seva ajuda en innumbrables ocasions. Ha estat un plaer compartir aquests anys amb la seva dedicació i la seva honestedat.

Vull agrair els bons moments passats amb els altres companys del grup, amb els que ha estat increïblement fàcil establir-hi una amistat: a la Raquel i la seva contagiosa rialla, al Jesús i la seva ironia amagada sota l'apariència del "Dr. Torres", al JuanMa-Sevillano i la seva gràcia i bon rotllo innats, i a la Sílvia, pels seus bons consells i per contagiar-nos a tots amb la seva alegria. És una sort tenir uns companys de feina com aquests. Espero conservar l'amistat de tots ells per sempre.

També volia agrair les moltes ajudes i bons moments que hem passat amb les "antigues" integrants del grup: la Sònia, la Núria (quina? La "Checa"), l'Elena i l'Anna Maria. I també vull donar les gràcies als nostres amics i veïns de laboratori ("els Gustavos"): als que ja han marxat, com el Ferran, la Teresa (d'aquí ve l'enigmàtic nom d'Histo-Teresa) i l'Anna-Luna; i als que encara hi són: al JuanMa, el vertader arquitecte, a la Olga, la granadina per excel·lència, al Frank i la seva nocturnitat, al Miguel i la seva agradable conversa, a l'Stephan i la seva ironia, a la Inés, l' "alegría de la huerta", a la Isabel i els seus grans consells, a la Montse i la seva amabilitat, i al propi Gustavo.

Vull agrair també les estones compartides amb les "Angules": la Montse i la Carmen. També voldria donar molts ànims als nous prometedors fitxatges del laboratori, el Dani i la Noèlia.

També vull donar les gràcies a les veritables "jefas" del laboratori, que m'han ajudat enormement durant tota la tesi: a la Maite (què fariem sense la Maite?), a l'Ana i la seva immensa simpatia i picardia, i a la Laura. Gràcies també a les "secres", per la seva ajuda: la Núria, la Carme i la María-José. També vull agrair les ajudes i les converses compartides a l'hora de dinar amb tota la gent de "Bio Cel·lular", els veïns i veïnes del pis d'abaix.

Volia esmentar el meu agraïment a diverses persones que m'ha ajudat molt en alguns dels experiments fets durant la tesi: a tot el personal de l'estabulari per la seva amabilitat i per ajudar-me i aconsellar-me en la manipulació dels animals; a la Maria Calvo i l'Anna Bosch per la seva ajuda amb els microscopis confocals i els experiments del calci; al Cisco per la seva ajuda en les deteccions de la EGFP per PCR; a la Cristina Sunyol per les quantificacions del GABA per HPLC; i al Jordi Petriz pels experiments amb el citòmetre de flux.

També és just que agraeixi el finançament atorgat per la Universitat de Barcelona en la forma d'una beca del Programa Propi – Distincions.

Voldria expressar la meua gratitud a tota la gent del Karolinska que van fer que la meua estada a Stockholm fos d'allò més agradable: en primer lloc a l'Ernest, per obrir-me les portes del seu laboratori, pels seus consells i per ajudar-me en tot el que he necessitat, des d'aleshores i fins al dia d'avui. Volia agrair de forma molt especial al Xavier, per tot el que em va ensenyar i ajudar, pels sopars, la seva companyia a altes hores de la matinada sueca, i per la seva amistat. També volia agrair les ajudes i les converses amb la Carme, el Paco de València, l'Helena i el Marçal, a tota la penya llatina que em vaig trobar, sobretot al Gustavo i la Fernanda, i al Kyle, la Julianna, la Nina, l'Anita y el Gonçalo. *Tack så mycket.*

Vull agrair a tots aquells que m'han contagiats de la seva visió romàntica i idealista de la ciència i de la vida, sobretot als clàssics, l'Isaac i el Carl, que han forjat bona part de la meua filosofia personal. També als il·lustres profes del Daina, i a alguns de les facultats de Química i Biologia, per les seves ensenyances. Vull reconèixer el suport i l'amistat de diverses persones: d'olesans, com l'Àlex i el Germà, d'olesanes com la colla de les "Laures", del de la gasosa amb glaçons, i també de les diferents colles de químics, biòlegs, cantaires i, en especial, de bioquímics. Vull mencionar al Marc per ser de les poques persones que m'he trobat amb vertadera estimació pel saber i la raó. Caldrà que algú sembri la llavor de la futura revolució cap a un sistema racional i humanista. Una altra filosofia de món és possible, tot i que improbable.

Per sobre de tot, però, vull constatar que el més intens dels agraïments és per la meva família. Per tot el que m'han ajudat durant aquests anys, per recolzar-me i donar-me tot el seu suport, per la seva gran estimació i per permetre que els hi hagi dedicat moltíssim menys temps del que realment es mereixien. Vull agrair a la meva mare per estar sempre al meu costat i pel seu infinit amor, al meu pare pel seu suport incondicional i per inculcar-me el seu tarannà lluitador, a la meva germana pel seu carinyu il·limitat i per l'orgull i admiració que em fa sentir, i a la meva iaia pel seu somriure immortal i per preguntar-me de tant en tant si a les meves cèl·lules ja els hi sortien les "potetes". Vull reconèixer també el suport constant dels meus sogres i cunyats.

I per últim, i per això més important, vull agrair des del fons del meu cor a la persona que ha estat al meu costat en tot moment, que s'ha emocionat amb mi en els bons instants i que m'ha recolzat en els dolents, que comparteix tots i cadascuns dels meus pensaments, sentiments i vocacions, i que és la persona amb la que faig el viatge que anomenem vida. Moltes gràcies Vicky.

"Preferiría comprender una sola causa que ser Rey de Persia."

**Demócrito de Abdera**, 460–370 a. C.

"Sólo hay un bien: el conocimiento. Sólo hay un mal: la ignorancia."

**Sócrates**, 470–399 a. C.

"El dilema fundamental de la humanidad, el problema que subyace a todos los demás y que destaca por encima de ellos, es precisar qué puesto corresponde al hombre en la naturaleza y cuál es su relación con el cosmos."

**T.H. Huxley**, 1863

"Los hombres deberían saber que del cerebro, y nada más que del cerebro, vienen las alegrías, el placer, la risa y la diversión, las penas, el dolor, el abatimiento y las lamentaciones. Y gracias al cerebro, de manera especial, adquirimos sabiduría y conocimientos, y vemos, oímos y sabemos lo que es repugnante y lo que es bello, lo que es malo y lo que es bueno, lo que es dulce y lo que es insípido... Y gracias a este órgano nos volvemos locos y deliramos, y los miedos y terrores nos asaltan... Debemos soportar todo esto cuando el cerebro no está sano... Y en este sentido soy de la opinión de que esta víscera ejerce en el ser humano el mayor poder."

**Hipócrates**, 460-377 a. C.

"Nosotros somos la encarnación local del Cosmos que ha crecido hasta tener conciencia de sí."

**Carl Sagan**, 1980



<b>I.-INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.- CÉLULAS MADRE</b> .....	<b>4</b>
<b>1.1.- Definición y propiedades</b> .....	<b>4</b>
<b>1.2.- Tipos y orígenes</b> .....	<b>6</b>
1.2.1.- Células madre embrionarias.....	7
1.2.2.- Células embrionarias germinales.....	8
1.2.3.- Células embrionarias de carcinoma.....	9
1.2.4.- Células madre de origen fetal y adulto.....	10
1.2.4.1.- <i>Plasticidad de las células madre adultas</i> .....	10
<b>1.3.- Neurogénesis en el cerebro adulto</b> .....	<b>12</b>
<b>2.- TERAPIAS CELULARES BASADAS EN CÉLULAS MADRE PARA ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1.- Auto-reparación a partir de células madre endógenas</b> .....	<b>15</b>
<b>2.2.- Terapias de neuroprotección</b> .....	<b>18</b>
<b>2.3.- Terapias de sustitución celular</b> .....	<b>20</b>
2.3.1.- Obtención y manipulación de células madre.....	21
2.3.2.- Diferenciación de células madre. ....	24
2.3.2.1.- <i>Generación de neuronas dopaminérgicas</i> .....	27
2.3.2.2.- <i>Generación de neuronas colinérgicas</i> ....	28

2.3.3.- Transplante e integración funcional.....	29
<b>3.- TERAPIA CELULAR PARA LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON.....</b>	<b>31</b>
<b>3.1.- Enfermedad de Huntington.....</b>	<b>31</b>
3.1.1.- Patología. Genética.....	31
3.1.2.- Mecanismos moleculares. Hipótesis.....	32
3.1.3.- Modelos experimentales de la enfermedad de Huntington.....	34
<b>3.2.- Terapia de neuroprotección para la enfermedad de Huntington.....</b>	<b>35</b>
<b>3.3.- Terapia de sustitución celular para la enfermedad de Huntington.....</b>	<b>36</b>
3.3.1.- Generación de neuronas GABAérgicas.....	38

## **II.- OBJETIVOS** **41**

## **III.- MATERIALES Y MÉTODOS** **45**

1.- Cultivos celulares.....	47
2.- Determinación de la concentración intracelular de calcio.....	49
3.- Análisis de proliferación celular por incorporación de BrdU.....	50
4.- Determinación de los niveles intracelulares de GABA.....	50

5.- Ensayo de recaptación y liberación de GABA.....	51
6.- Procedimientos de lesión excitotóxica.....	52
7.- Procedimientos de trasplante celular.....	53
8.- Ensayo de funcionalidad motora por rotaciones inducidas.....	54
9.- Procedimientos de detección inmunocitoquímica.....	54
10.- Ensayo de TUNEL para la detección de muerte celular.....	56
11- Detección del gen de la EGFP mediante PCR.....	57
12.- Recuentos celulares.....	58

#### **IV.- RESULTADOS** **59**

1.- Optimización de la supervivencia en cultivo de la línea de progenitores ST14A en condiciones favorables para la diferenciación.....	61
2.- El ácido retinoico aumenta la supervivencia y la diferenciación neuronal de las células en cultivo.....	67
3.- El tratamiento con KCl reduce la proliferación celular y estimula el crecimiento neurítico .....	70
4.- Los efectos del KCl son mediados por un aumento del calcio intracelular...	73
5.- El tratamiento con KCl promueve la adquisición de un fenotipo GABAérgico maduro y funcional .....	76

6.- El BDNF incrementa el crecimiento neurítico de las células previamente tratadas con RA y KCl.....	81
7.- Supervivencia de las células ST14A diferenciadas <i>in vitro</i> , después de su trasplante en un modelo de la enfermedad de Huntington.....	82
8.- Las células pre-diferenciadas <i>in vitro</i> mantienen su fenotipo neuronal GABAérgico después del trasplante.....	87
9.- Las células pre-diferenciadas desarrollan procesos neuríticos asociados a la presencia de vesículas sinápticas.....	87
10.- Los trasplantes de células pre-diferenciadas recuperan la funcionalidad en algunos animales del modelo excitotóxico de la enfermedad de Huntington.....	90

## **V.- DISCUSIÓN** **93**

## **VI.- CONCLUSIONES** **109**

## **VII.- BIBLIOGRAFÍA** **113**

## ABREVIACIONES

<b>3-NPA</b>	Ácido 3-nitropropiónico
<b>aFGF</b>	Factor de crecimiento fibroblástico ácido
<b>AMPc</b>	Monofosfato de adenosina cíclico
<b>BDNF</b>	Factor neurotrófico derivado del cerebro
<b>bFGF</b>	Factor de crecimiento fibroblástico básico
<b>BL</b>	Lámina basal
<b>BMP</b>	Proteína morfogenética del hueso
<b>BrdU</b>	5-bromo-desoxiuridina
<b>BSA</b>	Albúmina bovina sérica
<b>BV</b>	Vaso sanguíneo
<b>CNTF</b>	Factor neurotrófico ciliar
<b>DA</b>	Dopamina
<b>DAB</b>	3,3'-diaminobenzidina
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>DIV</b>	Días <i>in vitro</i>
<b>DG</b>	Giro dentado
<b>DNA</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>dNTP</b>	Trifosfato de desoxi-nucleótidos
<b>dUTP</b>	Trifosfato de desoxiuridina
<b>E</b>	Día Embrionario
<b>ECC</b>	Células madre embrionarias de carcinoma
<b>EGC</b>	Células madre embrionarias germinales
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>EGFP</b>	Proteína verde fluorescente mejorada
<b>EH</b>	Enfermedad de Huntington
<b>ESC</b>	Células madre embrionarias
<b>FACS</b>	Separador celular por activación de la fluorescencia
<b>FCS</b>	Suero fetal bovino
<b>FGF</b>	Factor de crecimiento fibroblástico
<b>GABA</b>	Ácido $\gamma$ -aminobutírico

<b>GAD</b>	Glutamato Descarboxilasa
<b>GDNF</b>	Factor neurotrófico derivado de una línea celular glial
<b>GFAP</b>	Proteína ácida fibrilar glial
<b>GVG</b>	$\gamma$ -vinyl-GABA
<b>HP</b>	Hipocampo
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución
<b>IBMX</b>	Isobutilmetilxantina
<b>IGF-1</b>	Factor de crecimiento parecido a la insulina-1
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>KRH</b>	Tampón Krebs-Ringer-HEPES
<b>LIF</b>	Factor inhibidor de la leucemia
<b>LTA</b>	Antígeno T grande
<b>LV</b>	Ventrículos laterales
<b>NGF</b>	Factor de crecimiento nervioso
<b>NHS</b>	Suero normal de caballo
<b>MEF</b>	Fibroblastos embrionarios murinos
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato
<b>NSC</b>	Células madre neurales
<b>NT-3</b>	Neurotrofina-3
<b>NT-4/5</b>	Neurotrofina 4/5
<b>NTRN</b>	Neurturina
<b>P</b>	Día Postnatal
<b>PB</b>	Tampón fosfato
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de polimerasa
<b>QA</b>	Ácido quinolínico
<b>RA</b>	Ácido retinoico
<b>SEM</b>	Error estándar de la media
<b>SGZ</b>	Zona subgranular
<b>SHH</b>	<i>Sonic hedgehog</i>
<b>STR</b>	Núcleo Estriado
<b>SVZ</b>	Zona subventricular
<b>TGF-<math>\alpha</math></b>	Factor de crecimiento transformante- $\alpha$
<b>TPA</b>	12-miristato 13-acetato de forbol

<b>ts</b>	Sensible a la temperatura
<b>TUNEL</b>	<i>TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling</i>
<b>v-GAT</b>	Transportador de GABA vesicular



# **I. INTRODUCCIÓN**



## **INTRODUCCIÓN**

El cerebro humano es la estructura más compleja observada hasta ahora en todo el Universo. Hay tantas neuronas en un cerebro humano adulto como estrellas en nuestra galaxia, unos cien mil millones. Con sus centenares de billones de contactos sinápticos, este órgano de tan sólo kilo y medio de peso ha permitido a los seres humanos erigirse como la especie dominante del planeta. Pero, ¿cómo funciona el cerebro? ¿Cómo se forma toda esta complejidad? ¿Cómo podemos repararlo cuando se daña?

Debido a esta complejidad las enfermedades que afectan al sistema nervioso son, probablemente, las de más difícil solución. ¿Cómo podremos reconstruir las intrincadas conexiones entre neuronas que han desaparecido debido a una enfermedad o a un accidente? Hoy en día no se dispone de tratamientos realmente eficaces para enfermedades neurológicas como la de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la Esclerosis Múltiple, la corea de Huntington, los infartos cerebrales, etc. La sociedad en su conjunto está envejeciendo rápidamente y las enfermedades neurodegenerativas son cada vez más comunes. En algunos casos existen tratamientos para paliar los síntomas, pero nunca somos capaces de detener la muerte progresiva de las neuronas y mucho menos de volver a recuperarlas.

La actual investigación en el campo de las células madre está abriendo nuevas posibilidades con las que luchar contra estas enfermedades. La revolución que están protagonizando en el ámbito científico ha entrado de lleno en el debate social, político y filosófico y promete trasladarse, en el futuro, al ámbito médico. En los últimos años se está llevando a cabo una intensa investigación sobre las propiedades biológicas de estas células y sobre sus posibles aplicaciones terapéuticas. Las células madre encierran supuestamente un enorme potencial de reparación. Con los conocimientos adecuados que nos permitan su manipulación de forma segura y controlada, podríamos en un futuro no muy lejano, disponer de revolucionarias terapias para muchas enfermedades hoy en día incurables, entre ellas, las enfermedades del sistema nervioso.

## 1.- CÉLULAS MADRE

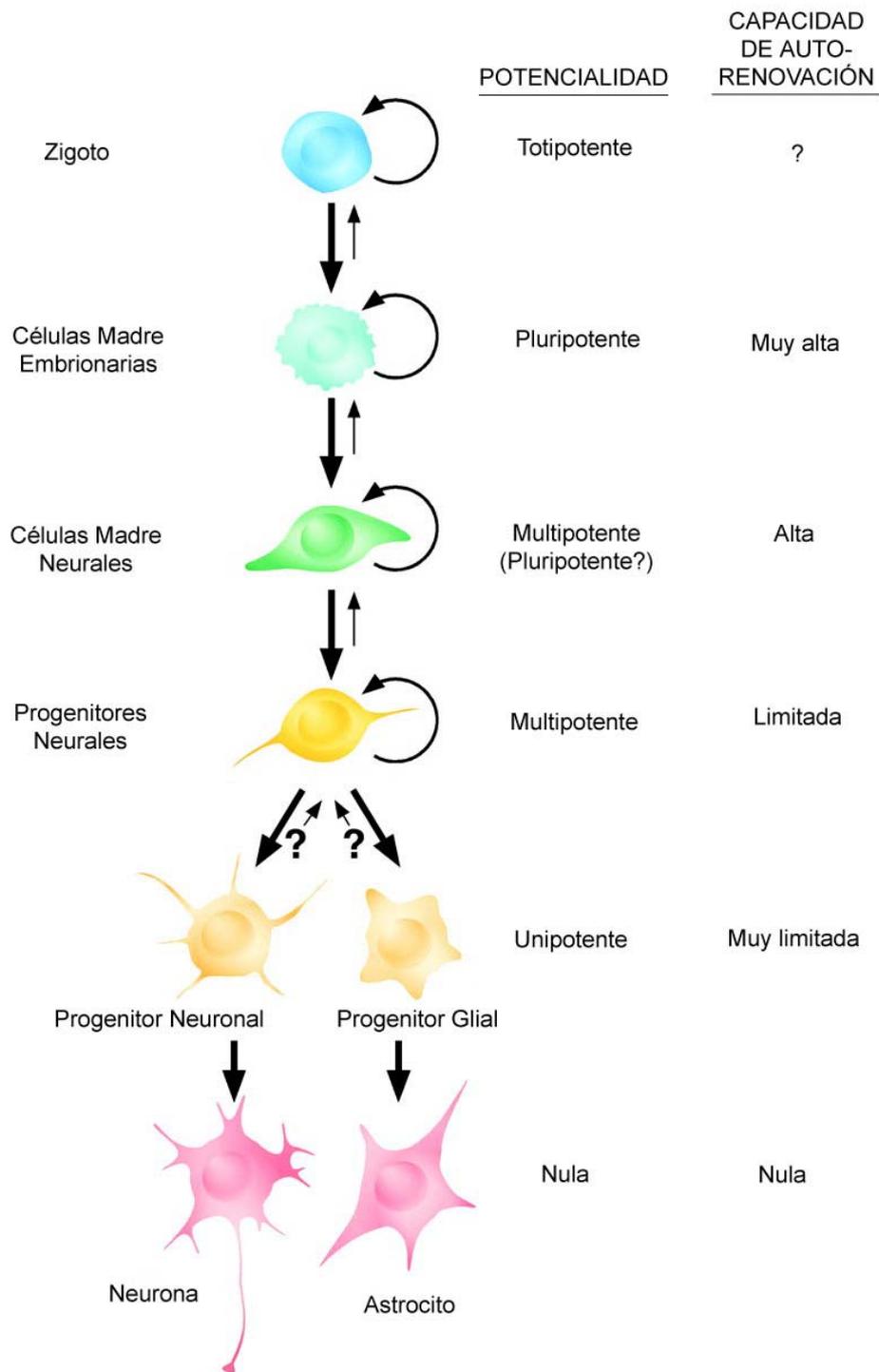
### 1.1.- DEFINICIÓN Y PROPIEDADES

Las células madre o células troncales pueden definirse de forma general por sus dos principales propiedades: su capacidad de auto-replicarse indefinidamente y su capacidad de diferenciarse hacia múltiples tipos de célula de un organismo. Es muy difícil, sin embargo, establecer una definición exacta y sin ambigüedades que contenga todos los tipos de células madre que se conocen hasta el momento.

Una célula madre es una célula indiferenciada, inmadura, capaz de dividirse simétrica o asimétricamente para dar lugar a varias células de las cuales alguna debe de ser igual a su progenitora. Una célula madre puede, en principio y en las condiciones adecuadas, dividirse indefinidamente en el tiempo, manteniendo siempre una población estable de células madre idénticas. Bajo las condiciones apropiadas y recibiendo los estímulos correctos, las células madre pueden diferenciarse hacia varios, muchos o todos los tipos de células especializadas de un organismo maduro. Dependiendo del potencial de la célula madre (**Figura 1**), ésta puede clasificarse en totipotente -si es capaz de generar todas las células del embrión y del tejido extraembrionario-, pluripotente -si puede crear todos los tipos celulares que formaran el embrión-, multipotente -si sólo es capaz de generar los tipos celulares del tejido de donde proviene- o bien unipotente -si tan solo puede dar lugar a un único tipo celular-. Su potencialidad dependerá de su origen, es decir, del estadio del desarrollo y de la zona del organismo donde resida (Lovell-Badge 2001; McKay 2000; Temple 2001).

Actualmente sabemos que existen células madre en todas las etapas del desarrollo de un organismo, desde el inicio hasta su muerte. La célula madre por excelencia es el óvulo fecundado o cigoto. Es totipotente y a partir de ella se desarrollan todas las células que darán lugar al organismo, tanto las células somáticas como las germinales, e incluidas las células extraembrionarias que formarán la placenta.

A medida que el embrión va desarrollándose, las células madre van dividiéndose, migrando y diferenciándose en todos los tipos celulares que formarán los distintos órganos. Esto lo harán siguiendo una compleja secuencia de expresiones



**Figura 1.** *Propiedades de auto-renovación y potencialidad de los diferentes tipos de células madre que podemos encontrar en el proceso de desarrollo, desde un cigoto hasta la formación del tejido nervioso maduro. A medida que se avanza en el desarrollo se van restringiendo estas propiedades y disminuye el número de células que las conservan. Modificado de Gage 2000.*

génicas orquestada por precisos programas genéticos y regulados por la información de las células vecinas, en un patrón espacio-temporal muy definido. En este proceso las células van especializándose cada vez más y su potencialidad va reduciéndose, desde la pluripotencialidad a la multipotencialidad y así hasta la unipotencialidad (**Figura 1**). En primer lugar, por ejemplo, las células madre son confinadas a una de las tres capas germinales del embrión: endodermo, mesodermo o ectodermo. A partir de aquí irán especificándose a un sistema, órgano o tejido determinado, hasta llegar a su fenotipo, posición, morfología y función final.

Es importante tener en cuenta que la propia definición de célula madre o su clasificación en subtipos es puramente funcional y no morfológica. Atiende a propiedades observadas experimentalmente y bajo condiciones muy particulares. Estas propiedades pueden ser diferentes dependiendo de si consideramos a la célula en su entorno natural *in vivo*, o si está siendo cultivada *in vitro*, o si ha sido transplantada otra vez *in vivo* en emplazamientos homotópicos o ectópicos. Uno de los principales problemas en la investigación en células madre, tanto sobre sus orígenes, localizaciones y propiedades biológicas, como sobre su manipulación para el desarrollo de terapias, es la falta de marcadores específicos que nos indiquen inequívocamente si una célula es una célula madre o qué tipo de célula madre es.

## **1.2.- TIPOS Y ORÍGENES.**

---

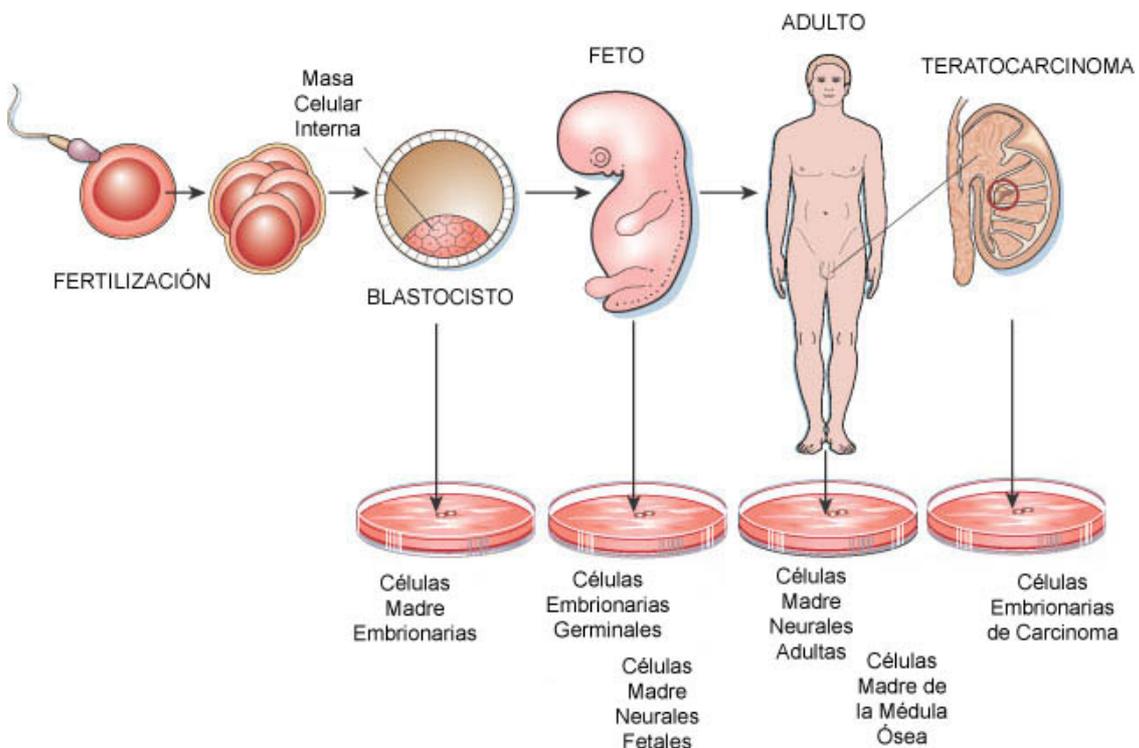
A lo largo de todo el proceso de desarrollo de un organismo podemos extraer diferentes tipos de células madre que podemos cultivar *in vitro*. Dependiendo de su origen, obtendremos unas células con diferentes propiedades. Como regla general podemos establecer que cuanto más primitiva sea la fuente de células madre más potencialidad en cuanto a proliferación y diferenciación tendrán esas células. Cuanto más avanzado sea su origen, obtendremos células con capacidades más restringidas (Gage 2000; Temple 2001).

A continuación detallamos algunos de los tipos de células madre que se están investigando en la actualidad en cuanto a sus propiedades biológicas y su potencial como herramientas terapéuticas para enfermedades del sistema nervioso (**Figura 2**).

### 1.2.1.- CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS.

Las células madre embrionarias (ESC, del inglés *Embryonic Stem Cells*) son células aisladas de la masa celular interna de un embrión pre-implantacional en el estado inicial de blastocisto (**Figura 2**), cuando está formado por tan sólo 100-200 células (día 4-5 de gestación en humanos o día 4 en ratones). Son células pluripotenciales, con capacidad de generar todos los tipos celulares de un organismo, incluidas las células germinales, aunque no pueden dar lugar a las células de la placenta.

Las ESC de ratón fueron aisladas y cultivadas por primera vez en 1981 (Evans y Kaufman 1981; Martin 1981). Desde entonces y sobretodo a partir del aislamiento de las ESC humanas en 1998 (Thomson et al., 1998), este tipo de células ha sido intensamente investigado para conocer sus propiedades biológicas y su potencial para



**Figura 2.** Tipos de células madre según su origen. Células madre con diferentes propiedades han sido extraídas de diferentes orígenes, cultivadas y analizadas para su potencial neurogénico. Modificado de Donovan y Gearhart 2001.

el desarrollo de terapias celulares. Han demostrado una gran capacidad de proliferación y auto-renovación *in vitro*. Esto las hace especialmente interesantes para obtener grandes cantidades de células útiles para transplantar. Por el contrario, también presentan un elevado riesgo de formación de teratomas si son transplantadas en estado proliferativo, lo que obliga a una máxima cautela antes de ser utilizadas en ensayos de terapia celular para pacientes (Bjorklund et al., 2002; Olsson et al., 1997).

Las ESC pueden cultivarse indefinidamente sobre una capa de células soporte o bien en flotación, en forma de cuerpos embrioides. Presentan un cariotipo normal que parece ser estable a lo largo del cultivo o después de manipulaciones, aunque recientemente se han descrito la aparición de ciertas anomalías (Draper et al., 2004). Se ha demostrado su gran potencial de diferenciación hacia todos los fenotipos posibles, tanto *in vitro* como en transplantes ectópicos o en estudios de animales quiméricos (Donovan y Gearhart 2001; Lovell-Badge 2001).

Debido a que las definiciones y clasificaciones de las células madre se basan todavía en pruebas funcionales, hay muchas características de las ESC humanas que no conocemos en detalle. Para determinar la potencialidad de unas células se utilizan tres tipos de experimentos: la diferenciación espontánea o inducida en cultivo, el implante en ratones inmunodeficientes para observar la aparición de tumores, o bien la inyección de las células en blastocistos que se dejan desarrollar hasta la formación de organismos quiméricos. No podemos asegurar categóricamente, por ejemplo, que las ESC humanas posean el mismo potencial que las ESC murinas y que implantadas en un embrión huésped sean capaces de generar todos los tejidos de un organismo adulto, incluidos los gametos, puesto que este experimento, por razones obvias, no se ha llevado a cabo.

### 1.2.2.- CÉLULAS EMBRIONARIAS GERMINALES.

Las células madre embrionarias germinales (EGC, del inglés *Embryonic Germ Cells*) son células provenientes de embriones más desarrollados. Se aíslan de los precursores germinales extraídos de los primordios de las gónadas de un embrión post-implantacional (de 5-10 semanas de vida en humanos; **Figura 2**). Estas son las células que darán lugar, en el adulto, a los gametos. Son pluripotenciales, por lo que pueden generar todos los tipos de células, tanto somáticas como germinales, pero no

extraembrionarias. Se han extraído EGC humanas de fetos abortados y han sido cultivadas *in vitro* (Shamblott et al., 1998). Presentan, al igual que las ESC, una gran capacidad de proliferación y de diferenciación, aunque sus propiedades son algo diferentes. A diferencia de las ESC, no son capaces de desarrollar teratomas después de su implante en ratones adultos inmunodeprimidos (Shamblott et al., 1998).

Muy recientemente se ha demostrado que es posible extraer células madre pluripotenciales parecidas a las EGC, incluso de las gónadas de ratones recién nacidos (Kanatsu-Shinohara et al., 2004).

### 1.2.3.- CÉLULAS EMBRIONARIAS DE CARCINOMA.

Las células madre embrionarias de carcinoma (ECC, del inglés *Embryonic Carcinoma Cells*) son células que provienen de teratocarcinomas (**Figura 2**), tumores complejos derivados de las gónadas adultas con mezclas de células indiferenciadas y diferenciadas hacia cualquier tipo celular. Proceden del mismo tipo de células madre que las EGC, los precursores de las células germinales, pero en el estadio adulto (Kleinsmith y Pierce 1964; Skakkebaek et al., 1987; Stevens 1967a). Son células pluripotenciales. En cultivo se dividen indefinidamente y pueden diferenciarse hacia todos los tipos de células somáticas de las tres capas embrionarias, pero no pueden generar células germinales (Kleinsmith y Pierce 1964; Martin y Evans 1974; Stevens 1967b).

La propia biología de las células madre pluripotenciales empieza con los trabajos de Leroy Stevens (Stevens 1967a; Stevens 1967b) sobre células derivadas de estos tumores en ratón. Hacia mediados de la década de los 70s se propuso que células pluripotenciales como las ECC humanas podían servir para generar todo tipo de células, y desarrollar de este modo terapias de sustitución celular en enfermedades donde una población concreta de células haya desaparecido. Sin embargo, su cariotipo anormal y su procedencia tumoral instigaron a los investigadores a la búsqueda de otras fuentes de células pluripotenciales.

#### **1.2.4.- CÉLULAS MADRE DE ORIGEN FETAL Y ADULTO.**

Es posible aislar células que cumplan las dos condiciones básicas que las definen como células madre tanto de fetos en desarrollo como de un organismo adulto. Normalmente son consideradas como multipotenciales: pueden dar lugar solamente a todos los tipos celulares presentes en el propio tejido al que pertenecen. Se cree que estas células generan los llamados precursores o progenitores, que son a su vez, mucho más restringidos. Estos progenitores pueden dividirse, aunque no indefinidamente, y su potencial se limita ya a unos pocos tipos de célula maduras y especializadas (Temple 2001).

Un ejemplo de este tipo de células multipotenciales son las células madre neurales (NSC, del inglés *Neural Stem Cells*). Las NSC pueden aislarse del cerebro en desarrollo o en el adulto (**Figura 2**), u obtenerse a partir de ESC. Pueden ser expandidas en cultivo y son capaces de diferenciarse en los tres subtipos de células neurales: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Gage 2000; Temple 2001).

##### **1.2.4.1.- Plasticidad de las células madre adultas.**

Las células madre de origen adulto son células indiferenciadas aisladas de órganos o sistemas completamente desarrollados en el estadio adulto. Aunque se encuentran en muy pocas cantidades, se ha demostrado la presencia de células madre adultas en muchos tejidos: médula ósea, sangre periférica, músculo esquelético, hígado, páncreas, epitelio de la piel y del intestino, pulpa dental, córnea y retina del ojo, y en el sistema nervioso central, incluyendo el cerebro y la médula espinal. En muchos de ellos realizan una imprescindible tarea de auto-renovación y mantenimiento de la homeostasis tisular. Las células madre adultas de las que disponemos de más conocimientos son las células del sistema hematopoyético de la médula ósea, capaces de regenerar completamente todas las células sanguíneas y del sistema inmunitario.

Las células madre adultas, sin embargo, son muy difíciles de aislar y obtener en grandes cantidades. Su capacidad de proliferación *in vitro* es mucho más reducida que la de las ESC o EGC. De hecho, en numerosos estudios sobre las propiedades de diferenciación de las NSC o los progenitores neuronales se ha seguido la estrategia de

inmortalizar estas células mediante la inserción de oncogenes, para conservar la capacidad de auto-renovación en estado indiferenciado, y estudiar de esta manera su potencial tanto *in vitro* como después del trasplante (ver **capítulo 3.3.1**) (Martinez-Serrano y Bjorklund 1997).

El potencial de diferenciación de las células madre adultas es también más limitado que el de las ESC o EGC (Temple 2001). Sin embargo, actualmente, nuevos experimentos están haciendo reconsiderar el concepto de la plasticidad de las células madre adultas, puesto que, bajo ciertas condiciones *in vitro*, estas células están demostrando una potencialidad mucho más elevada de lo que se creía hasta ahora. Se ha comprobado que, tanto *in vitro* como en trasplantes *in vivo*, podrían generar tipos celulares de otros órganos totalmente distintos de los de su origen, incluso de capas germinativas diferentes a la original. Células madre de la médula ósea, de origen mesodérmico, han sido diferenciadas a tejido neural, cuyo origen es ectodérmico (Brazelton et al., 2000; Mezey et al., 2000). Por otro lado, NSC obtenidas del cerebro adulto han generado células hematopoyéticas (Bjornson et al., 1999) o incluso muchos otros tipos celulares en un embrión quimérico (Clarke et al., 2000). En varios estudios se demuestra como, después de transplantadas, estas células son capaces de integrarse en el huésped y asumir fenotipos maduros (Brazelton et al., 2000; Ferrari et al., 1998; Kocher et al., 2001; Mezey et al., 2000; Orlic et al., 2001).

Algunas de estas observaciones, sin embargo, podrían deberse a fenómenos de fusión celular en vez de transdiferenciación (Alvarez-Dolado et al., 2003; Weimann et al., 2003). Hay un importante debate, en la actualidad, sobre si lo que se observa en estos experimentos son fenómenos de transdiferenciación, desdiferenciación, reprogramación génica, fusión celular o varios de ellos a la vez (Wurmser y Gage 2002; Ying et al., 2002). Hasta el presente momento, sin embargo, no se ha podido demostrar que una sola célula madre adulta sea capaz de generar todos los tipos celulares de un organismo adulto, tal y como lo hacen las ESC y EGC. Tampoco sabemos si esta sorprendente plasticidad se da realmente *in vivo* de forma natural o si sólo son fenómenos observables en condiciones de cultivo. De todas formas, aunque sólo se dé *ex vivo*, esta sorprendente plasticidad puede ser aprovechada para el desarrollo de terapias celulares basadas en células madre adultas.

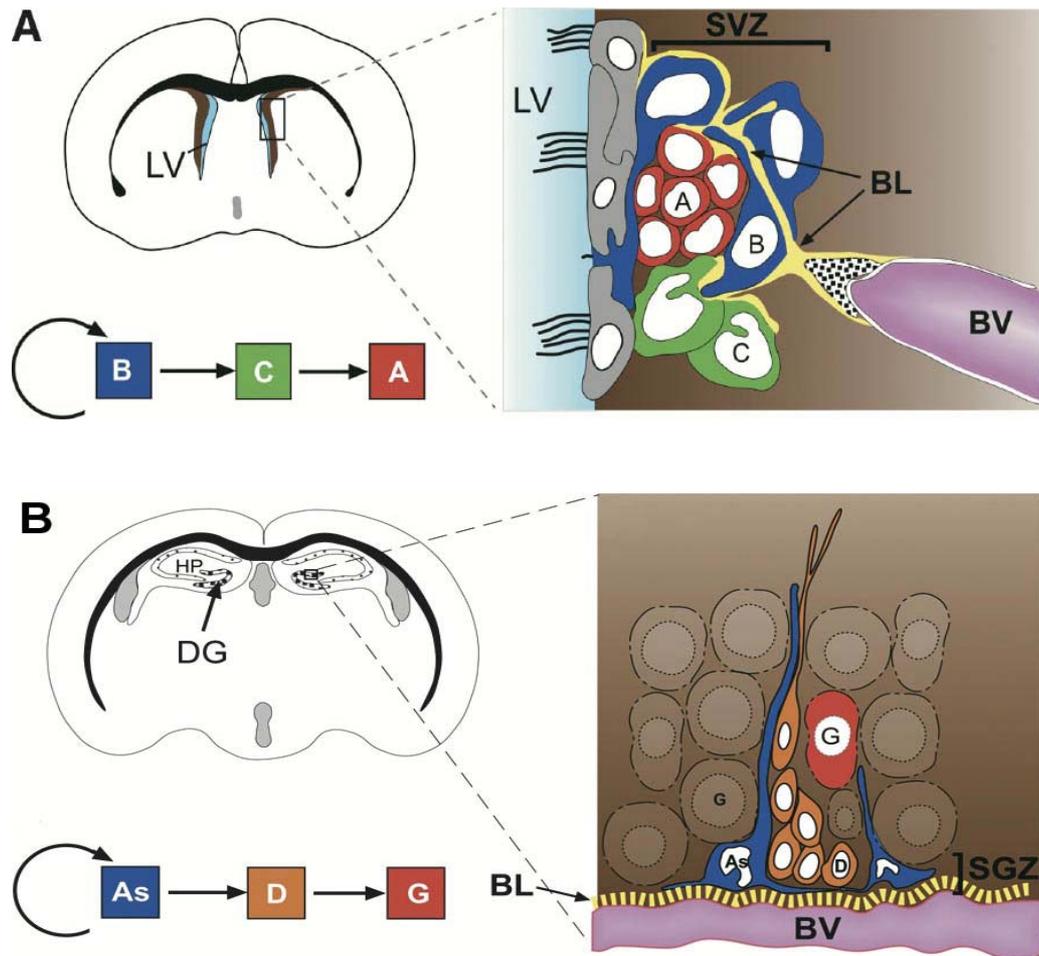
### **1.3.- NEUROGENESIS EN EL CEREBRO ADULTO.**

---

En 1962 Joseph Altman publicó un artículo titulado "¿Se forman nuevas neuronas en los cerebros de los mamíferos adultos?" (Altman 1962). Fue el primero en desafiar el dogma establecido en la neurología de que en el cerebro de un mamífero adulto no podían nacer nuevas neuronas, únicamente podían morir. La teoría establecía que el cerebro debía ser anatómicamente estable para que recuerdos y pensamientos pudieran conservarse durante toda la vida. Ahora tenemos evidencias de que esto no es así. En todas las especies de mamíferos estudiados: rata, ratón, primates, entre ellos el ser humano, se ha confirmado la génesis de nuevas neuronas en el cerebro adulto. (Cameron y McKay 1998; Eriksson et al., 1998).

Los resultados de Altman, sin embargo, no fueron tenidos en cuenta hasta mediados de los años 80 cuando Fernando Nottebohm volvió a sacudir el campo con resultados espectaculares en canarios adultos. Descubrió que la neurogénesis y el reemplazo neuronal tenían lugar en los núcleos cerebrales responsables del aprendizaje del canto, y que el proceso se aceleraba en las estaciones en la que los pájaros adultos aprendían los cantos (Nottebohm 2002).

Estos trabajos hicieron retomar la posibilidad de la capacidad regenerativa del cerebro humano adulto. Pero no fue hasta la década de 90s cuando, con las nuevas técnicas de biología celular y molecular, empezaron a producirse evidencias incuestionables de neurogénesis en el cerebro de primates adultos (Gould et al., 1997; Gould et al., 1998). En 1992, se consiguieron aislar del cerebro de ratones adultos unas células indiferenciadas que, en cultivo, daban lugar a neuronas (Lois y Alvarez-Buylla 1993; Reynolds y Weiss 1992). En 1998, Peter Eriksson y colaboradores demostraron que también en el cerebro humano adulto existía el fenómeno de génesis de nuevas neuronas. En muestras *postmortem* de la formación hipocámpica de cinco enfermos de cáncer, a los que se le había inyectado el marcador mitótico bromo-desoxiuridina (BrdU), detectaron células que habían incorporado esta molécula, que por tanto se habían dividido, y que sin lugar a dudas, eran nuevas neuronas. Calcularon que aproximadamente en el giro dentado humano podrían nacer unas 500 neuronas nuevas cada día (Eriksson et al., 1998).



**Figura 3.** Zonas neurogénicas en el cerebro de ratón adulto. (A) La zona subventricular (SVZ) adyacente a los ventrículos laterales (LV) contiene células madre neurales GFAP-positivas (células B, en azul) que mantienen el contacto con la lámina basal (BL) de los vasos sanguíneos (BV). Estas células generan unas células transitorias de alta tasa de división (células C, en verde) que, a su vez, son las que generan los neuroblastos (célula A, en rojo) que migran hacia el bulbo olfatorio. (B) La zona subgranular (SGZ) del Giro Dentado (DG) del Hipocampo (HP) acoge otra población de células madre neurales (células As, en azul). Estas células, también en contacto con la lámina basal (BL) de los vasos sanguíneos (BV), dan lugar a progenitores neuronales (células D, en naranja) que maduran para convertirse en neuronas granulares (células G, en rojo). Tomado de Alvarez-Buylla y Lim, 2004.

Son dos las regiones del sistema nervioso central de mamíferos adultos donde se acepta la existencia de neurogénesis y reemplazo neuronal (**Figura 3**). Una es la capa subgranular del giro dentado del hipocampo, donde se generan nuevas neuronas granulares que se integran funcionalmente en los circuitos. La otra es la zona subventricular (SVZ) adyacente a los ventrículos laterales, en la que se generan precursores neuronales que migran hacia el bulbo olfativo, donde darán lugar a nuevas

interneuronas (Alvarez-Buylla et al., 2002; Doetsch et al., 1997). De estas dos regiones se pueden aislar células, que son expandidas *in vitro* y diferenciadas a los tres linajes neurales (Gritti et al., 1996; Morshead et al., 1994; Palmer et al., 1997; Vescovi et al., 1993). Hay también datos que apuntan a la existencia de neurogénesis en la médula espinal (Weiss et al., 1996), la corteza cerebral (Gould et al., 1999), o incluso otras zonas como la sustancia negra (Lie et al., 2002; Zhao et al., 2003), aunque los resultados son aún muy controvertidos (Frielingsdorf et al., 2004; Kornack y Rakic 2001).

La existencia de la neurogénesis no cambia del todo nuestra concepción del cerebro, pero sí el fenómeno del reemplazo neuronal (Nottebohm 2002). De los resultados de Nottebohm en pájaros se desprende que podrían tener una gran importancia en procesos de memoria y aprendizaje, donde un completo reciclaje celular ofrecería ventajas sobre la simple plasticidad sináptica (Nottebohm 2002). En los mamíferos adultos, sin embargo, el antiguo dogma no es del todo incierto: el fenómeno de la neurogénesis ocurre pero está considerablemente restringido. Aunque se ha observado cierta relación con la memoria (Shors et al., 2001) aún no está clara su importancia para los procesos de aprendizaje o para la auto-reparación. A pesar de ello, sabemos ahora que el cerebro adulto tiene una plasticidad que antes no sospechábamos, lo que abre nuevas posibilidades para la reparación del cerebro frente a lesiones o enfermedades neurodegenerativas.

## **2.- TERAPIAS CELULARES BASADAS EN CÉLULAS MADRE PARA ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS**

Actualmente ya se han llevado a cabo diversos ensayos clínicos de terapia celular para enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson (Hagell et al., 2002; Lindvall y Hagell 2000; Piccini 2002; Polgar et al., 2003) o la corea de Huntington (Bachoud-Levi et al., 2000a; Bachoud-Levi et al., 2000b; Bjorklund y Lindvall 2000; Freeman et al., 2000; Hauser et al., 2002; Philpott et al., 1997; Rosser et al., 2002; Watts y Dunnett 2000). Lo que se ha transplantado en estos casos es tejido procedente de fetos humanos. El origen fetal de las células comporta, además de las consideraciones éticas, varios problemas técnicos, como son su escasa disponibilidad y viabilidad, su alta heterogeneidad, y la incapacidad para expandir o conservar las células de estos tejidos. Dado el enorme potencial de proliferación y diferenciación que tienen las células madre y la posibilidad de aislarlas y manipularlas *in vitro*, se han propuesto numerosas estrategias de terapia celular basadas en el uso de estas células. Estas estrategias se pueden clasificar básicamente en dos tipos: terapias de sustitución celular o terapias de neuroprotección. También es posible intentar promover la propia capacidad regenerativa del cerebro mediante la estimulación de la neurogénesis.

### **2.1.- AUTO-REPARACIÓN A PARTIR DE CÉLULAS MADRE ENDÓGENAS.**

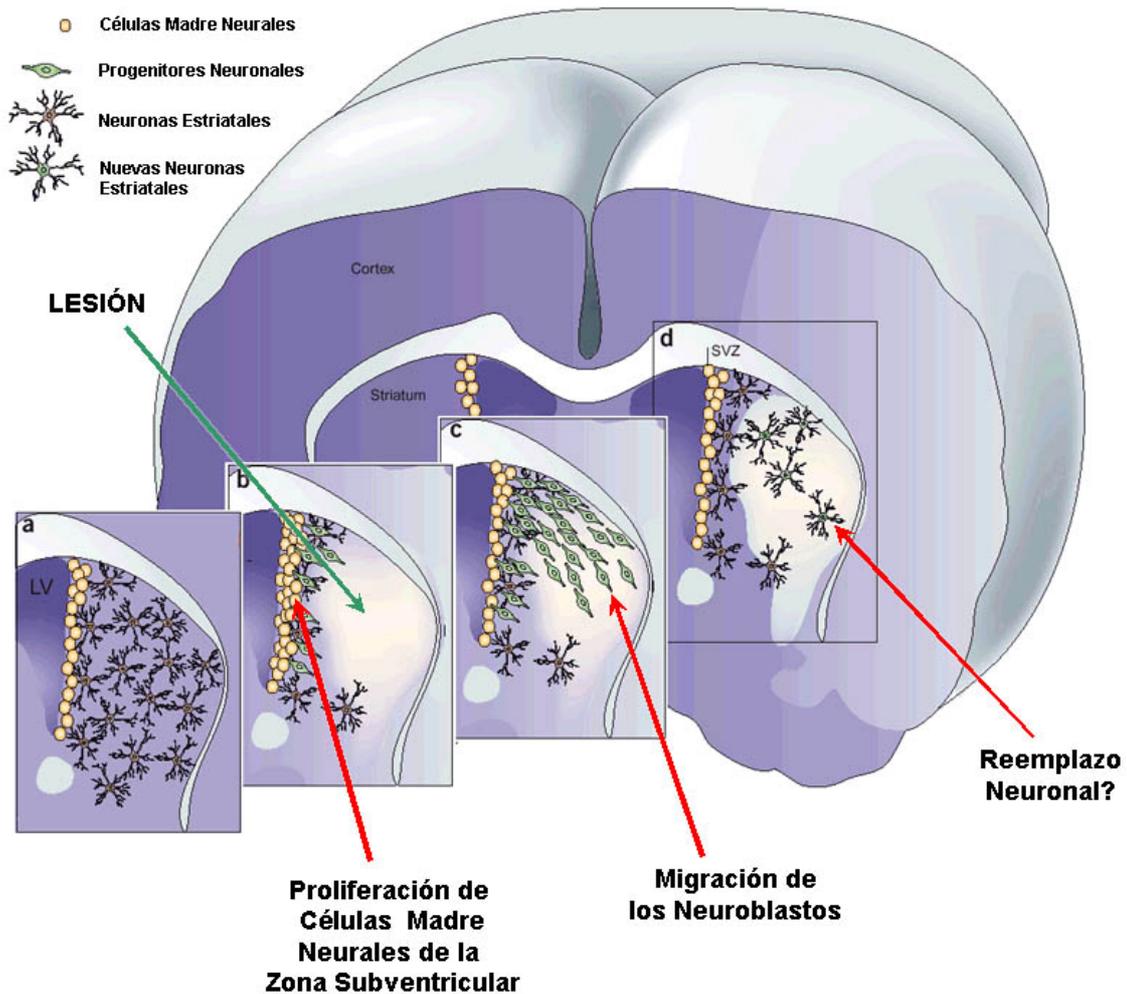
Aunque los fenómenos de neurogénesis y reemplazo neuronal se dan en el sistema nervioso adulto, son totalmente insuficientes para recuperar los daños causados por una enfermedad neurodegenerativa o un traumatismo. Sin embargo se cree que estos fenómenos podrían ser estimulados de alguna forma para conseguir efectos claramente beneficiosos.

Se sabe que la proliferación, supervivencia y muerte de las NSC o progenitores neuronales endógenos están altamente regulados (Alvarez-Buylla et al., 2002; Rossi y Cattaneo 2002). Se ha observado como el aprendizaje, el ejercicio y la riqueza de estímulos del entorno incrementan claramente la neurogénesis y el reemplazo neuronal (Kempermann et al., 1997; Lie et al., 2004; Nottebohm 2002; Van Praag et al., 2000).

El stress, por el contrario, reduce la neurogénesis (Duman et al., 1999), probablemente por la acción negativa de los glucocorticoides (Cameron y McKay 1999).

Estrategias basadas en la estimulación de la proliferación y/o la reducción de la muerte de los progenitores neuronales mediante la administración de moléculas biológicamente activas podrían promover el reemplazo de las neuronas dañadas. En esta línea se está estudiando la acción de diversos factores, tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Craig et al., 1996; Teramoto et al., 2003), el factor de crecimiento fibroblástico-2 (FGF2) (Jin et al., 2002; Kuhn et al., 1997; Wagner et al., 1999b; Yoshimura et al., 2001), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Benraiss et al., 2001; Chmielnicki et al., 2004; Gustafsson et al., 2003; Zigova et al., 1998), el factor de crecimiento parecido a la insulina-1 (IGF-1) (Aberg et al., 2000), el factor de crecimiento tumoral- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) (Fallon et al., 2000), la eritropoyetina (Shingo et al., 2001), inhibidores de caspasas (Ekdahl et al., 2002) y antiinflamatorios (Ekdahl et al., 2003; Monje et al., 2003). La administración de algunos de estos factores incrementa la proliferación de precursores neuronales tanto en la zona subventricular como en el giro dentado. Se ha visto como muchas de estas nuevas células adquieren fenotipos neuronales, migran a otras zonas, como el núcleo estriado o el bulbo olfativo, y pueden integrarse funcionalmente (Lindvall et al., 2004). Se ha postulado que los incrementos de neurogénesis observados tras el ejercicio o el aprendizaje pueden estar mediados, de hecho, por el incremento de estos factores tróficos (Goldman 1998; Van Praag et al., 1999).

La neurogénesis aumenta también como consecuencia del daño o degeneración neuronal (**Figura 4**). Se sabe que ciertas lesiones, como la isquemia global o parcial (Jin et al., 2003; Parent et al., 2002; Peterson 2002) o enfermedades neurodegenerativas como es el caso de la enfermedad de Huntington (Curtis et al., 2003) estimulan la proliferación de precursores de la zona subventricular, que migran a la zona dañada y adquieren un fenotipo neuronal correcto (Arvidsson et al., 2002). Sin embargo, sólo se consiguen regenerar un porcentaje pequeñísimo (<0.2%) de las neuronas perdidas. Se han mostrado evidencias reales de la existencia de integración específica y funcional de nuevas neuronas en el hipocampo después de una isquemia global (Nakatomi et al., 2002), lo que demuestra que el cerebro adulto realmente conserva la capacidad de



**Figura 4.** Auto-reparación neuronal a partir de células madre endógenas. (a-b) Una lesión que elimine la mayor parte de las neuronas estriatales puede inducir la proliferación de las células madre de la zona subventricular (SVZ) adyacente al ventrículo lateral (LV). (c) Estas nuevas células pueden generar neuroblastos que migrarán hacia la región lesionada. (d) Algunas de estas células se diferencian a nuevas neuronas con características estriatales. Modificado de Lindvall et al., 2004.

regenerarse. También en regiones no neurogénicas, como el corteza, se ha observado un reemplazo neuronal funcional, después de una muerte frotológica de las neuronas en la que no se causa un gran daño en la estructura global del tejido (Magavi et al., 2000). Esta observación apoya la hipótesis de la existencia de señales gliogénicas e inhibitoras de la neurogénesis en la mayor parte de casos de daño cerebral, señales que podrían ser contrarrestadas farmacológicamente si conociéramos su naturaleza exacta (Rossi y Cattaneo 2002). Es posible que la muerte neuronal active algún programa latente de reemplazo neuronal. Éste, aunque sea muy limitado, podría ser adecuadamente

estimulado mediante la administración de alguno de los factores anteriormente mencionados. Esto podría ser la base para terapias de auto-reparación a partir de las células madre endógenas del cerebro. Sin embargo, mientras no dispongamos de más conocimientos sobre las capacidades de auto-regeneración del sistema nervioso y mientras no se desarrollen métodos para estimular esta capacidad, se debe considerar la posibilidad de utilizar fuentes exógenas de células madre.

## **2.2.- TERAPIAS DE NEUROPROTECCIÓN.**

Las terapias de neuroprotección se basan en la administración de moléculas biológicamente activas que impidan o retrasen la degeneración y la muerte de las células nerviosas. En algunos casos es posible administrar sistémicamente fármacos que atraviesen la barrera hematoencefálica. Sin embargo, hoy se conocen factores de naturaleza proteica con potente acción neuroprotectora, cuyo principal problema es la vía de administración. Estas moléculas son, principalmente, las neurotrofinas, como el factor de crecimiento nervioso (NGF), el BDNF, la neurotrofina-3 (NT-3) o la neurotrofina 4/5 (NT4/5); ligandos de la familia del factor neurotrófico derivado de una línea celular glial (GDNF), como el GDNF, la neurturina (NTRN), la persefina y la artemina; citoquinas como el factor neurotrófico ciliar (CNTF), el TGF- $\alpha$ , etc. Para su administración se están ensayando diferentes estrategias: desde la infusión directa intracerebral de los factores en solución o la implantación de cápsulas liberadoras de estos factores, hasta la propiamente denominada terapia génica. En la terapia génica se pueden introducir los genes terapéuticos en el cerebro de diversas formas: mediante la transducción vírica directamente en las células del huésped, o indirectamente mediante el trasplante de células madre que liberarán los factores a su entorno.

Se han realizado varios trabajos en los que se transplantan algún tipo de células, como por ejemplo los fibroblastos, modificados para sobreexpresar factores neuroprotectores (Alberch et al., 2004; Chen y Gage 1995; Grill et al., 1997) pero estas células no se integran en el parénquima cerebral y suelen formar tumores.

Las propiedades inherentes de las NSC o líneas de progenitores neuronales las hacen ideales no sólo para terapias de sustitución celular sino también para ser

utilizadas como vehículos de liberación de moléculas neuroprotectoras. Numerosos estudios han demostrado que estas células muestran buena supervivencia y buena integración en el cerebro adulto. Migran extensamente y, o bien permanecen en estado indiferenciado quiescente o bien se diferencian hacia fenotipos mayoritariamente gliales, sin formar tumores en ningún caso (Martinez-Serrano y Bjorklund 1997; Park et al., 2002). Son células manipulables genéticamente, con lo que fácilmente se les puede introducir genes terapéuticos, genes marcadores o genes suicidas (que permitiría eliminar las células una vez transplantadas, si ello fuera necesario).

El trasplante de NSC manipuladas genéticamente se perfila, pues, como una estrategia realista para la administración de factores neuroprotectores (Arenas 2002; Martinez-Serrano y Bjorklund 1997) o para la restitución de proteínas defectuosas (Snyder et al., 1995) de forma local y selectiva en la región cerebral dañada, de forma estable o incluso regulable, y en las dosis correctas, evitando así efectos secundarios y ectópicos. Permiten también prescindir de la manipulación genética de las neuronas del huésped, a diferencia de la transducción vírica.

Otra de las propiedades de las NSC enormemente útiles para los tratamientos neuroprotectores y también neuroregeneradores es su capacidad de migrar selectivamente hacia zonas del cerebro que han sido dañadas o han degenerado (Aboody et al., 2000; Snyder et al., 1997). Dependiendo de la extensión del daño cerebral, este tropismo permitiría una liberación de forma local o por el contrario de forma más global en toda la zona afectada (Park et al., 2002; Yandava et al., 1999).

Algunos ensayos de neuroprotección usando NSC ya han comprobado su eficacia en modelos experimentales. El GDNF, la NTRN y la persefina tienen importantes efectos neuroprotectores sobre las neuronas dopaminérgicas, y su liberación intraestriatal por medio de NSC modificadas para sobreexpresarlos consiguen revertir los déficits motores en el modelo de lesión por 6-hidroxidopamina de la enfermedad de Parkinson (Akerud et al., 2001; Akerud et al., 2002). Del mismo modo se ha descrito el efecto protector del NGF y el BDNF secretados por NSC en modelos excitotóxicos de la enfermedad de Huntington (Kordower et al., 1997; Martinez-Serrano et al., 1996) o el efecto de la NT-3 y otros factores tróficos en trasplantes de NSC en lesiones de la médula espinal (Lu et al., 2003).

Una combinación de las estrategias de reemplazo celular con los de neuroprotección ofrecería un máximo aprovechamiento de las propiedades de las células madre, puesto que se ha visto como muchas de ellas sintetizan y secretan una gran variedad de factores tróficos (Cattaneo y Conti 1998; Lu et al., 2003; Mattsson et al., 1997).

### **2.3.- TERAPIAS DE SUSTITUCIÓN CELULAR.**

Las terapias de sustitución celular son el objetivo más común de la mayor parte de investigación actual en células madre, si bien son, *a priori*, las que representan un reto más importante. A grandes rasgos, se basan en la diferenciación del tipo adecuado de célula madre hacia el fenotipo celular que deseemos, de una forma controlada, homogénea y en las cantidades suficientes, para transplantarlas en la zona donde se espera que reemplacen la función de las neuronas desaparecidas.

Una terapia de sustitución celular se basa en los siguientes procesos (**Figura 5**):

1.- **Obtención** y aislamiento de las células madre con las propiedades celulares adecuadas a partir de la fuente que se considere óptima.

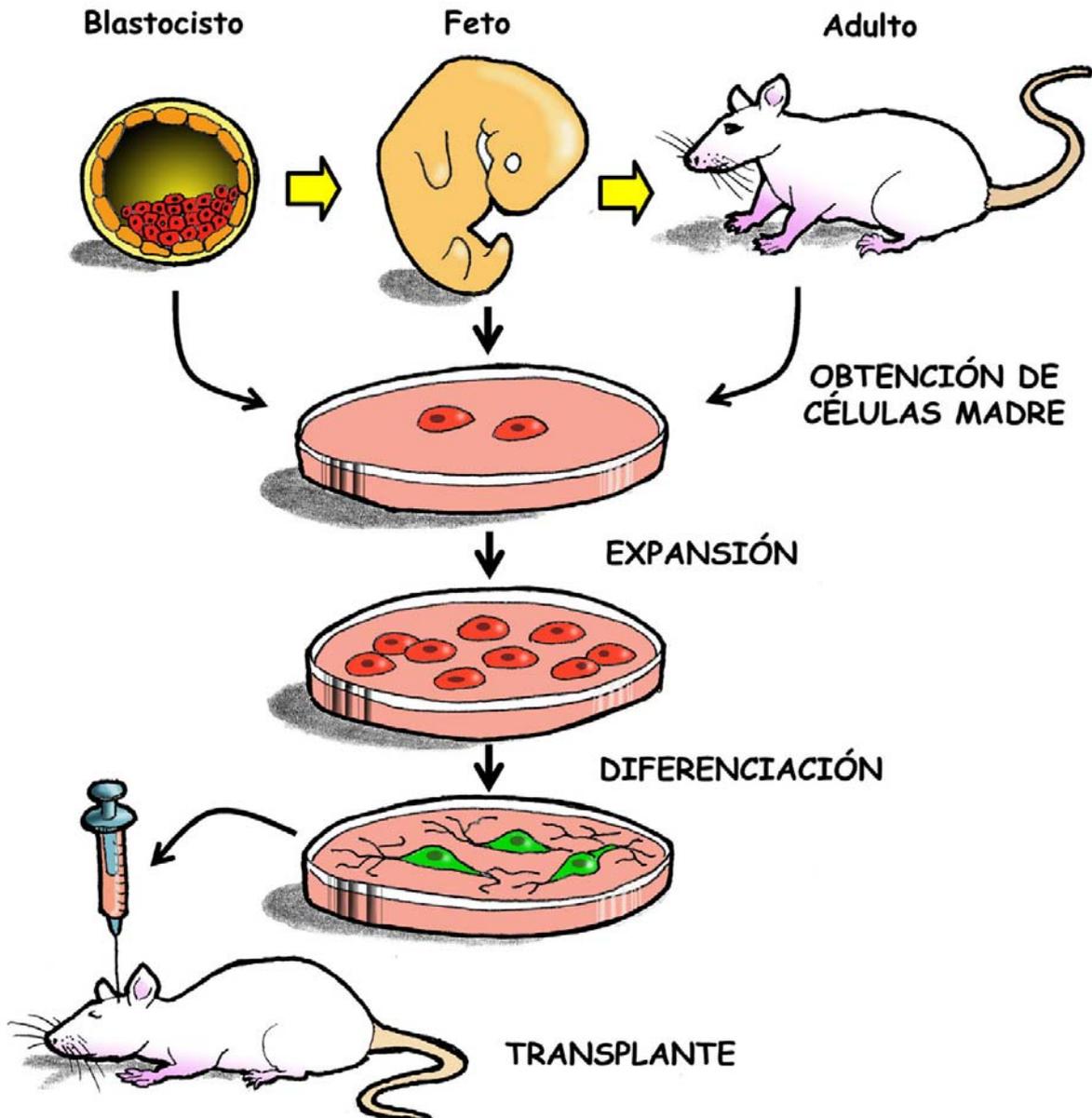
2.- **Expansión** de estas células en estado indiferenciado hasta conseguir la cantidad suficiente que necesitamos.

3.- **Diferenciación** eficaz y controlada hacia el tipo de célula neural especializada que precisemos para el tratamiento. Este proceso debe ser lo más eficaz y homogéneo posible. Puede ser necesaria una completa especialización o simplemente una restricción parcial de los progenitores.

4.- **Transplante** de las células a la zona dañada, donde tendrán que sobrevivir, integrarse en el tejido y desarrollar su función correctamente. Para garantizar el éxito de la terapia puede resultar imprescindible el establecimiento de los contactos pre- y post-sinápticos adecuados o el envío de axones a otras regiones del sistema nervioso.

### 2.3.1.- OBTENCIÓN Y MANIPULACIÓN DE CÉLULAS MADRE.

Existen distintas fuentes de células madre con diferentes propiedades de replicación y diferenciación (ver **capítulo 1.2**). Los principales tipos de célula que se



**Figura 5.** Fases de un ensayo de terapia de sustitución celular en modelos experimentales. *Las células madre se pueden obtener de diferentes fuentes, se expanden, se diferencian hacia el tipo celular adecuado y se transplantan en un animal adulto.*

han investigado para su posible aplicación en terapias de sustitución para enfermedades neurodegenerativas son las ESC, las NSC tanto de tejido fetal como de origen adulto y líneas de células inmortalizadas.

Hasta el momento han sido extraídas ESC de blastocistos de ratón, mono y hombre (Reubinoff et al., 2000; Thomson et al., 1995; Thomson et al., 1996; Thomson et al., 1998). Pueden ser expandidas en cultivo durante largo tiempo. ESC humanas, por ejemplo, han sido cultivadas durante más de 2 años duplicando su población más de 300 veces (Odorico et al., 2001). EGC humanas, por el contrario, sólo se han cultivado hasta unas 70-80 duplicaciones (Shamblott et al., 2001). Poco se conoce de los factores que mantienen las células madre en estado indiferenciado y proliferante. Normalmente las ESC se cultivan sobre una capa de fibroblastos embrionarios murinos (MEF) mitóticamente inactivados (Evans y Kaufman 1981; Martin 1981; Reubinoff et al., 2000; Thomson et al., 1998) y con la presencia de suero fetal bovino (FCS). Estos fibroblastos secretan factores solubles que inhiben la diferenciación espontánea y mantienen las ESC en estado indiferenciado (Smith et al., 1988). Uno de estos factores es el factor inhibidor de la leucemia (LIF) (Williams et al., 1988). Las ESC murinas, a diferencia de las humanas, pueden ser cultivadas en presencia de LIF, que sustituye la acción de la capa de fibroblastos (Reubinoff et al., 2000; Thomson et al., 1998; Xu et al., 2001). Si las ESC son cultivadas en flotación forman los llamados cuerpos embrioides, agregados clonales compuestos de mezclas de ESC indiferenciadas, progenitores, y células diferenciadas espontáneamente hacia toda clase de fenotipos.

Las NSC pueden ser aisladas de diversas regiones del sistema nervioso central tanto de fetos como de adultos. Son disgregadas y se cultivan sobre matrices adherentes o en flotación. Si son cultivadas en sustratos no adherentes, cada una de las células madre formará un agregado clonal en flotación llamado neuroesfera. Estas neuroesferas contienen una pequeña población de células madre multipotenciales (menor del 1%) (Morshead et al., 2002), así como precursores neurales más restringidos, a los que podemos llamar neuroblastos o glioblastos, y también múltiples células diferenciadas a los tres linajes neurales maduros: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Gage 2000).

De hecho, el propio aislamiento de las NSC, así como su definición funcional, se basan en la capacidad de producir neuroesferas *in vitro*. Esta capacidad declina progresivamente con la edad del embrión, y del mismo modo, a medida que avanza la

edad del adulto (Temple 2001). Algunos marcadores utilizados para reconocer las NSC son la nestina y el musashi, aunque presentan cierto grado de inespecificidad (Gage 2000).

Las NSC pueden ser mantenidas en estado proliferante mediante la adición de factores mitogénicos en el medio de cultivo, tales como el FGF o el EGF (Gage et al., 1995; Reynolds y Weiss 1992). Diferentes poblaciones de NSC responden de diferente forma a estos mitógenos (Kalyani et al., 1997; Weiss et al., 1996).

Otra fuente importante de células que ha sido muy utilizada como modelo para estudiar las propiedades de diferenciación, tanto *in vitro* como después de un trasplante, son las líneas inmortalizadas de NSC o progenitores neuronales (Martinez-Serrano y Bjorklund 1997). La inmortalización permite mantener las células en un continuo estado proliferativo, "congelando" su programa de desarrollo y evitando así su diferenciación espontánea. La forma más habitual de inmortalizar células madre o progenitores es mediante la introducción de genes oncogénicos (Bartlett et al., 1988; Frederiksen et al., 1988). Los dos oncogenes más usados son el v-myc y el alelo sensible a la temperatura del antígeno T grande (LTA) del virus SV40. Otros genes empleados han sido c-myc, neu, p53, E1A adenovírico, etc. Estas líneas inmortalizadas gozan de diversas ventajas: (a) pueden ser expandidas en cultivo en grandes cantidades; (b) al ser derivadas de un único clon generan poblaciones homogéneas de células madre en proliferación; (c) son fácilmente manipulables para introducir genes marcadores o genes terapéuticos; (d) en los múltiples casos estudiados, estas líneas retienen su multipotencialidad *in vitro* y en muchos casos *in vivo* (Akerud et al., 2001; Martinez-Serrano y Bjorklund 1997).

Algunas de las líneas inmortalizadas con las que se han llevado ensayos de neuroregeneración o neuroprotección *in vivo* son las siguientes:

- HiB5, derivada del hipocampo de rata a E16 (Renfranz et al., 1991).
- ST14A, derivada del núcleo estriado de rata a E14 (Cattaneo y Conti 1998).
- RN33B, RN46A, derivadas del rafe a E13 (White et al., 1994; Whittemore y White 1993).

- C17.2, derivada del cerebelo neonatal (Ryder et al., 1990; Snyder et al., 1992).
- CSM 14.1.4, derivada del mesencéfalo ventral a E14 (Anton et al., 1994).

### 2.3.2.- DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE.

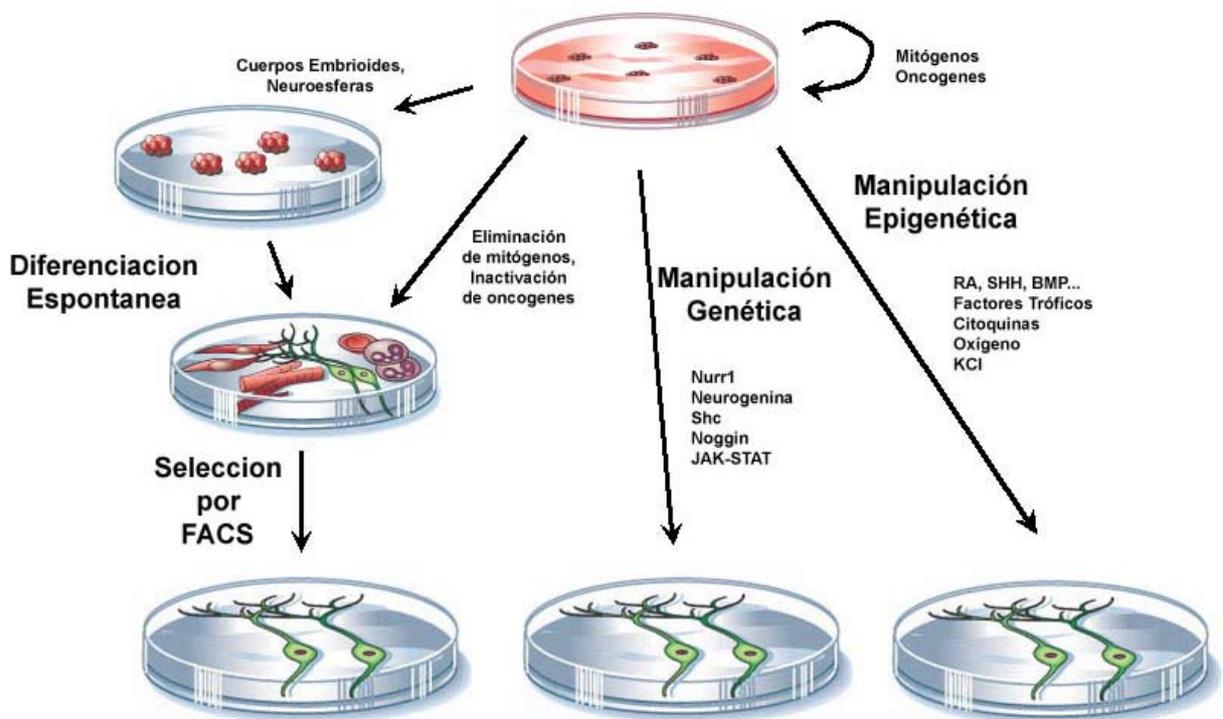
El principal reto para la futura aplicación de las terapias de sustitución celular es el control sobre la diferenciación de las células madre. Cada enfermedad necesita reemplazar un tipo concreto de neurona o célula glial. Es necesario, por lo tanto, el desarrollo de procedimientos que conduzcan eficazmente a las células madres hacia los tipos específicos de neuronas o células gliales que se precisen en cada caso.

La mayor parte de datos obtenidos hasta el momento a partir de trasplantes de todos los diversos tipos de células madre nos indican una clara necesidad de una diferenciación previa al trasplante (Bjorklund y Lindvall 2000; Donovan y Gearhart 2001; Rossi y Cattaneo 2002; Temple 2001). Las NSC o líneas derivadas de NSC han sido transplantadas en estado indiferenciado en varias regiones del cerebro. En el cerebro en desarrollo las células transplantadas son capaces de adquirir fenotipos neuronales específicos de la región circundante, lo que demuestra su multipotencialidad y su capacidad para responder a los estímulos neurogénicos (Doering y Snyder 2000; Englund et al., 2002b; Lundberg et al., 2002; Snyder et al., 1992). Sin embargo, el cerebro adulto no es tan permisivo a la neurogénesis y la mayor parte de las células que consiguen diferenciarse lo hacen hacia fenotipos gliales (Lundberg et al., 1997; Martinez-Serrano y Bjorklund 1997; Rubio et al., 2000; Snyder et al., 1997).

¿Cómo podemos dirigir la diferenciación de las células madre *in vitro*? Las ESC siguen procesos de diferenciación espontánea cuando se las cultiva en forma de cuerpos embrioides, o cuando se les retiran los factores que las mantienen indiferenciadas, como el LIF o la capa de fibroblastos de soporte (Donovan y Gearhart 2001). La adición de ácido retinoico (RA) las induce a adquirir fenotipos neuronales (Bain et al., 1996; Dinsmore et al., 1996; Okada et al., 2004). También las NSC se diferencian espontáneamente cuando se les retiran los factores mitogénicos o en la formación de las neuroesferas (Gage 2000). Sin embargo, lo que se pretende es una diferenciación

controlada que genere un solo tipo celular de la forma más homogénea posible y en la máxima cantidad. Para conseguir este objetivo se han seguido una serie de estrategias (Figura 6).

Una de ellas es permitir una diferenciación espontánea, que suele ser altamente heterogénea, y posteriormente aislar y purificar el tipo celular deseado. Ello se consigue con la detección de marcadores específicos y su selección por citometría de flujo (FACS) (Keyoung et al., 2001).



**Figura 6.** Estrategias de diferenciación de células madre en cultivo hacia fenotipos neuronales específicos. Las células madre se mantienen en estado indiferenciado y proliferante mediante la presencia de factores mitogénicos o la inserción de oncogenes. Con la eliminación de los mitógenos, la inactivación de los oncogenes o su cultivo en flotación en forma de cuerpos embrioides o neuroesferas se induce una diferenciación espontánea heterogénea. Mediante citometría (FACS) es posible seleccionar tipos celulares específicos con marcadores selectivos. Alternativamente, se consigue dirigir la diferenciación hacia tipos neuronales específicos mediante manipulación genética, introduciendo genes clave para la adquisición de determinados fenotipos. También es posible la manipulación del medio de cultivo, añadiendo factores epigenéticos que induzcan una diferenciación homogénea y específica. Dibujos tomados de Donovan y Gearhart 2001.

Otra estrategia consiste en la manipulación genética de las células madre. Cada vez se conocen más los patrones de expresión de genes del desarrollo que conducen a la adquisición de un determinado fenotipo. Por ejemplo, la Neurogenina (Hofstetter et al., 2005; Sun et al., 2001), el Noggin (Lim et al., 2000), o la isoforma C de Shc (Conti et al., 2001) inducen el fenotipo neuronal. Mediante la inserción de otro tipo de genes se han conseguido generar tipos celulares determinados (ver **capítulos 2.3.2.1, 2.3.2.2 y 3.3.1**).

La estrategia más utilizada para la diferenciación controlada consiste en la adición de factores epignéticos solubles al medio de cultivo. En este caso se intenta imitar el patrón de estímulos externos que una célula recibe durante su desarrollo natural, por acción de su entorno inmediato. Sabemos que, a parte del programa genético que una célula va activando en su historia personal, el entorno en el que se encuentra es quien decide en gran medida el futuro fenotípico de esa célula. Factores muy importantes en el desarrollo temprano del sistema nervioso han sido utilizados para estos propósitos, como el RA, *Sonic hedgehog* (Shh), las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP), etc. Las células gliales juegan un papel determinante instruyendo la posición, fenotipo y función de las neuronas a través de factores secretados (Hall et al., 2003; Song et al., 2002; Wagner et al., 1999a). Otros factores han demostrado su efecto en la determinación del destino fenotípico de las neuronas: factores tróficos (BDNF, NT-3, GDNF...), mitógenos (FGF, EGF...), citoquinas, concentración de suero, densidad celular, hormonas (insulina, hormona tiroidea...), concentración de oxígeno...etc (Shihabuddin et al., 1999).

En la actualidad se están llevando a cabo extensas investigaciones sobre la diferenciación específica de algunos tipos concretos de neuronas. La generación de neuronas dopaminérgicas es uno de los objetivos más buscados en la investigación actual sobre células madre, por su posible aplicación como terapia sustitutiva para la enfermedad de Parkinson (ver **capítulo 2.3.2.1**). Para el tratamiento de la Esclerosis Lateral Amiotrófica sería de gran utilidad la generación de neuronas de tipo colinérgico (ver **capítulo 2.3.2.2**). Las neuronas secretoras del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), por otro lado, podrían ser utilizadas para el tratamiento de la enfermedad de Huntington u otras patologías (ver **capítulo 3.3.1**).

También se está trabajando intensamente en la generación de ciertos fenotipos gliales, sobretodo de oligodendrocitos, para su posible uso en enfermedades desmielinizantes como la Esclerosis Múltiple o para la remielinización de axones en traumatismos medulares. En esta línea se ha descrito la obtención de oligodendrocitos a partir de ESC (Brustle et al., 1999; Liu et al., 2000), a partir de NSC (Carpenter et al., 1999; Zhang et al., 2000), y a partir de células madre de la médula ósea (Deng et al., 2001; Kohyama et al., 2001).

### **2.3.2.1.- Generación de neuronas dopaminérgicas.**

Los principales síntomas de la enfermedad de Parkinson -temblores, rigidez y hipocinesia- son causados por la degeneración y pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales y mesolímbicas (Carlsson 1993). La selectividad para este tipo celular y su localización bien definida hace de la enfermedad de Parkinson una de las enfermedades más adecuadas para ser tratadas mediante terapia celular.

El trasplante de ESC o de líneas de NSC indiferenciadas (Bjorklund et al., 2002; Yang et al., 2002) demuestra que puede darse cierta diferenciación dopaminérgica espontánea pero ésta suele ser escasa y heterogénea. Diversas estrategias se han seguido para conseguir una diferenciación eficaz de neuronas dopaminérgicas (Arenas 2002; Lindvall et al., 2004). ESC han sido expandidas y diferenciadas mediante la adición de factores solubles en los medios de cultivo (factores como el bFGF, FGF8, Shh, ácido ascórbico, AMPc, BDNF) tratando de emular el proceso de desarrollo natural de las células dopaminérgicas *in vivo* (Barberi et al., 2003; Lee et al., 2000). Cocultivos con capas de células estromales también son capaces de dirigir la adquisición del fenotipo dopaminérgico (Barberi et al., 2003; Kawasaki et al., 2000). Alternativamente, también se ha dirigido el proceso de diferenciación dopaminérgica de las ESC mediante manipulaciones genéticas, especialmente mediante la sobreexpresión de *Nurr1*, un gen esencial para la formación de las neuronas dopaminérgicas en el desarrollo del mesencéfalo ventral (Chung et al., 2002; Kim et al., 2002), o también mediante la introducción del gen *Bcl-x<sub>L</sub>* (Liste et al., 2004; Shim et al., 2004).

Las NSC han sido también dirigidas hacia el fenotipo dopaminérgico. La inserción de *Nurr1* combinado con el cocultivo con astrocitos tipo 1 del mesencéfalo ventral es capaz de generar hasta un 80% de neuronas dopaminérgicas a partir de una línea de precursores cerebelares (Wagner et al., 1999a). Factores solubles de la familia de las Wnt secretados por los astrocitos participan tanto en la proliferación como en la diferenciación de las células (Castelo-Branco et al., 2003). Precursores del mesencéfalo ventral también son expandidos y diferenciados mediante la eliminación de mitógenos (Studer et al., 1998) o mediante la adición de factores epigenéticos, como el FCS en combinación con interleuquinas (IL-1, IL-11), LIF, GDNF (Carvey et al., 2001; Storch et al., 2001), una mezcla de FGF8, GDNF y forskolin (Wang et al., 2004) o el ácido ascórbico (Yan et al., 2001). Un protocolo interesante que incrementa el rendimiento de diferenciación dopaminérgica consiste en cultivar las células en una atmósfera baja en oxígeno (Studer et al., 2000).

Células madre derivadas de un organismo adulto también son capaces de convertirse en neuronas dopaminérgicas. Células positivas para la tirosina-hidroxilasa han sido generadas a partir de NSC adultas de la zona subventricular, mediante la adición de medio condicionado de cultivos gliales (Daadi y Weiss 1999). Células con características dopaminérgicas se han obtenido también a partir de células madre mesenquimales adultas (Jiang et al., 2002; Jiang et al., 2003; Li et al., 2001).

### **2.3.2.2.- Generación de neuronas colinérgicas.**

Se conocen relativamente bien las moléculas señalizadoras, los factores de transcripción y la cascada de genes que se activan en el proceso de diferenciación de una motoneurona colinérgica. Están implicados genes como: *Shh*, *Mnr2*, *Lim3*, *Isl1*, *Isl2* y, sobretudo, *Hb9*, esencial para el paso final y el mantenimiento del fenotipo colinérgico (Arber et al., 1999; Jessell 2000; Wichterle et al., 2002). Se sabe que en el desarrollo los axones de estas motoneuronas son guiadas hasta sus dianas por *Hox-C*, cuya expresión está regulada por ciertos factores de crecimiento y por retinoides (Liu et al., 2001).

Se han generado motoneuronas colinérgicas a partir cuerpos embrionarios formados de ESC de ratón (Chiba et al., 2003; Renoncourt et al., 1998) diferenciándolas con RA y Shh (Wichterle et al., 2002) o bien seleccionando progenitores neurales que expresen E-NCAM, expandiéndolos posteriormente y diferenciándolos con RA, BMP-2 y BMP-4 (Mujtaba et al., 1999). EGC humanas, transplantadas en el fluido de la medula espinal de rata pueden migrar y generar, aunque en muy pequeñas cantidades, motoneuronas colinérgicas (Kerr et al., 2003). De un modo similar, se han aislado células madre multipotentes de la medula espinal fetal de roedores y se han expandido y diferenciado a neuronas colinérgicas (Kalyani et al., 1998; Mayer-Proschel et al., 1997). También se han generado estas neuronas a partir de líneas fetales humanas derivadas de la médula espinal (Li et al., 2000) o del cortex (Wu et al., 2002).

### 2.3.3.- TRANSPLANTE E INTEGRACIÓN FUNCIONAL.

El último paso de una terapia de sustitución celular es el transplante de las células manipuladas *in vitro* directamente en la zona donde se espera que realicen su acción terapéutica. Para garantizar el éxito de la terapia hay que asegurar, en primer lugar, la supervivencia de las células implantadas. En los trasplantes de tejido fetal es común una supervivencia del 5-10% del número total de células transplantadas (Arenas 2002; Brundin et al., 2000). En segundo lugar, es necesario asegurar la conservación del fenotipo adoptado previamente *in vitro*. Las neuronas deben conservar las características que las hacen terapéuticamente útiles, en especial, la secreción del neurotransmisor adecuado, ya sea dopamina, GABA, acetilcolina, glutamato, etc.

Dependiendo del tipo de lesión o neurodegeneración que pretendamos revertir, los requerimientos después del transplante pueden ser aún más complicados (Bjorklund y Lindvall 2000; Rossi y Cattaneo 2002). En algunos casos será suficiente que las células transplantadas conserven el fenotipo adecuado. En enfermedades desmielinizantes, por ejemplo, será necesario que la célula transplantada mantenga su identidad oligodendroglial y que efectúe las interacciones adecuadas con los axones de su inmediata vecindad. En el caso de la enfermedad de Parkinson puede ser suficiente un transplante ectópico de células dopaminérgicas en el núcleo estriado, donde secretarían dopamina de forma local y tónica. En otros casos, sin embargo, donde existe

una degeneración selectiva de uno de los componentes de un circuito neural, como ocurre en la Esclerosis Lateral Amiotrófica, en la enfermedad de Huntington o las ataxias cerebelares, las células deberán no sólo mantener su fenotipo sino, además, restablecer las conexiones post- y pre-sinápticas con las dianas correctas que conforman el circuito. Cuando, en último término, lo que tenemos es una degeneración global de una zona entera del cerebro, como es el caso de los traumatismos o isquemias cerebrales, la reconstrucción deberá ser más completa: será necesario la generación de múltiples tipos neuronales y gliales, y la reconstrucción de múltiples circuitos locales o de larga distancia (Rossi y Cattaneo 2002).

### 3.- TERAPIA CELULAR PARA LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

#### 3.1.- ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

##### 3.1.1.-PATOLOGÍA. GENÉTICA.

La enfermedad de Huntington (EH) es una enfermedad neurodegenerativa hereditaria caracterizada por disfunciones motoras y cognitivas (Martin y Gusella 1986; Ross 2002). Tiene una prevalencia de 5-10 afectados por cada 100 000 personas, sin distinción de sexo, raza u origen (Harper 1992). Presenta una herencia autosómica dominante y está causada por una mutación en el gen IT15, localizado en el brazo corto del cromosoma 4 (The Huntington's Disease Collaborative Research Group 1993). Este gen, que codifica para una proteína de 350 kDa llamada huntingtina, tiene una cadena polimórfica de repeticiones del trinucleótido CAG en el exón 1. Cuando se sobrepasan las 35 repeticiones, la proteína adquiere sus propiedades tóxicas y aparecen irremediablemente los síntomas de la enfermedad (McMurray 2001). Estos síntomas son principalmente de carácter motor, con una progresiva pérdida del control de los movimientos tanto voluntarios como involuntarios. Aparecen movimientos incontrolados, rápidos, de carácter coreico (del griego *chorea*, danza) del tronco y las extremidades corporales. Son comunes también las disfunciones emocionales, cambios de personalidad y un progresivo deterioro intelectual. Esta enfermedad suele aparecer entre los 35 y los 50 años de edad y empeora progresivamente hasta la muerte de los pacientes, unos 15-20 años después. Existen también casos de aparición juvenil, mucho más severos y rápidos. De hecho, hay una correlación inversa entre el número de tripletes CAG y la edad de aparición de la enfermedad (Persichetti et al., 1995): a mayor número de tripletes, antes aparecen y más severos son los síntomas de la enfermedad.

La EH se caracteriza neuropatológicamente por la desaparición de las neuronas del núcleo estriado (núcleos Caudado y Putamen). Concretamente hay una muerte selectiva de las neuronas GABAérgicas de proyección de tamaño medio, que constituyen el 95% del total de neuronas de este núcleo (Vonsattel y DiFiglia 1998). Estas neuronas se dividen en dos subpoblaciones. En primer lugar, las que proyectan a la *substantia nigra pars reticulata* y al segmento interno del *globus pallidus*,

identificables por la expresión de sustancia P y dinorfina, y que constituyen la llamada vía directa de los ganglios basales. En segundo lugar, las que proyectan al segmento externo del *globus pallidus*, identificables por la expresión de encefalina, y que conforman la vía indirecta de los ganglios basales. Tanto la vía directa como la indirecta son fundamentales en los circuitos que conectan la corteza con los ganglios basales y que, a través del tálamo, vuelven a la corteza cerebral (Gerfen 1992; Graybiel 2000). En la EH se observa una degeneración inicial de las neuronas encefalinérgicas, lo que explicaría los primeros síntomas hiperkinéticos, seguido de una degeneración más general en las dos poblaciones estriatales, que correlaciona con la aparición de las acinesias (Reiner et al., 1988; Richfield et al., 1995). Las interneuronas estriatales, por el contrario, no resultan estar afectadas. Paralelamente al deterioro estriatal tiene lugar una disfunción de las neuronas corticales, disfunción que no sabemos hoy en día si es causa o consecuencia de la muerte neuronal en el núcleo estriado (Laforet et al., 2001; MacDonald y Halliday 2002). A medida que avanza la enfermedad tiene lugar la muerte de esas neuronas corticales, sobretodo en las capas III, V y VI de la corteza motora y asociativa (MacDonald y Halliday 2002). En estadios avanzados, la neurodegeneración se extiende al *globus pallidus*, núcleo subtalámico y otras estructuras (Rubinsztein 2002).

### 3.1.2.-MECANISMOS MOLECULARES. HIPÓTESIS.

La mutación en la huntingtina es el punto de origen de una cascada de eventos que conducen a la degeneración y muerte de estas poblaciones neuronales. Sin embargo, los mecanismos moleculares que conducen a la muerte selectiva de las neuronas estriatales son aún desconocidos. La huntingtina se encuentra de forma ubicua en todas las neuronas del cerebro y en otros tejidos no neuronales, y su expresión no correlaciona especialmente con el patrón de degeneración neuronal (Fusco et al., 1999).

La función exacta de la huntingtina también es desconocida. Es una proteína citoplasmática que interacciona con proteínas asociadas a vesículas y al citoesqueleto, lo que sugiere una función de transporte intracelular, axonal o bien en reciclaje de membranas (Gusella y MacDonald 1998). También se han descrito propiedades antiapoptóticas (Gervais et al., 2002; Rigamonti et al., 2000) y de interacción con

factores de transcripción (Petersen et al., 1999; Reddy et al., 1999). Además, su función durante el desarrollo debe ser importante puesto que los ratones en los que se han eliminado los dos alelos del gen de la huntingtina mueren en estado embrionario temprano (Duyao et al., 1995; Nasir et al., 1995).

Existen varias hipótesis sobre las razones de esta degeneración y de su selectividad. La mayor parte de evidencias apuntan a la acción tóxica de la huntingtina, es decir a una ganancia de función, como responsable de la patología, por bien que estudios recientes indican que también una pérdida de la función natural de la proteína podría ser causante de las disfunciones (Cattaneo et al., 2001). Hace años que se baraja la hipótesis de la muerte de las neuronas estriatales por excitotoxicidad causada por el glutamato cortical. La lesión excitotóxica del núcleo estriado mimetiza muchas de las características neuropatológicas de la EH (DiFiglia 1990) y además se ha visto en modelos transgénicos una hipersensibilidad a la sobreactivación de los receptores NMDA (Zeron et al., 2002).

Otra hipótesis que se tiene en cuenta es la disfunción del metabolismo energético. Las neuronas estriatales son especialmente sensibles a las toxinas de acción mitocondrial (Brouillet et al., 1999) y en pacientes de la EH se han detectado alteraciones del metabolismo energético (Beal 1995).

La tercera hipótesis implica una pérdida del aporte trófico de las células estriatales. Se ha observado una disminución de la expresión de BDNF en la corteza cerebral de pacientes de la EH (Ferrer et al., 2000; Zuccato et al., 2001) por acción de la huntingtina mutada. La huntingtina mutada también parece ser responsable de alteraciones del transporte axonal (Gauthier et al., 2004) con lo que el aporte de BDNF de la corteza al núcleo estriado podría quedar reducido. Una reducción de la expresión de BDNF, asimismo, empeora los síntomas de modelos de la EH e induce una neurodegeneración estriatal más severa y más selectiva (Canals et al., 2004; Pineda et al., 2005)

Probablemente las causas de la EH se encuentren en una conjunción de estos tres fenómenos, y de otras interacciones de acción tóxica que la huntingtina mutada ejerce sobre sistemas de transcripción o señalización (Alberch et al., 2004; Cha 2000).

### **3.1.3.- MODELOS EXPERIMENTALES DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON.**

La investigación sobre la EH dispone de buenos modelos animales que simulan en gran medida los procesos que tienen lugar en la patología humana. Estos modelos han sido de gran ayuda para la elucidación de mecanismos moleculares de la muerte neuronal en general y están siendo utilizados para la búsqueda de terapias efectivas para esta enfermedad.

Desde los años 70 se han utilizado modelos de la EH basados en dos fenómenos relacionados con su patología: la excitotoxicidad y la disfunción del metabolismo energético.

El modelo excitotóxico de la EH consiste en la inyección intraestriatal de agonistas de los receptores NMDA, como el ácido quinolínico (QA) (Beal et al., 1986; Beal et al., 1991; Hantraye et al., 1990), o agonistas de los receptores AMPA/Kainato, como el ácido kaínico (Coyle y Schwarcz 1976; McGeer y McGeer 1976). Estas moléculas sobreactivan los receptores del glutamato induciendo una entrada masiva de sodio y calcio, que acaba produciendo la muerte neuronal por apoptosis o necrosis. Con las dosis adecuadas de estas excitotoxinas, este modelo reproduce el patrón de muerte observada en la EH (Alberch et al., 2002), es decir, las neuronas GABAérgicas de proyección son mayoritariamente eliminadas, sin afectar las interneuronas y la innervación dopaminérgica.

La administración sistémica del ácido 3-nitropropiónico (3-NPA) también mimetiza muchos de los parámetros descritos en la EH. El 3-NPA es un inhibidor de la succinato deshidrogenasa que bloquea la producción energética mitocondrial. Su administración crónica produce disfunciones motoras y lesiones selectivas del núcleo estriado que se asemejan a las de la EH (Borlongan et al., 1995; Brouillet et al., 1999; Guyot et al., 1997).

Desde el descubrimiento del gen responsable de la EH en 1993, se han desarrollado numerosos animales transgénicos que reproducen con más precisión la progresiva neurodegeneración observada en la EH. Existen ratones transgénicos en los que se les ha insertado el exon 1 del gen de la huntingtina con 115 (ratón R6/1) o 145

repeticiones de CAGs (ratón R6/2, el más estudiado hasta el momento) (Mangiarini et al., 1996), ratones que expresan el gen entero de la huntingtina humana mutada incluido su promotor (ratón YAC72) (Hodgson et al., 1999), o con otros promotores (ratón HD89) (Reddy et al., 1998). También se han desarrollado ratones "knock in", en los que el gen mutado ha sido insertado en el propio *locus* del gen de la huntingtina, sustituyéndolo (Lin et al., 2001; Wheeler et al., 2000). Un modelo interesante es la línea HD94 condicional, donde el transgen se expresa sólo en el telencéfalo y puede ser inactivado en cualquier momento por medio de un sistema regulado por tetraciclina (Yamamoto et al., 2000).

### **3.2.-TERAPIA DE NEUROPROTECCIÓN PARA LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON.**

Los estudios realizados en los modelos de la EH por inyección de toxinas han permitido conocer el patrón de requerimientos tróficos de las neuronas estriatales (Alberch et al., 2004). La familia de las neurotrofinas, la del GDNF, y el CNTF han demostrado poseer una potente actividad neuroprotectora en esa población neuronal. El principal problema para la implementación de terapias basadas en estos factores tróficos es la vía de administración. Tanto las pruebas en modelos animales como los propios ensayos clínicos apuntan a la necesidad de una administración de forma estable, prolongada en el tiempo, extendida en toda la región afectada y en las dosis adecuadas (Thoenen y Sendtner 2002). La terapia génica basada en vectores virales o el trasplante de células secretoras de estos factores se erigen como las estrategias más prometedoras para la consecución de estos fines.

En una primera aproximación de terapia celular se han llevado a cabo varios estudios en los que la implantación de fibroblastos modificados para la sobreexpresión de estos factores ha demostrado su eficacia en los modelos excitotóxicos de la EH. La administración por esta vía de NGF (Frim et al., 1993; Schumacher et al., 1991), BDNF, NT-3 y NT4/5 (Gratacos et al., 2001; Perez-Navarro et al., 1999a; Perez-Navarro et al., 2000b), y también de GDNF y NTRN (Marco et al., 2002; Perez-Navarro et al., 1999b; Perez-Navarro et al., 2000b; Perez-Navarro et al., 2000a) consiguen revertir el daño neuronal causado por la inyección de las excitotoxinas.

Otra aproximación estudiada ha sido la encapsulación de estos fibroblastos dentro de membranas permeables. Con este método se ha comprobado la eficacia neuroprotectora del CNTF sobre las neuronas estriatales GABAérgicas en una gran variedad de modelos de la EH. En los modelos excitotóxicos en rata, el CNTF es capaz de revertir déficits motores y cognitivos (Emerich et al., 1996; Emerich et al., 1997a; Emerich et al., 1997b). Los ensayos en modelos de primates no-humanos, tanto por inyección de excitotoxinas como por la administración de 3-NP, también han confirmado la eficacia de esta estrategia (Emerich et al., 1997a; Emerich et al., 1997b; Kordower et al., 1999; Mittoux et al., 2000). Estos resultados han permitido el inicio de ensayos clínicos en pacientes de EH, donde se está evaluando actualmente el implante de estas cápsulas con fibroblastos secretores de CNTF (Bachoud-Levi et al., 2000b).

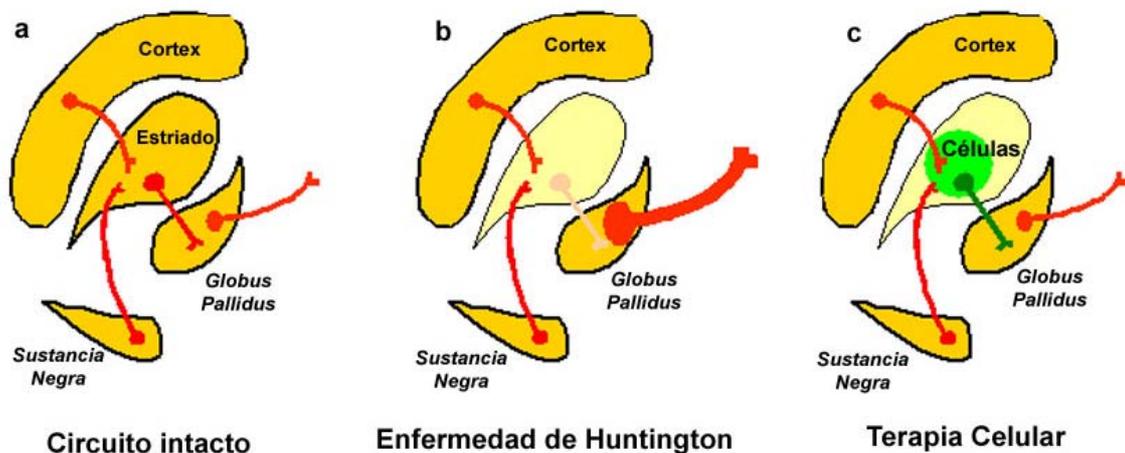
Los fibroblastos, sin embargo, no son una buena herramienta para una terapia celular eficaz, puesto que no se integran adecuadamente en el tejido y no dejan de proliferar, produciendo tumores en el cerebro. Las NSC o líneas de progenitores neuronales prometen convertirse en excelentes vehículos de administración de estos factores (ver **capítulo 2.2**). Los primeros ensayos con estas células han consistido en el transplante de líneas de NSC modificadas genéticamente para la secreción de NGF (Kordower et al., 1997; Martinez-Serrano et al., 1996) o de BDNF (Martinez-Serrano y Bjorklund 1996) en modelos excitotóxicos de la EH, donde demuestran su potencial neuroprotector sobre las neuronas estriatales. Debido a su reciente implicación en la propia patogénesis de la EH, y su potente acción sobre las neuronas estriatales y corticales, el BDNF se perfila como uno de los factores clave para el desarrollo de terapias de neuroprotección para la EH (Alberch et al., 2004).

### **3.3.-TERAPIA DE SUSTITUCIÓN CELULAR PARA LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON.**

La completa ausencia de tratamiento actual para la EH y la localización precisa de la población neuronal que degenera, así como la especificidad del tipo de neurona afectada, hacen de esta enfermedad un objetivo ideal para ser tratada mediante terapia celular. Aún así, para observar mejoras funcionales, no sólo será necesario repoblar el

núcleo estriado con neuronas GABAérgicas de proyección, sino que es necesaria la reconstrucción parcial del circuito que conecta la corteza con el núcleo estriado y éste con el *globus pallidus* (Bjorklund y Lindvall 2000; Peschanski et al., 2004) (**Figura 7**).

En los ensayos realizados hasta el momento en modelos animales de la EH, los trasplantes de tejido estriatal de origen fetal han dado resultados prometedores. Los primeros estudios sobre trasplante de células fetales intraestriatales se realizaron en 1983 (Deckel et al., 1983). Desde entonces se ha demostrado que los trasplantes de estas células muestran una buena integración y diferenciación (Isacson et al., 1985; Rosser et al., 2002), son capaces de establecer conexiones aferentes de la corteza o la sustancia negra y de enviar conexiones eferentes hacia el *globus pallidus* (Dunnett et al., 2000; Nakao et al., 1999; Pundt et al., 1996b). También son capaces de restablecer la sensibilidad a la dopamina (Chen et al., 2002) y revertir los déficits de comportamiento



**Figura 7.** Reconstrucción del circuito cortico-estriato-palidal mediante terapia celular en la EH. (a) El núcleo estriado juega un papel central en los circuitos de los ganglios basales que controlan el movimiento. (b) En la EH tiene lugar una degeneración inicial de las neuronas GABAérgicas del núcleo estriado que proyectan al *globus pallidus*, que se traduce en una desinhibición de las neuronas palidales. (c) El trasplante de células GABAérgicas en el núcleo estriado podría reconstruir el circuito cortico-estriato-palidal.

tanto locomotor como de aprendizaje de los modelos de la EH (Isacson et al., 1986; Pundt et al., 1996a; Brasted et al., 1999; Dunnett 1995). Este grado de reconstrucción del circuito y de recuperación funcional se da también en los trasplantes fetales realizados en modelos de primates de la EH (Kendall et al., 1998; Palfi et al., 1998).

Estos esperanzadores resultados en modelos animales permitieron iniciar con cierto optimismo los ensayos clínicos en pacientes de la EH (Hantraye et al., 1992; Philpott et al., 1997; Rosser et al., 2002). Los trasplantes de tejido estriatal fetal humano en pacientes de la EH sobreviven sin mostrar signos patológicos de la enfermedad. Contienen neuronas de proyección e interneuronas y reciben aferencias del propio cerebro del paciente (Freeman et al., 2000). Los beneficios terapéuticos sin embargo están aún en fase de evaluación. Bachoud-Levi y colaboradores han observado mejoras de comportamiento motor y cognitivo en la mayoría de los pacientes dos años después de los trasplantes (Bachoud-Levi et al., 2000c). Las mejoras observadas están asociadas a aumentos del metabolismo cortical y estriatal, lo que sugiere que los trasplantes reestablecen la funcionalidad del circuito cortico-estriatal (Gaura et al., 2004). Otro estudio, por el contrario, no ha detectado hasta el momento claras mejorías en los pacientes que han sido transplantados (Hauser et al., 2002), si bien en este caso todos los pacientes eran de avanzada edad y con un grado de patología más severo (Peschanski et al., 2004).

### **3.3.1.- Generación de neuronas GABAérgicas.**

Como ya se ha comentado, la obtención de células a partir de fetos humanos conlleva varios problemas técnicos y éticos. La nueva tecnología basada en las células madre podría ofrecer una alternativa para la obtención de neuronas útiles para reconstruir los circuitos estriatales. La estrategia consistiría en generar nuevas neuronas o neuroblastos restringidos a fenotipo estriatal, ya sea a partir de ESC o NSC, controlando eficientemente su diferenciación. Debería mejorarse la supervivencia e integración de estas células con respecto a los trasplantes de tejido fetal efectuados hasta el momento (Freeman et al., 2000) y conseguir que estas células lleguen a enviar sus axones para contactar con el *globus pallidus* y que reciban también conexiones de la

corteza y la sustancia negra (**Figura 7**). El fenotipo que hemos de conseguir es pues el de las neuronas de proyección del núcleo estriado cuyo neurotransmisor es el GABA.

Se sabe muy poco aún de las señales o los mecanismos génicos que gobiernan la formación y diferenciación de las células GABAérgicas del núcleo estriado (Campbell 2003; Hamasaki et al., 2003; Jain et al., 2001). Se conocen varios genes del desarrollo implicados en la generación de las neuronas estriatales como, por ejemplo, los genes *Dlx1/2*, *Gsh2*, *Mash1*, *Isl1* y *Nolz1* (Anderson et al., 1997; Chang et al., 2004; Nery et al., 2002; Sussel et al., 1999; Toresson et al., 2000). Los precursores estriatales responden también a factores epigenéticos. Estudios previos sobre la diferenciación en el desarrollo sugieren la implicación de las neurotrofinas (Mizuno et al., 1994; Vicario-Abejon et al., 1998; Yamada et al., 2002) y también de la actividad neuronal (Ciccolini et al., 2003; Gu y Spitzer 1995; Patz et al., 2003; Watt et al., 2000) en la adquisición del fenotipo GABAérgico.

Aunque se ha observado que en muchos casos unos de los fenotipos principales que aparecen en las diferenciaciones neuronales espontáneas es el GABAérgico (Jain et al., 2003), resultaría mucho más conveniente disponer de protocolos estandarizados de obtención de neuronas GABAérgicas en un alto porcentaje y de forma homogénea. Además, en los trasplantes intraestriatales realizados hasta el momento con células madre sin previa diferenciación, ya sea de ESC (Dinsmore et al., 1996), células de la médula ósea (Lescaudron et al., 2003) o NSC procedentes de neuroesferas (Fricker et al., 1999) o inmortalizadas (Akerud et al., 2001; Lundberg et al., 1997; Martínez-Serrano y Bjorklund 1997; Rubio et al., 2000; Snyder et al., 1997) se ha detectado un bajísimo o un nulo porcentaje de diferenciación espontánea hacia fenotipos estriatales (Englund et al., 2002a; Rossi y Cattaneo 2002).

En esta línea hay pocos trabajos donde se intente manipular algún tipo de célula madre, ya sea de forma genética o epigenética, para la generación selectiva de células GABAérgicas. Barberi y colaboradores han publicado recientemente una serie de protocolos para la obtención de fenotipos neuronales específicos, entre ellos el GABAérgico, a partir de ESC. En la diferenciación GABAérgica, las células son cultivadas sobre una capa de células mesenquimales de soporte, donde se añaden diversos factores de forma secuencial al medio de cultivo, entre ellos el bFGF, FGF8 y

SHH, con un último paso de exposición a las neurotrofinas BDNF y NT-4 (Barberi et al., 2003). No se ha estudiado, sin embargo, la integración de estas células después de un trasplante.

## **II. OBJETIVOS**



## OBJETIVOS

El objetivo principal de la presente tesis es el desarrollo de una terapia celular basada en la diferenciación *in vitro* de células madre neurales hacia neuronas GABAérgicas.

Los objetivos más concretos son:

1. Estudio de los factores y los mecanismos implicados en la diferenciación de células madre neurales hacia neuronas GABAérgicas.
2. Estudio de los factores relacionados con la supervivencia de las células madre neurales en el proceso de diferenciación *in vitro*.
3. Estudio de la supervivencia y estabilidad fenotípica de las células pre-diferenciadas *in vitro* tras su trasplante en el núcleo estriado adulto.
4. Estudio de la integración y funcionalidad de las células pre-diferenciadas tras su trasplante en un modelo excitotóxico de la enfermedad de Huntington.



# **III. MATERIALES Y MÉTODOS**



## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.- CULTIVOS CELULARES.

La línea de células madre ST14A utilizada en nuestros experimentos ha sido desarrollada por el laboratorio de la Dra. Elena Cattaneo de la Universidad de Milán (Cattaneo y Conti 1998). Ha sido transducida mediante retrovirus con el vector PINCO, que le confiere una expresión constitutiva del gen de la proteína verde fluorescente (EGFP, del inglés *Enhanced Green Fluorescent Protein*) (Conti et al., 2001).

Estas células proliferan indefinidamente a la temperatura permisiva de 33°C en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Gibco-BRL, Renfrewshire, Scotland, UK) suplementado con piruvato sódico (0,11 g/l), bicarbonato sódico (3,7 g/l), glutamina (0,29 g/l), HEPES (3,9 g/l), penicilina-estreptomicina (100 unidades/ml) y, además, un 10% de suero fetal bovino (FCS; Gibco-BRL).

En los experimentos de optimización de la supervivencia a 33°C o a 39°C, los medios de diferenciación sin suero que han sido utilizados son: (1) el medio B27 compuesto por el suplemento B-27 (Gibco-BRL) disuelto en medio MEM (Modified Eagle Medium; Gibco-BRL) y suplementado con penicilina-estreptomicina (100 unidades/ml), y (2) el medio N2 consistente en la mezcla a partes iguales de F12 (Gibco-BRL) y MEM (Gibco-BRL), suplementado con insulina (5 ng/ml), transferrina (50 µg/ml), putrescina (50 µM), progesterona (10 nM), selenio (15 nM), glucosa (3 mg/ml) y albúmina bovina sérica (BSA; 0,5 mg/ml; Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). Las células son sembradas a la densidad de  $2,5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> sobre cubreobjetos preincubados con poli-ornitina al 0,002% (Sigma) en placas de 24 pocillos.

Las moléculas testadas en estas condiciones de cultivo han sido: aFGF (20-40 ng/ml; Promega, Madison, WI), bFGF (20-40 ng/ml; Promega), EGF (10-20 ng/ml; Promega), el inhibidor genérico de caspasas z-VAD-FMK (50-100 µM; Calbiochem, San Diego, CA), forskolina (50 µM; Sigma), isobutilmetilxantina (IBMX; 0,25 mM; Sigma), 12-miristato 13-acetato de forbol (TPA; 200 nM; Sigma), dopamina (DA; 20 µM; Sigma),  $\alpha$ -tocoferol (Vitamina E; 10 µM; Sigma), el isómero todo-trans del ácido

retinoico (RA; 0,5-10  $\mu$ M; Sigma), BDNF (10-50 ng/ml; Preprotech EC Ltd., London, UK), NT-3 (10-50 ng/ml; Preprotech), GDNF (10-50 ng/ml; Preprotech), NTRN (10-50 ng/ml; Preprotech ), y KCl (40 mM; Merck, Barcelona).

En algunos experimentos, las células han sido cultivadas con medio condicionado de astrocitos o cocultivadas con astrocitos. Estos astrocitos han sido extraídos del núcleo estriado de crías de rata del día postnatal 1 (P1) y han sido purificadas siguiendo un protocolo estándar (McCarthy y de Vellis 1980). Los astrocitos son cultivados hasta la confluencia en medio suplementado con suero. Seguidamente se les cambia el medio a N2 y se mantienen así hasta los 4 días *in vitro* (DIV). Los cocultivos se realizaron sembrando las células ST14A en cultivos de astrocitos justo en el cambio de medio a N2 o a los 4 DIV de ese cambio.

El protocolo finalmente diseñado para los estudios de diferenciación a 39°C consiste en sembrar las células a la densidad de  $2,5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> sobre cubreobjetos pre-tratados con poli-ornitina en placas de 24 pocillos en medio B27 suplementado con un 1% de suero fetal bovino (FCS; Gibco). Al cabo de 2 DIV se cambia el medio a N2 suplementado con un 0,5% de FCS. A estas condiciones las llamamos condiciones basales. En estas condiciones se ha examinado el efecto de la adición de 10  $\mu$ M de RA de los 2 DIV a los 7 DIV y la adición de BDNF, NT-3, GDNF y NTRN (todos a 50 ng/ml) o 40 mM de KCl, desde los 7 DIV hasta los 15 DIV.

En algunos experimentos se ha ensayado la adición de KCl en cultivos no tratados con RA. En otros se ha añadido el KCl durante solamente 1 día, 2 días o 4 días a partir de los 7 DIV. En los experimentos de bloqueo de la entrada de calcio al interior de la célula, a los 7 DIV se añade 1,5 mM de EGTA al medio basal o al medio con KCl (40 mM). Un día después se cambia este medio por el medio basal. El recuento del número de células proliferantes y los análisis morfológicos se efectúa a los 15 DIV. En los cultivos controles en los que no se ha añadido el factor a estudiar se ha realizado igualmente el cambio de medio, para una perfecta comparación entre condiciones.

## **2.- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DE CALCIO.**

Las células son sembradas a la misma densidad de  $2,5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>, en portaobjetos equipados con una cámara de incubación (Lab-Tek Nalge Nunc International) de 1,8 cm<sup>2</sup> de área, pre-tratados con poli-ornitina. Las células son cultivadas siguiendo el protocolo descrito como condiciones basales o siguiendo el tratamiento con RA a 10  $\mu$ M. A los 7 DIV, después de un lavado, las células son incubadas con Fluo-4 acetoximetil-éster (2  $\mu$ M) y ácido plurónico al 0,02% (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) en medio de condición basal durante 30 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente se realizan tres lavados de 5 min a 37°C para permitir la hidrólisis del éster.

Los niveles intracelulares de Ca<sup>2+</sup> se miden individualmente en el soma de la célula a 39°C utilizando un microscopio espectral confocal invertido de escaneado por láser (DMIRE2; Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Germany) con láseres de Argón y He-Ne acoplado a una cámara de incubación donde se controla la temperatura y la concentración de CO<sub>2</sub>. Las imágenes se toman con una lente de inmersión en aceite de 63x (NA 1.32), con una línea de excitación de láser de 488 nm, y un rango de detección de la emisión a 500-600 nm, y se procesan usando el paquete informático *Image Processing Leica Confocal Software*.

Para los experimentos de despolarización, se toman imágenes cada 5 segundos en un periodo total de 10 min. El KCl se añade a los 110 segundos a una concentración final de 40 mM. La concentración de Ca<sup>2+</sup> se calcula como se describe en Kao et al., 1989, asumiendo una K<sub>d</sub>=345 nM. Los valores de F<sub>max</sub> se obtienen en presencia de una alta concentración de ionomicina (50  $\mu$ M) y los valores de F<sub>mín</sub> después de la adición de EGTA (15 mM). Todos los valores se normalizan con respecto a la intensidad de la línea basal inicial y se substraen los valores de la fluorescencia de la EGFP basal en cada una de las células analizadas. Se han probado otros indicadores quelantes de Ca<sup>2+</sup> con longitudes de onda de emisión diferente de la EGFP, como el Orange-G (Molecular Probes) o el Fura Red AM (Molecular Probes) pero han sido descartados por su alto grado de compartimentalización intracelular. La fluorescencia de emisión del Fluo-4 es

suficientemente intensa después de su unión a  $\text{Ca}^{2+}$  como para detectar ampliamente los cambios de concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  por encima de la fluorescencia de la EGFP endógena.

En los análisis de los efectos de la despolarización continuada con KCl en la dinámica de formación de neuritas, se captan las imágenes cada 20 segundos durante un periodo de 5 horas consecutivas después de la adición de KCl (40 mM).

### **3.- ANÁLISIS DE PROLIFERACIÓN CELULAR POR INCORPORACIÓN DE BrdU**

Para cuantificar las poblaciones de células proliferantes en los cultivos, se añade un pulso de 24 horas de 5-bromo-desoxiuridina (BrdU; 3  $\mu\text{g/ml}$ ; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Este análogo de la uridina se incorpora en el DNA de aquellas células que se han dividido y, por lo tanto, han sintetizado DNA durante el pulso. Este marcador mitótico se añade a los cultivos a los 2, 6, 10 y 14 DIV. Los cultivos se fijan 24 horas más tarde con paraformaldehído al 4%. Después de tres lavados con tampón fosfato salino (PBS), las células son tratadas durante 30 min con HCl (2M), seguido de 4 lavados con PBS. Los cultivos celulares son entonces procesados para la detección inmunocitoquímica del BrdU.

### **4.- DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES INTRACELULARES DE GABA.**

Los niveles intracelulares del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) son cuantificados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). A los 15 DIV, los cultivos de cada una de las condiciones del experimento, son recogidos en ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) frío a 0,25 M, y congelados a  $-20^\circ\text{C}$ . Para su análisis, las muestras son homogenizadas, centrifugadas 30 min a 16 000 x g a  $4^\circ\text{C}$  y los sobrenadantes se llevan a pH 8,0 con NaOH. Los contenidos de GABA se determinan con análisis fluorimétrico de los derivados con o-ftaldehído tal como se describe en Sunol et al., 1988, con pequeñas modificaciones. La separación del GABA endógeno se lleva a cabo en una columna  $\text{C}_{18}$  de fase reversa (Tracer Nucleosil  $\text{C}_{18}$ , con partículas de 5 mm, 10 x 0,4 cm; Teknokroma S.C.C.L., Sant Cugat del Vallès) usando como fase móvil acetato sódico

(0,1 M), trietilamina (5,5 mM; pH 3,15) y acetonitrilo al 28,6%, a una velocidad de flujo de 0,8 ml/min. El contenido de GABA se calcula por detección fluorométrica (excitación: 360 nm; emisión 450 nm) usando un estándar externo.

## **5.- ENSAYO DE RECAPTACIÓN Y LIBERACIÓN DE GABA.**

En el análisis de la recaptación de GABA, utilizamos ácido 4-amino-*n*-[2,3-<sup>3</sup>H]-butírico ([<sup>3</sup>H]GABA; Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, UK) tal y como se describe en (Weiss 1988). Las células son preincubadas a 37°C en tampón Krebs-Ringer-HEPES (KRH), cuya composición es: NaCl (125 mM), KCl (4,8 mM), MgSO<sub>4</sub> (1,2 mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,2 mM), CaCl<sub>2</sub> (2,2 mM), HEPES (25 mM), glucosa (5,6 mM). Seguidamente se incuban 30 min a 37°C en tampón KRH con [<sup>3</sup>H]GABA (20 nM; 93 Ci/mmol) y se lavan tres veces con KRH a 4°C. Las células son entonces lisadas con NaOH (0,1 M) y se procede a la medida del número de cuentas por minuto (cpm) en líquido de centelleo.

Para los experimentos de liberación de GABA las células son preincubadas durante 10 min a 37°C en tampón KRH suplementado con 100 μM de γ-vinil-GABA (GVG; Mervell Dow Research Institute, Strasbourg, Francia) y seguidamente son incubadas durante 30 minutos a 37°C con [<sup>3</sup>H] GABA (20 nM) en KRH con GVG tal como se describe en Belhage et al., 1993. Todas las incubaciones posteriores se realizan con 200 μl de tampón KRH con GVG durante 3 min a 37°C. Después de 3 lavados (a los que nos referiremos como niveles basales), las células son despolarizadas durante 3 min con ionomicina (0,1 μM; Sigma) para estimular la liberación del neurotransmisor tal y como se describe en Katsura et al., 2002. Dado que las células ya están siendo cultivadas en 40 mM de KCl, utilizamos la ionomicina para despolarizarlas en lugar del propio KCl. Tal y como ha sido descrito anteriormente (Katsura et al., 2002), la concentración de ionomicina utilizada en este estudio no afecta a la viabilidad celular. Se ha comprobado mediante el método de la exclusión del Azul de Tripán que la viabilidad al final de cada experimento para cada una de las condiciones experimentales es mayor del 90%. Para comprobar que la liberación es dependiente de calcio, algunos experimentos han sido realizados en un medio libre de calcio y además

suplementados con 1,5 mM de EGTA. Posteriormente las células se lavan tres veces y cada alícuota, incluyendo los lavados iniciales (niveles basales; tiempo 0 min), la despolarización (tiempo 3 min) y los lavados posteriores a la despolarización (tiempos 6, 9 y 12 min), son procesados para su recuento en líquido de centelleo.

## **6.- PROCEDIMIENTOS DE LESIÓN EXCITOTÓXICA.**

Las ratas son anestesiadas con pentobarbital sódico (50 mg/kg; i.p.) y posicionadas en un aparato estereotáxico David Kopf (DK 900, Tujunga, CA). Seguidamente se les practica una lesión unilateral en el núcleo estriado mediante dos microinyecciones de 68 nmoles de ácido quinolínico (QA; Sigma) en las coordenadas detalladas en la Tabla 1.

	STR izquierdo	STR izquierdo
AP	+ 2,3	+ 1,3
L	- 2,4	- 3,0
DV	- 5,0	- 5,0

**Tabla 1.** Coordenadas de inyección unilateral de ácido quinolínico en el núcleo estriado de la rata. *Valores en mm. AP, anterioposterior, desde Bregma; L, lateral, desde Bregma; DV, dorsoventral, desde la duramadre; STR, núcleo estriado. Barra de los incisivos a -5 mm.*

Después de la operación, los animales son estabulados en solitario en cajas estériles con acceso ilimitado a comida y agua, a la temperatura constante de 19-22°C y a la humedad constante de 40-50%, en un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. Todos los procedimientos que implican el manejo de animales se han realizado siguiendo las directrices del Instituto Nacional de la Salud para el cuidado y uso de animales de experimentación, y han sido aprobados por Comité de Ética de la Universidad de Barcelona y la *Generalitat de Catalunya*.

## 7.- PROCEDIMIENTOS DE TRANSPLANTE CELULAR.

Con el fin de minimizar el rechazo inmunológico, los trasplantes celulares se han realizado en ratas macho adultas inmunodeficientes (Sprague-Dawley OFA-Hairless; 125-150 gr. de peso). Las células se tripsinizan, centrifugan y resuspenden en B27:MEM (1:1) con 22 U/ml de DNAasa (Sigma) a la concentración de 3000 células/ $\mu$ l. Se comprueba mediante el ensayo de exclusión al Azul de Tripán que la viabilidad celular es superior al 98% justo antes del trasplante, tanto en las células cultivadas con RA como en las condiciones basales. En los experimentos destinados a detectar las células más allá de los 3 días *in vivo*, las células de ambas condiciones son cultivadas en presencia de BrdU durante las últimas 24 horas antes del trasplante (de los 10 a los 11 DIV).

Ratas que han sido lesionadas unilateralmente con QA una semana antes son anestesiadas y operadas siguiendo el mismo procedimiento. En los experimentos para el estudio de la supervivencia a corto plazo y del grado de diferenciación e integración, las ratas son microinyectadas bilateralmente con 9000 células por núcleo estriado en 6 localizaciones distintas (1500 células por localización, depositadas a la velocidad de 0,5  $\mu$ l/min). Las coordenadas de inyección son las detalladas en la Tabla 2.

	STR izquierdo					
AP	+ 2,8	+ 2,8	+ 1,8	+ 1,8	+ 0,8	+ 0,8
L	- 2,4	- 2,4	- 2,9	- 2,9	- 3,5	- 3,5
DV	- 5,3	- 4,3	- 5,3	- 4,3	- 5,3	- 4,3

	STR derecho					
AP	+ 2,8	+ 2,8	+ 1,8	+ 1,8	+ 0,8	+ 0,8
L	+ 2,4	+ 2,4	+ 2,9	+ 2,9	+ 3,5	+ 3,5
DV	- 5,3	- 4,3	- 5,3	- 4,3	- 5,3	- 4,3

**Tabla 2.** Coordenadas de inyección bilateral de células en los núcleos estriados de la rata. Valores en mm. AP, anterioposterior, desde Bregma; L, lateral, desde Bregma; DV, dorsoventral, desde la duramadre; STR, núcleo estriado. Barra de los incisivos a -5 mm.

Después de la operación se comprueba la viabilidad de las células no transplantadas mediante la exclusión por Azul de Tripán. Las ratas son estabuladas en las condiciones descritas anteriormente hasta su sacrificio.

## **8.- ENSAYO DE FUNCIONALIDAD MOTORA POR ROTACIONES INDUCIDAS.**

Las ratas son sometidas a este ensayo el día antes del trasplante y al cabo de una y cinco semanas del trasplante. Las ratas son colocadas en cajas circulares y se les acopla un cable unido a un rotómetro automático que cuantificará las rotaciones ipsi y contralaterales que realicen (Marin et al., 2003). Se las deja habituar al entorno durante 15 min y seguidamente se les inyecta apomorfina (0,5 mg/kg de peso) por vía subcutánea. Se registran automáticamente el número de rotaciones completas (360°) durante los siguientes 15 min y se expresan como el número de rotaciones neto, restando las rotaciones contralaterales de las ipsilaterales.

## **9.- PROCEDIMIENTOS DE DETECCIÓN INMUNOQUÍMICA.**

Los anticuerpos usados en los ensayos de detección inmunoquímica se detallan en la Tabla 3.

Para la detección de antígenos específicos en las células en cultivo se procede de la siguiente forma. Los cultivos son fijados en los días estudiados (a los 4, 7, 11 y 15 DIV) con paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (PB; 0,1 M; pH 7,4) durante 45 min. Después de una incubación de 30 min en PBS + Tritón X-100 (0,3%) + suero normal de caballo (NHS; 30%), los cubreobjetos son incubados toda la noche a 4°C con los anticuerpos adecuados disueltos en PBS + Tritón X-100 (0,3%) + NHS (5%). Seguidamente se someten a tres lavados con PBS y se incuban con el anticuerpo secundario apropiado durante 2 horas a temperatura ambiente. Para la inmunodetección por fluorescencia se ha usado el anticuerpo contra-conejo conjugado a Fluoresceína (1:100; Vector laboratories, Burlingame, CA), o bien el anticuerpo contra-ratón

conjugado con Texas-Red (1:200; Jackson Immunoresearch Laboratories Inc., West Grove, PE ). Alternativamente se han usado anticuerpos secundarios biotinilados contra los mismos antígenos, en cuyo caso se han visualizado mediante el método de la avidina-biotina (ABC; Pierce, Rockford, IL), y finalmente revelado con 3,3'-diaminobenzidina (DAB). Los procedimientos inmunocitoquímicos se han realizado usando los mismos tiempos de revelado para todas las condiciones de cultivo para así realizar las comparaciones de forma adecuada.

<b>ORIGEN</b>	<b>ANTIGENO</b>	<b>DILUCIÓN</b>	<b>CASA COMERCIAL</b>
<i>ratón</i>	<b>BrdU</b>	1:50	Dako A/S, Glostrup, Germany
<i>ratón</i>	<b>NeuN</b>	1:100	Chemicon, Temecula, CA
<i>ratón</i>	<b>Nestin</b>	1:38	Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa
<i>ratón</i>	<b>GABA</b>	1:100	Sigma Chemical Co., St Louis, MO
<i>ratón</i>	<b>Tuj1</b>	1:400	Sigma Chemical Co., St Louis, MO
<i>ratón</i>	<b>RIP</b>	1:50	Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa
<i>ratón</i>	<b>O4</b>	1:25	Chemicon, Temecula, CA
<i>ratón</i>	<b>GFAP</b>	1:400	Sigma Chemical Co., St Louis, MO
<i>ratón</i>	<b>GAD 65</b>	1:100	Sigma Chemical Co., St Louis, MO
<i>ratón</i>	<b>v-GAT</b>	1:100	Synaptic Systems GmbH, Goettingen, Germany
<i>ratón</i>	<b>CD11b-OX-42</b>	1:50	Serotec Ltd, Kidlington, Oxford, UK
<i>ratón</i>	<b>Synapsin I</b>	1:300	Chemicon, Temecula, CA
<i>ratón</i>	<b>Synaptotagmin</b>	1:300	Synaptic Systems GmbH, Goettingen, Germany
<i>conejo</i>	<b>EGFP</b>	1:200	Abcam Ltd, Cambridge, UK

**Tabla 3.** *Lista de anticuerpos usados, con su origen, su nombre comercial o antígeno que reconoce, la dilución a la que se ha usado y su casa comercial.*

Para la detección de antígenos específicos en el tejido cerebral se procede de la siguiente manera. A los 3, 6 ó 12 días después del trasplante las ratas son perfundidas transcárdialmente con paraformaldehído al 4% en PB (0,1 M, pH 7,4). Se extraen los cerebros, se postfijan durante 2 horas a 4°C en la misma solución y se criopreservan en PBS con sacarosa al 30%. Se congelan con isopentano enfriado en CO<sub>2</sub> sólido, se cortan

secciones de 30  $\mu\text{m}$  de espesor en el criostato y se recogen en flotación en PBS. Para el bloqueo de la autofluorescencia se incuban las secciones con 50 mM de cloruro amónico. El tejido se permeabiliza y se bloquea con PBS + Tritón X-100 (0,3%) + NHS (1,5%) + BSA (1%) a temperatura ambiente durante 1 hora. Cuando se usa el anticuerpo RIP, sin embargo, la incubación se realiza con Tritón X-100 al 2%. La incubación con los anticuerpos primarios se lleva a cabo a 4°C durante toda la noche en la misma solución. Después de los lavados se incuban las secciones con los anticuerpos secundarios fluorescentes adecuados durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente las secciones se montan con Mowiol (Calbiochem).

Algunos cultivos o secciones de tejido son contrateñidos con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Sigma Chemical Co.) para visualizar y contar el número total de células. No se ha observado señal alguna en ensayos control en los que no se ha añadido el anticuerpo primario.

## **10.- ENSAYO DE TUNEL PARA LA DETECCIÓN DE MUERTE CELULAR.**

Para la detección de células en proceso de muerte celular, principalmente a través de apoptosis, se ha utilizado el Sistema de Detección de Apoptosis *In Situ* de Promega tal como se describe en Perez-Navarro et al., 2000a. La técnica del TUNEL (*TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling*) permite la detección del DNA fragmentado mediante el marcaje con dUTP marcado con un fluorocromo que se une covalentemente a los extremos libres de DNA. Los cultivos son fijados con paraformaldehído al 4% en PB 0,1 M, pH 7,4, durante 45 min a los 4 y 15 DIV y posteriormente procesados según las instrucciones del fabricante. Las secciones de tejido cerebral son obtenidas como se describe en el apartado anterior. Los cultivos celulares o las secciones de tejido cerebral son procesados posteriormente para la inmunodetección de la EGFP, tal como se detalla en el apartado anterior.

## **11.- DETECCIÓN DEL GEN DE LA EGFP MEDIANTE PCR.**

Las ratas fueron anestesiadas en una cámara de CO<sub>2</sub> al cabo de 6 días, 45 días o 7 meses del trasplante. Se les extrae el cerebro y se diseccionan cuidadosamente los núcleos estriados, tanto los trasplantados con células cultivadas en condiciones basales o tratadas con RA y KCl, como los núcleos estriados lesionados con QA, o núcleos estriados intactos. Se extrae el DNA mediante un método de desproteinización, tal y como se describe en Akerud et al., 2001 y se resuspende en agua libre de nucleasas. Se extrae también el DNA de una placa confluyente de células ST14A cultivadas a 33°C, que se utilizará como control positivo. Otro control positivo para la reacción en cadena de polimerasa (PCR) será el plásmido que contiene la secuencia de la EGFP. Se añade 1 µg de DNA a los 25 µl de volumen de la mezcla de reacción para la PCR, que contiene:

- |                                               |            |
|-----------------------------------------------|------------|
| ▪ Tampón de PCR (Ecogene SRL, Madrid)         | 1X         |
| ▪ MgCl <sub>2</sub> (Ecogene)                 | 2 mM       |
| ▪ dNTPs (Ecogene)                             | 0,12 mM    |
| ▪ <i>Primer</i> (5'-ATGGTGAGCAAGGGCGAG-3')    | 50 nM      |
| ▪ <i>Primer</i> (5'-CTTGTACAGCTCGTCCATGCC-3') | 50 nM      |
| ▪ EcoTaq Plus DNA Polymerase (Ecogene)        | 2 unidades |

La reacción de PCR se realiza con los siguientes parámetros:

- 1.- 94°C (3 minutos)
- 2.- 40 ciclos de:
  - 2.1.- 94°C durante 60 segundos
  - 2.2.- 58°C durante 60 segundos
  - 2.3.- 72°C durante 60 segundos
- 3.- 72°C durante 15 minutos.

Los cebadores amplifican específicamente una banda de 700 pares de bases que se resuelve en un gel de agarosa al 2% y que corresponde al gen de la EGFP (GeneBank: U57609).

## **12.- RECUENTOS CELULARES.**

---

Los números totales de células en los cultivos *in vitro* se determinan por el recuento de los núcleos teñidos con DAPI. Para la determinación del porcentaje de células proliferantes se cuentan los núcleos BrdU-positivos respecto del total de núcleos DAPI-positivos en cada campo. Utilizando el programa informático CAST (*Computer Assisted Stereology Toolbox*, Olympus Danmark A/S, Ballerup, Dinamarca) se cuantifica el 5% de la superficie total del cubreobjetos seleccionando diversos campos tomados de forma aleatoria. Los núcleos con uno o varios puntos positivos para TUNEL son cuantificados de la misma forma respecto el número total de células en el campo. Estos recuentos se realizan mediante el microscopio de fluorescencia. La cuantificación del número de células positivas para Nestina o para GABA se realiza en el microscopio bajo luz visible. Las células positivas para el inmunomarcaje se cuentan en campo claro y se relativizan al número total de células en el mismo campo contadas con contraste de fases.

Para la cuantificación del número de células EGFP-positivas tras el trasplante *in vivo*, se procesan las secciones de 30  $\mu\text{m}$  de espesor para inmunohistoquímica contra la EGFP y se cuentan el número de células EGFP-positivas observadas en toda la sección cada 210  $\mu\text{m}$ , es decir, una de cada 7 secciones. Los valores obtenidos se multiplican, por lo tanto, por 7 y se corrige el valor final mediante el método de Abercrombie (Abercrombie 1946).

Los análisis estadísticos se han llevado a cabo mediante el test *t* de Student para muestras independientes.

## **IV. RESULTADOS**



**RESULTADOS****1.- Optimización de la supervivencia en cultivo de la línea de progenitores neuronales ST14A en condiciones favorables para la diferenciación.**

La línea celular ST14A ha sido generada a partir de NSC o progenitores neuronales procedentes de la eminencia ganglionar lateral de embriones de rata de 14 días. Ha sido inmortalizada condicionalmente con el alelo sensible a la temperatura del Antígeno T Grande (LTA) del virus SV40, de forma que a la temperatura permisiva de 33°C en un medio con suero, el oncogen mantiene las células proliferando indefinidamente en un estado indiferenciado, mientras que a la temperatura no-permisiva de 39°C, o eliminando el suero del medio, el oncogen se inactiva, provoca una clara disminución de la tasa de proliferación y permite el inicio de un proceso de diferenciación (Cattaneo y Conti 1998).

Sin embargo, en las condiciones más favorables para su diferenciación, es decir, a la temperatura de 39°C y en un medio carente de suero, la supervivencia de las células es extremadamente baja: no sobreviven más allá de los 2-3 DIV. Ya que nuestro objetivo era desarrollar un protocolo de diferenciación hacia un tipo de neurona específica, de fenotipo GABAérgico, que posteriormente íbamos a transplantar en el cerebro, en primer lugar nos planteamos desarrollar unas condiciones de cultivo óptimas para diferenciar las células con la máxima supervivencia a la temperatura de 39°C. De este modo nos asegurábamos las mejores condiciones para afrontar el posterior trasplante de estas células pre-diferenciadas en el interior del cerebro de la rata.

Iniciamos, por tanto, una búsqueda de posibles factores que incrementasen la supervivencia celular en un medio carente de suero. En el medio mínimo de diferenciación neuronal N2 las células sobreviven poco más de una semana a la temperatura de 33°C, y tan sólo 2-3 días a 39°C. En cambio, si cultivábamos las células en un medio más enriquecido en aminoácidos, antioxidantes y hormonas como es el medio B27, las células sobrevivían más allá de los 11 DIV a 33°C y hasta los 4-5 DIV a 39°C. Sin embargo, nuestro objetivo era estudiar los factores y mecanismos implicados en la supervivencia y la diferenciación celular. Por este motivo en algunos

experimentos sembramos las células en medio B27 para estimular su supervivencia y, al cabo de 2 DIV, cambiábamos al medio de composición mínima N2 donde añadiríamos los factores que queríamos estudiar.

	Condiciones de cultivo	Supervivencia (33°C)
1	N2	+
2	<b>B27</b>	<b>++</b>
3	B27 + bFGF (20-40 ng/ml)	++
4	B27 + EGF (10-20 ng/ml)	++
5	B27 + z-VAD-FMK (50-100 µM)	++
6	B27 ⇒ N2	++
7	B27 ⇒ N2 + Forskolin (50 µM)	-
8	B27 ⇒ N2 + IBMX (0,25 mM)	+
9	B27 ⇒ N2 + TPA (200 nM)	+
10	B27 ⇒ N2 + dopamina (20 µM)	-
11	B27 ⇒ N2 + aFGF+IBMX+TPA+Forsk+DA	-
12	B27 ⇒ N2 + <b>BDNF</b> (10-50 ng/ml)	<b>+++</b>
13	B27 ⇒ N2 + <b>RA</b> (0,5-10 µM)	<b>++++</b>
14	B27 ⇒ N2 + <b>KCl</b> (40 mM).	<b>+++</b>
15	B27 ⇒ N2 + α-tocoferol (10 µM)	++
16	B27 ⇒ N2 + z-VAD-FMK (50-100 µM)	++
17	B27 ⇒ N2 + RA ⇒ N2 + BDNF (50 ng/ml)	++
18	N2 + FCS (0,1-10%)	Proliferación hasta confluencia

**Tabla 4.** Resumen de los medios de cultivo y de los factores ensayados para la optimización de la supervivencia de las células ST14A a la temperatura permisiva de 33°C. (+) indica una supervivencia del 10-20% a los 7 DIV; (++) del 20-30%; (+++) del 30-40%; (++++) 40-50%; (-) indica una supervivencia del 0-10% a los 7 DIV; (B27 ⇒ N2) indica el cultivo en medio B27 durante 2 DIV y el cambio a medio N2.

Uno de los factores analizados fue la adición de moléculas mitogénicas, como el Factor de Crecimiento Fibroblástico básico (bFGF) o ácido (aFGF), o el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF). Se ha comprobado como estos agentes estimulan la proliferación y la supervivencia de las células madre neuronales en cultivo (Gage et al., 1995; Kalyani et al., 1997; Reynolds y Weiss 1992; Weiss et al., 1996). Sin embargo, aunque a 33°C y en presencia de suero sí se observa un incremento del número de células, en ausencia de suero no observábamos ningún efecto aparente con la presencia de estos factores, ni a 33°C (Tabla 4), ni a 39°C (Tabla 5).

Líneas celulares de varios orígenes han sido diferenciadas con la adición de factores que incrementan la producción de AMPc, como la forskolina o el butirato

(Greene y Tischler 1976; Raymon et al., 1999; Wang et al., 2004). Para inducir el proceso de diferenciación en nuestros cultivos ensayamos la adición de algunas moléculas capaces de estimular vías intracelulares como la MAPK, la Adenilato Ciclasa o la PKC, tal como se describe en Ehrlich et al., 2001, y que han sido utilizadas para la diferenciación hacia fenotipo dopaminérgico (Du et al., 1994). Estas moléculas son: la forskolina, el aFGF, el 12-miristato 13-acetato de forbol (TPA), la isobutilmetilxantina (IBMX) y la dopamina (DA). El tratamiento con la mezcla de estos agentes parece inducir una clara diferenciación, generando morfologías celulares estilizadas y con procesos neuríticos. Sin embargo, la supervivencia de estas células es mucho más pobre, apenas superando los 1-2 DIV. La adición de estos agentes por separado también reducía la supervivencia celular, sobretudo la forskolina y la dopamina (ver Tablas 4 y 5). Esto hacía inviable cualquier posterior manipulación de estas células.

	Condiciones de cultivo	Supervivencia (39°C)
1	N2	+
2	<b>B27</b> (2 DIV) ⇒ N2	<b>++</b>
3	N2 + z-VAD-FMK (50-100 µM)	+
4	N2 + α-tocoferol (10 µM)	+
5	N2 + bFGF (20-40 ng/ml)	+
6	N2 + aFGF (20-40 ng/ml)	+
7	N2 + EGF (10-20 ng/ml)	+
8	N2 + aFGF+IBMX+TPA+Forskolin+DA	- (diferenciación)
9	N2 + <b>RA</b> (0,5-10 µM)	<b>++</b>
10	N2 + BDNF (10-50 ng/ml)	+
11	N2 + NT-3 (10-50 ng/ml)	+
12	N2 + GDNF (10-50 ng/ml)	+
13	N2 + NTRN (10-50 ng/ml)	+
14	N2 + FCS 0,1%	+
15	N2 + <b>FCS 0.5%</b>	<b>++++</b>
16	N2 + FCS 1-10%	Proliferación hasta confluencia
17	N2 + Medio Condicionado Astrocitos	+
18	N2 + FCS 0,5% + Medio Cond. Astrocitos	<b>++++</b>
19	N2 + Cocultivo con Astrocitos	+
20	N2 + FCS 0,5% + Cocultivo Astrocitos	<b>++++</b>

**Tabla 5.** Resumen de las condiciones de cultivo, medios y factores ensayados para la optimización de la supervivencia de las células ST14A a la temperatura no permisiva de 39°C. (+) indica una supervivencia del 10% a los 3 DIV; (++) indica una supervivencia del 10% a los 4-5 DIV; (++++) indica una supervivencia del 10% a los 15 DIV; (-) indica una supervivencia del 10% a los 1-2 DIV;

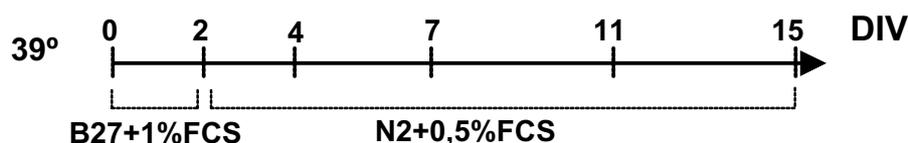
Con el fin de mejorar la supervivencia celular probamos también el tratamiento con inhibidores de caspasas de amplio espectro, como el z-VAD-FMK. No obtuvimos, sin embargo, ningún efecto beneficioso en nuestras células en cultivo sin suero, ni a la temperatura de 33°C (Tabla 4) ni a la de 39°C (Tabla 5). Esto nos indica que la muerte de nuestras células era independiente de caspasas y no podíamos revertirla con factores antiapoptóticos. Otro producto analizado para la mejora de la supervivencia es el  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) que actúa como antioxidante. Pero tampoco en este caso lográbamos detener la muerte celular (Tablas 4 y 5).

Otra estrategia ensayada para la reducción de la muerte celular fue el tratamiento con factores tróficos, cuyo efecto sobre la supervivencia y diferenciación de las células de origen estriatal ha sido ampliamente descrito (Alberch et al., 2004). La adición de BDNF mejoraba ligeramente la supervivencia de los cultivos a 33°C (Tabla 4), pero por el contrario no lo hacía a 39°C (Tabla 5). A esta temperatura tampoco ejercían ningún efecto otros factores tróficos tales como el NT-3, el GDNF o la NTRN (Tabla 5).

Analizamos seguidamente el efecto de la adición de diferentes concentraciones de suero en nuestros cultivos. A la temperatura de 33°C, la adición de FCS desde el 0,1% hasta el 10% estimulaba la proliferación hasta la confluencia, sin permitir ningún grado de diferenciación (Tabla 4). En cambio, a 39°C, concentraciones del 0,1% de suero no mejoraban de forma significativa la supervivencia, mientras que concentraciones del 1, 5 ó 10% de suero seguían estimulando la proliferación hasta la confluencia. La velocidad a la que se llegaba a la confluencia era proporcional a la concentración de suero. Lógicamente, con la estimulación de la proliferación se reducía el potencial de diferenciación de las células. Sin embargo, la adición de FCS al 0,5% conseguía un equilibrio entre muerte y proliferación celular que permitía el cultivo de las células más allá de los 15 DIV sin una proliferación excesiva (Tabla 5). Establecimos, pues, que las condiciones de cultivo idóneas para conseguir un buen grado de diferenciación asegurando la supervivencia de las células más allá de los 15 DIV, a la temperatura de 39°C, era en medio N2 con FCS al 0,5%.

Con el fin de estudiar el efecto que los astrocitos podían ejercer sobre la supervivencia o diferenciación de las células ST14A, llevamos a cabo un cultivo de astrocitos estriatales aislados a partir de crías de rata neonatales (Día postnatal 1). Para

examinar el efecto de posibles factores solubles secretados por los astrocitos recogimos medio condicionado de estos cultivos astrocitarios al cabo de 4 DIV y con este medio cultivamos las células ST14A. No se observó ningún aumento apreciable de la supervivencia ni detectamos por inmunocitoquímica el incremento de marcadores específicos neuronales o GABAérgicos (Tabla 5). En otros experimentos llevamos a cabo cocultivos de las células ST14A con estos astrocitos sembrados en el mismo instante, o sembrados 4 días antes que las células ST14A, para comprobar el posible efecto de los contactos célula-célula. Tampoco en este caso advertimos mejoras en la supervivencia o en el grado de diferenciación. Cuando se realizaron los cultivos añadiendo un 0,5% de FCS al medio condicionado o a los cocultivos, se observaron los mismos efectos de aumento significativo de la supervivencia atribuibles al FCS, pero no se detectó ningún cambio en el fenotipo de las células ST14A (Tabla 5).

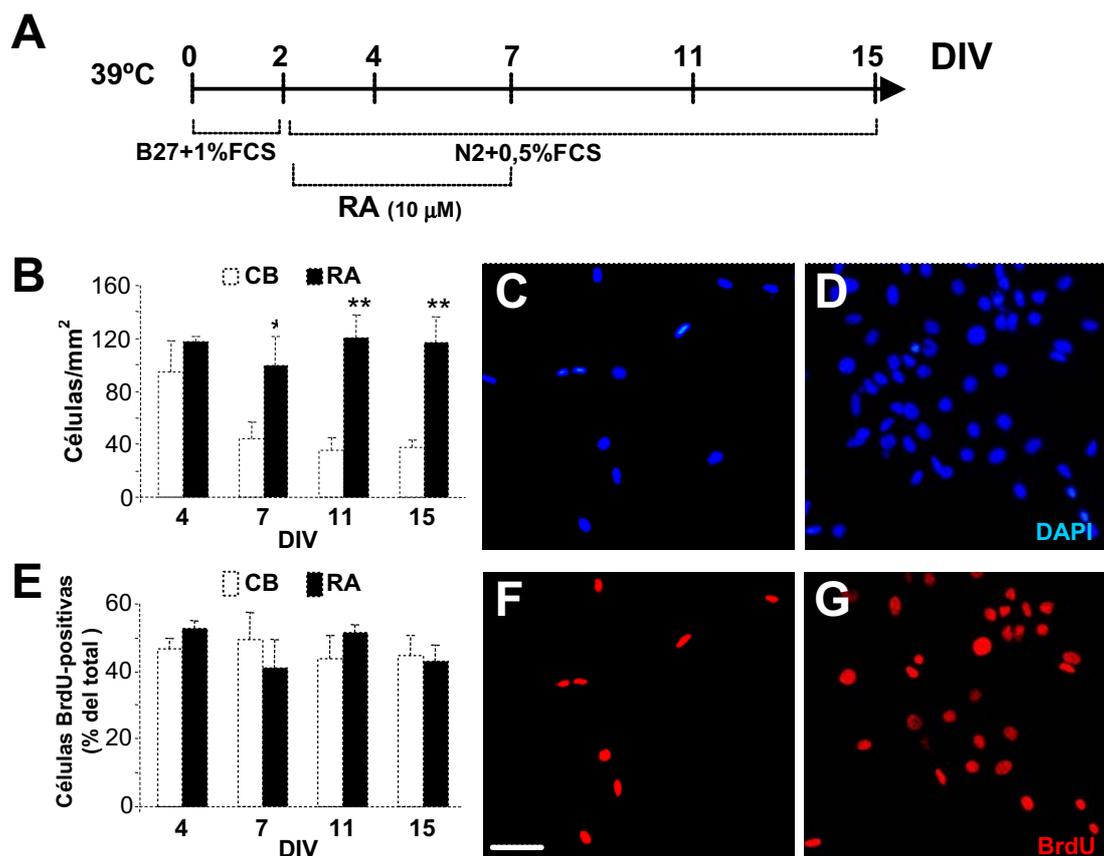


**Figura 8.** Esquema de las condiciones basales de cultivo de las células ST14A para el estudio de su diferenciación con un nivel óptimo de supervivencia a 39°C.

Con todos los datos obtenidos hasta el momento diseñamos unas condiciones de cultivo en las que realizaríamos los siguientes experimentos de diferenciación a 39°C. El protocolo consistía en sembrar las células en medio B27 suplementado con un 1% de FCS durante 2 DIV para reducir la muerte celular y asegurar cierta supervivencia inicial, y cambiar posteriormente el medio mínimo N2 suplementado con un 0,5% de FCS (Fig 8) en donde ensayaríamos los posibles factores de diferenciación.

## **2.- El ácido retinoico aumenta la supervivencia y la diferenciación neuronal de las células ST14A en cultivo.**

El RA ha sido descrito como factor favorable a la supervivencia en cultivos celulares (Henion y Weston 1994; Kornyei et al., 1998). Añadiendo RA al medio

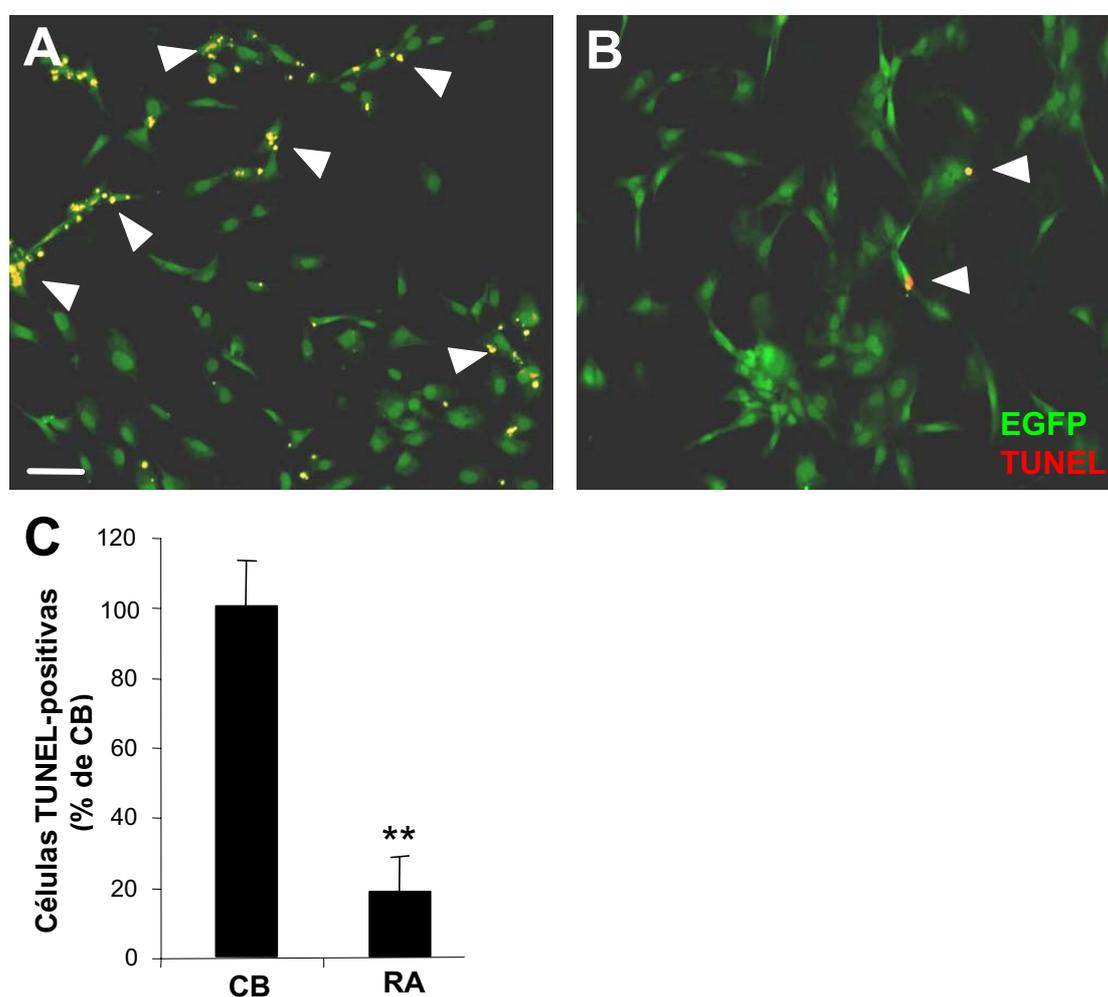


**Figura 9.** El RA aumenta la supervivencia de las células ST14A. (A) Se añadió 10  $\mu\text{M}$  de RA desde los 2 DIV hasta los 7 DIV. (B) El RA incrementa el número de células a los 7, 11 y 15 DIV con respecto a las condiciones basales (CB). (C y D) Microfotografías fluorescentes de tinción nuclear con DAPI de cultivos en condiciones basales (C) o tratados con RA (D) a los 15 DIV. (E) Los niveles de proliferación se mantienen constantes en todos los tiempos examinados y en las dos condiciones. (F y G) Microfotografías de los mismos campos de los cultivos en condiciones basales (F) y con la adición de RA (G) mostrando las células que han incorporado BrdU. Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM) de 4 pozos de 4 experimentos independientes. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,005$  respecto CB. La barra representa 40  $\mu\text{m}$ .

mínimo N2 conseguimos efectivamente mejorar la supervivencia, tanto a los 33°C como a los 39°C (ver Tablas 4 y 5).

En los cultivos en medio N2 + 0,5% FCS (Fig 8) estudiamos con detalle el efecto que la exposición al RA tendría sobre nuestras células. Observamos como la adición del RA a la concentración de 10  $\mu\text{M}$  desde los 2 a los 7 DIV (Fig 9A) aumentaba significativamente la supervivencia celular. El número de células

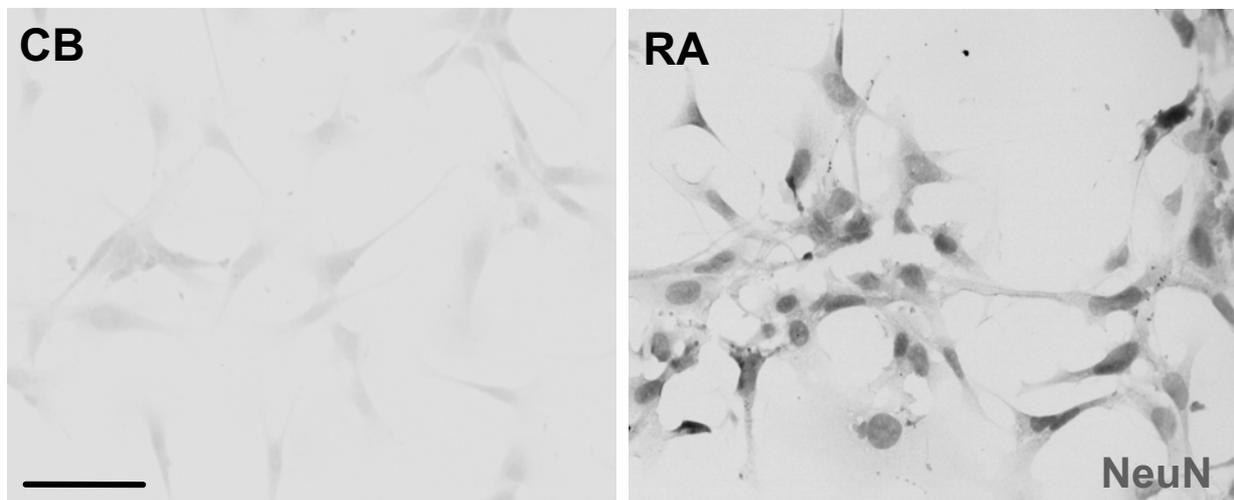
incrementaba en un  $125 \pm 35$  % a los 7 DIV, en un  $244 \pm 37$  % a los 11 DIV y en un  $206 \pm 41$  % a los 15 DIV con respecto a los cultivos sin RA -a los que nos referiremos como condiciones basales (CB)- (Fig 9B-D). Para comprobar si este aumento del número de células se debía a un incremento de la tasa de proliferación, añadimos bromodesoxiuridina (BrdU) al medio de cultivo 24 horas antes de cada fijación. El número de células que incorporaban este marcador mitótico no variaba con el tratamiento en ningún tiempo analizado (Fig 9E-G). El aumento del número de células debía explicarse, por lo tanto, por una reducción de la muerte celular. Para comprobarlo,



**Figura 10.** El RA reduce la muerte celular. (A y B) Microfotografías fluorescentes de marcaje por EGFP y TUNEL de cultivos en condiciones basales (A) o tratados con RA (B) a los 4 DIV. (C) El ensayo de TUNEL revela que a los 4 DIV, la adición de RA ha reducido el número de células apoptóticas respecto las condiciones basales (CB). Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM de 4 pozos de 4 experimentos independientes. \*\*  $P < 0,005$  respecto CB. La barra representa  $30 \mu\text{m}$ .

analizamos el número de células apoptóticas dos días después de la adición de RA mediante el ensayo de TUNEL. Efectivamente, el tratamiento con RA reducía en un  $81,4 \pm 10,3$  % el número de células TUNEL-positivas (Fig 10A-C).

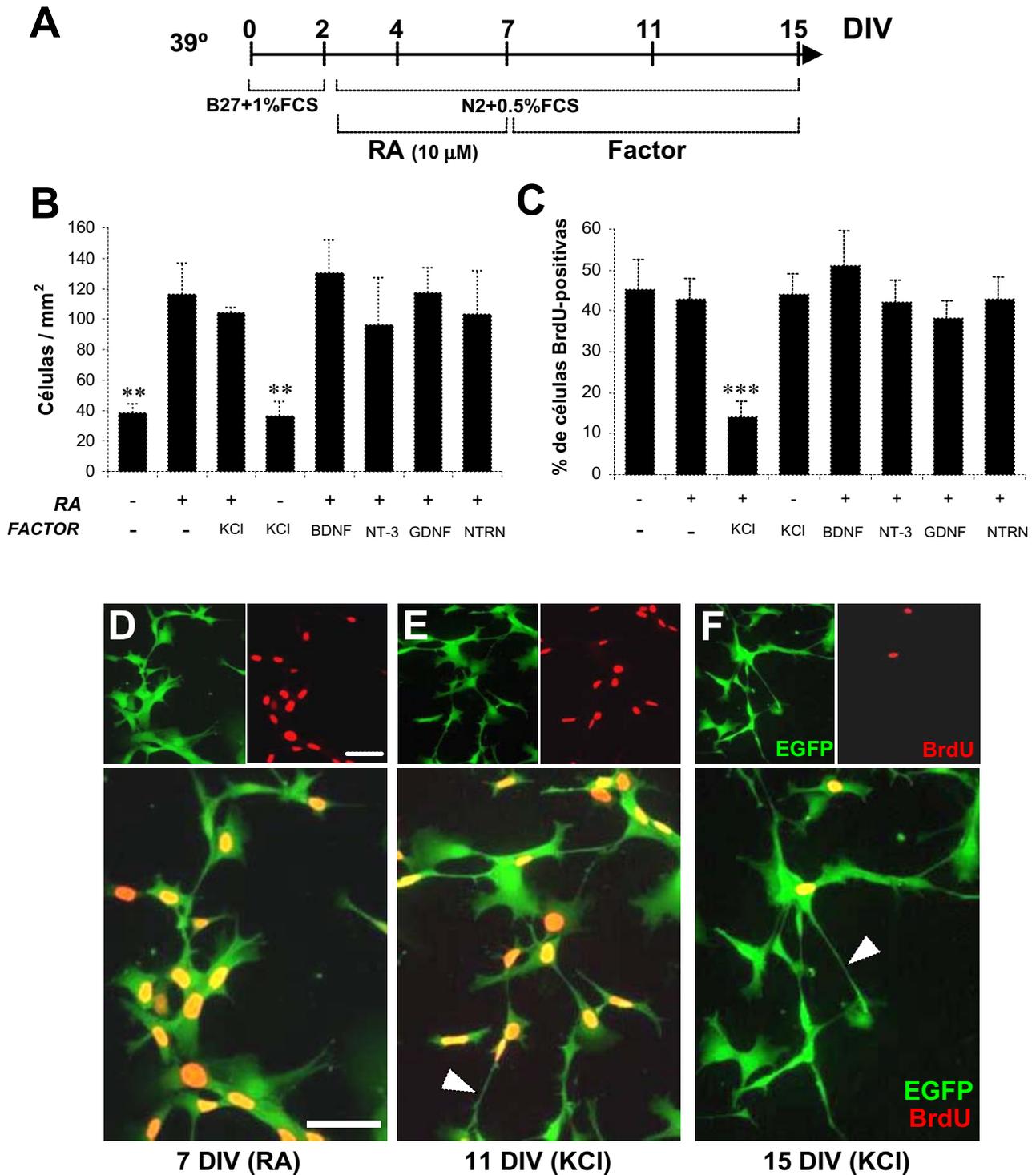
A continuación caracterizamos el efecto del RA sobre el grado de diferenciación. Para ello analizamos por inmunocitoquímica el fenotipo adquirido por las células después del tratamiento con RA. Observamos un claro aumento de la expresión de NeuN, un marcador de neurona madura (Fig 11). Este incremento se



**Figura 11.** El tratamiento con RA promueve la diferenciación neuronal. *Los cultivos tratados con RA incrementan sensiblemente la expresión del marcador de neuronas maduras NeuN con respecto a las condiciones basales (CB) a los 15 DIV. La barra representa 40  $\mu$ m.*

observaba en casi la totalidad de las células en cultivo a los 7 DIV y se mantenía estable a los 11 DIV y hasta los 15 DIV. Sin embargo, muy pocas de estas células eran positivas para el marcaje contra GABA y la intensidad del marcaje era extremadamente débil en casi todas ellas.

No observamos en ningún momento la aparición de marcaje para GFAP, marcador de astrocitos, para O4, marcador de oligodendrocitos, o para OX-42, marcador de microglía.

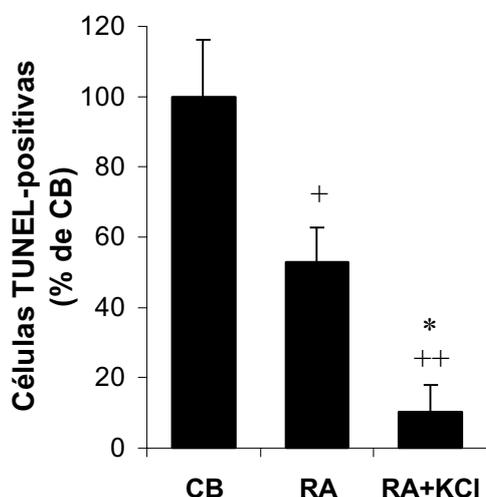


**Figura 12.** El tratamiento con KCl reduce la proliferación celular y estimula el crecimiento neurítico. (A) Varios factores fueron añadidos al medio de cultivo después de la exposición al RA. (B) Ninguno de los factores añadidos modifica el número total de células a los 15 DIV. (C) La adición de KCl (40 mM) disminuye significativamente el número de células BrdU-positivas a los 15 DIV. (D-F) Microfotografías del marcaje fluorescente para EGFP y BrdU donde se observa la reducción de la proliferación a los 15 DIV (F) y la aparición de los procesos neuríticos a los 11 y 15 DIV (flechas, E-F). Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM de 3-4 pozos de 3-4 cultivos independientes. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,005$ , \*\*\*  $P < 0,001$  respecto al tratamiento con RA. Las barras representan 40  $\mu$ m.

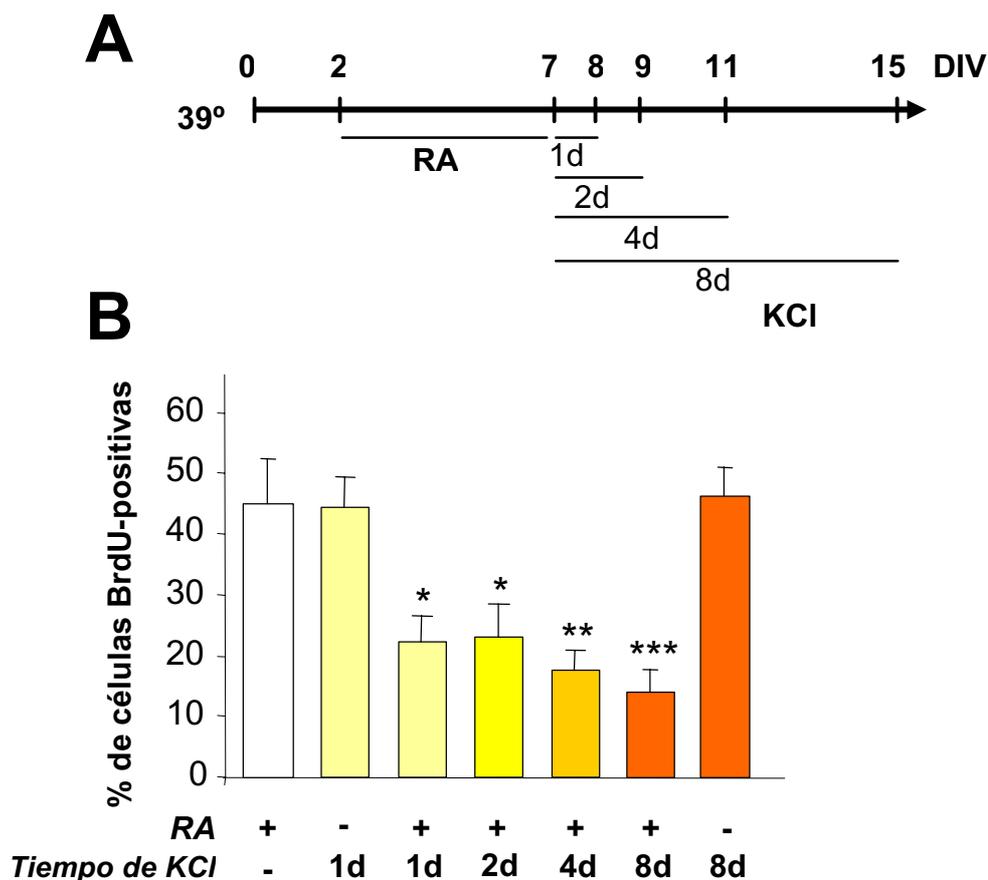
### 3.- El tratamiento con KCl reduce la proliferación celular y estimula el crecimiento neurítico.

Con el fin de inducir la adquisición del fenotipo neuronal GABAérgico, mantuvimos el tratamiento de 5 días con RA y probamos el tratamiento secuencial de otra serie de factores en el medio de cultivo (Fig 12A). En trabajos previos se podían encontrar datos acerca de la implicación de las neurotrofinas o de miembros de la familia del GDNF en la supervivencia o diferenciación de las neuronas GABAérgicas (Mizuno et al., 1994; Ventimiglia et al., 1995; Yamada et al., 2002). Por este motivo añadimos, desde los 7 DIV hasta los 15 DIV, concentraciones de 10-50 ng/ml de BDNF, NT-3, GDNF o NTRN. En ningún caso observamos una modificación en el número total de células en cultivo (Fig 12B) o en el número de células que habían incorporado BrdU (Fig 12C).

Se había descrito como la adición de KCl al medio de cultivo de tipos neuronales concretos, como los cultivos de neuronas granulares de cerebelo, era necesaria para su supervivencia (Gallo et al., 1987). En medio mínimo N2, la adición de KCl al cultivo nos incrementaba ligeramente el número de células vivas a 33°C (ver Tabla 4), aunque este efecto no se apreciaba a los 39°C (ver Tabla 5). Dado que la actividad sináptica también había sido implicada en fenómenos de diferenciación celular (Ciccolini et al., 2003; Spitzer et al., 2000), probamos la simulación de la actividad sináptica en nuestros cultivos mediante la adición de concentraciones despolarizantes de KCl. En este caso sí observamos cambios muy evidentes. La adición de 40 mM de KCl



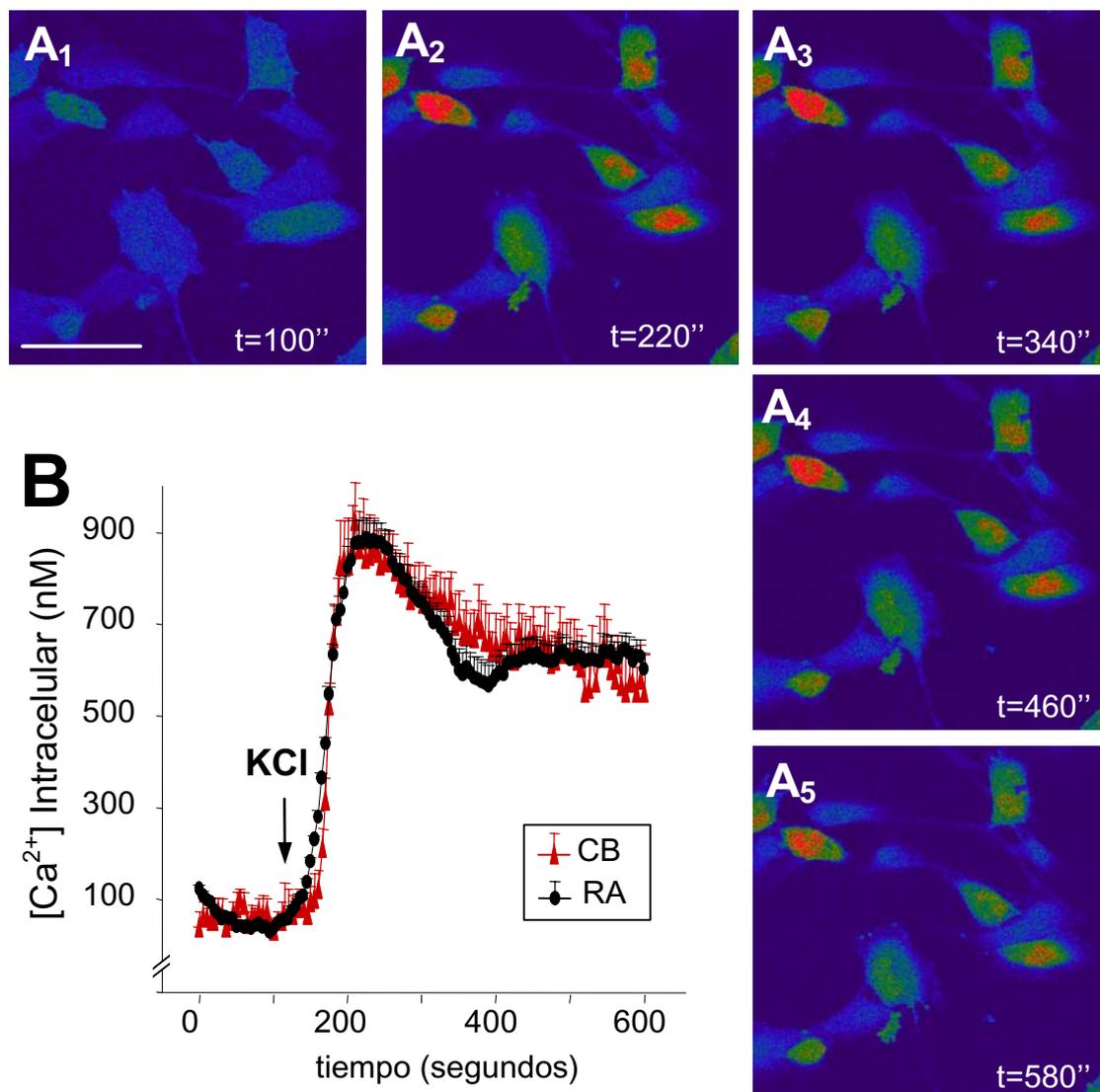
**Figura 13.** El KCl reduce la muerte celular. A los 15 DIV el recuento de células TUNEL-positivas indica que tanto el RA como el KCl estimulan la supervivencia celular mediante la reducción de la muerte por apoptosis. Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM de 3 pozos de 3 cultivos independientes. +  $P < 0,05$ , ++  $P < 0,005$  respecto a las condiciones basales (CB); \*  $P < 0,05$  respecto al tratamiento con RA.



**Figura 14.** (A) KCl (40 mM) fue añadido al medio durante un (1d), dos (2d), cuatro (4d) u ocho días (8d). (B) Un solo día de exposición al KCl ya es suficiente para reducir el número de células BrdU-positivas a los 15 DIV, pero sólo en las células anteriormente expuestas al RA. Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM de 3 pozos de 3 experimentos independientes. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,005$ , \*\*\*  $P < 0,001$  respecto al tratamiento con RA.

al medio de cultivo redujo el número de células BrdU-positivas un  $67 \pm 9,8$  % a los 15 DIV, pero sólo en aquellos cultivos que habían sido anteriormente expuestos al RA (Fig 12C). El número de células totales en cultivo no quedó modificado (Fig 12B). Esto indicaba, pues, que el KCl actuaba también como factor de supervivencia. Comprobamos mediante el ensayo de TUNEL que el número de células apoptóticas se había reducido en un 79 % con respecto a la sola adición de RA (Fig 13).

Otro fenómeno observado tras el tratamiento con KCl fue un notable crecimiento neurítico. Las células tratadas con RA seguido de KCl presentaban más procesos neuríticos y más largos, ya desde los 11 DIV y hasta los 15 DIV (Fig 12E-F).



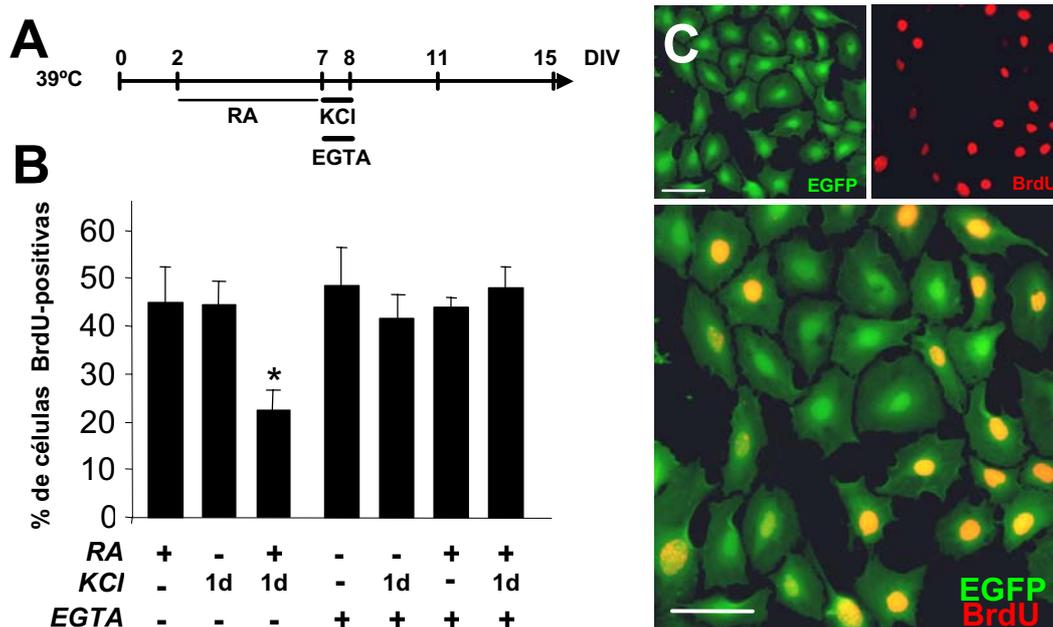
**Figura 15.** (A<sub>1</sub>-A<sub>5</sub>) La adición de KCl (40 mM) a los 110 segundos provoca una subida del calcio intracelular, tal como se visualiza con el indicador fluorescente Fluo-4, en microfotografías tomadas cada 120 segundos. (B) La cuantificación de la intensidad de fluorescencia, representada como la media  $\pm$  SEM de al menos 25 células de tres cultivos independientes, revela un incremento de 9 veces la [Ca<sup>2+</sup>] intracelular con la adición del KCl. La barra representa 20  $\mu$ m.

Para determinar el tiempo mínimo de exposición al KCl que era necesario para provocar esta reducción de la proliferación, añadimos el KCl durante 1, 2, 4 u 8 días, y analizamos el número de células proliferantes a los 15 DIV (Fig 14A). Comprobamos que un solo día de exposición a KCl (40 mM) ya era suficiente para disminuir significativamente la tasa de incorporación de BrdU (Fig 14B). Por el contrario, las

células cultivadas en condiciones basales sin RA eran insensibles a la adición de KCl durante 1 u 8 días y no reducían su tasa de proliferación en ningún caso (Fig 14B). Observamos también que el crecimiento neurítico era proporcional a los días de exposición al KCl pero sólo en aquellos cultivos expuestos anteriormente al RA.

#### 4.- Los efectos del KCl son mediados por un aumento del calcio intracelular.

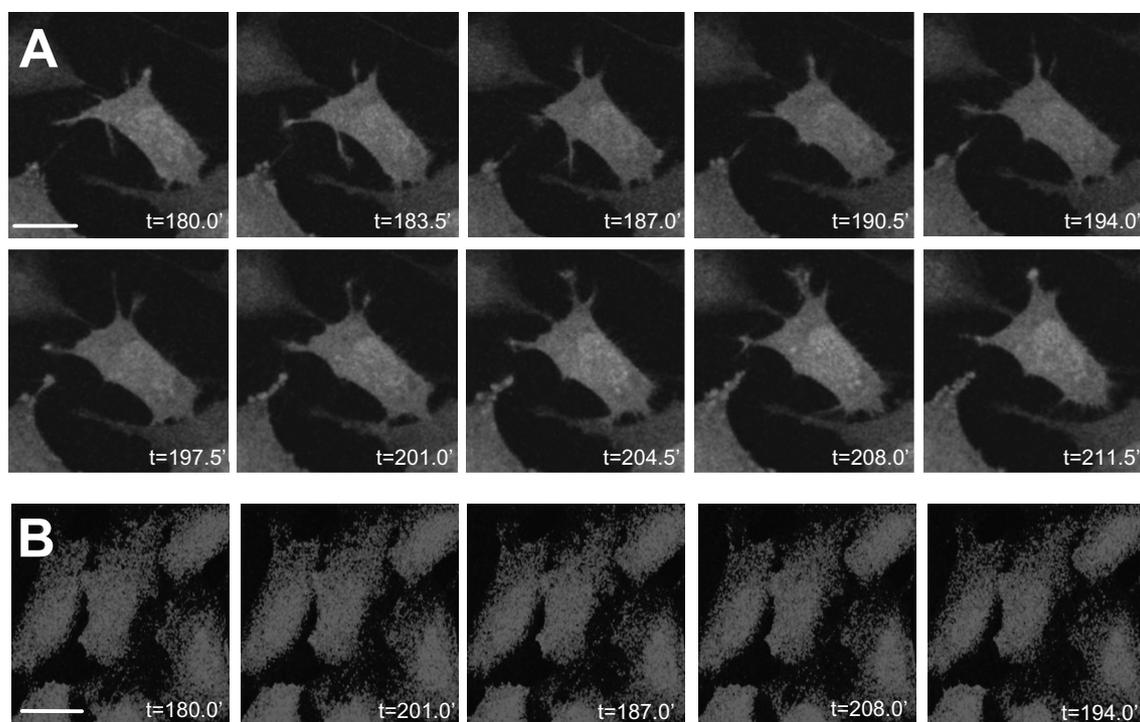
Para estudiar el posible mecanismo por el que el KCl ejercía sus efectos, analizamos la implicación del calcio. Demostramos en primer lugar que tanto las células tratadas con RA como las no tratadas eran despolarizadas por la adición de KCl y que ello comportaba una entrada de calcio en el interior de la célula. Usando Fluo-4 como indicador fluorescente de la concentración de calcio intracelular, comprobamos como



**Figura 16.** Inhibición del descenso de proliferación y la neuritogénesis. (A) Se añadió el quelante de calcio EGTA junto con el KCl durante 1 día y se cuantificaron el número de células BrdU-positivas a los 15 DIV (B) El EGTA bloquea la disminución del número de células BrdU-positivas ejercida por la adición de KCl. (C) Microfotografía del marcaje fluorescente para EGFP y BrdU a los 15 DIV en células tratadas con RA y KCl+EGTA donde se observa el mantenimiento de la proliferación y la inhibición de la neuritogénesis. Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM de 3 pozos de 3 experimentos independientes. \*  $P < 0,05$  respecto al tratamiento con RA y KCl+EGTA. La barra representa 20  $\mu$ m.

los contenidos de calcio intracelular aumentaban alrededor de 9 veces los niveles basales con la adición de 40 mM de KCl al medio, permaneciendo posteriormente en un nivel de concentración elevada (Fig 15).

Añadiendo el quelante de calcio EGTA se bloqueaba por completo la reducción de la proliferación que observábamos en el cultivo tras un día de exposición al KCl (Fig 16A-C). Asimismo el EGTA también impedía la formación de los procesos neuríticos (comparar Fig 16C con Fig 12F ).

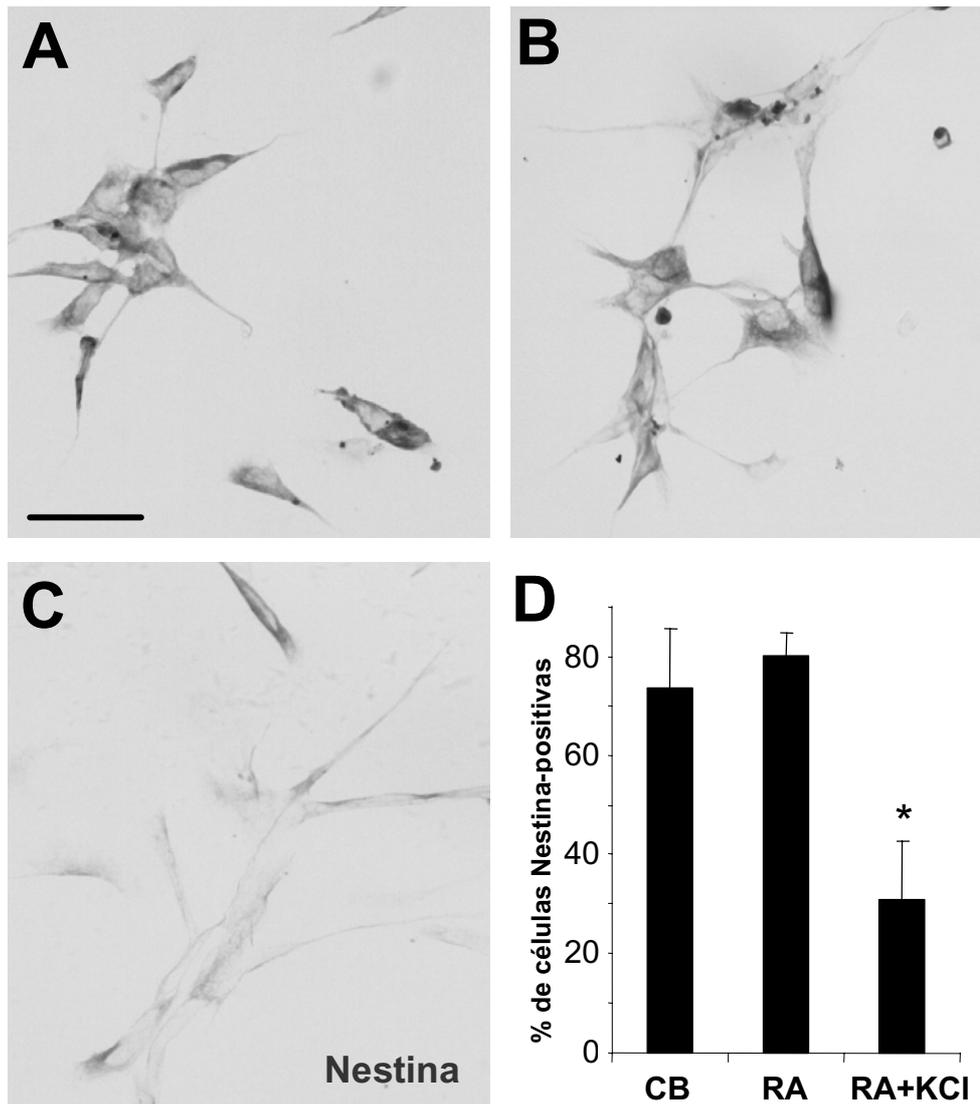


**Figura 17.** *Imágenes tomadas a intervalos de 3 minutos y medio de células tratadas con RA (A) o en condiciones basales (B) tres horas después de añadir KCl (40 mM), donde se observa la formación y retracción de neuritas sólo en las células tratadas con RA. La barra representa 10  $\mu$ m.*

Estudiando la morfología de las células a lo largo de las siguientes horas a la adición del KCl podíamos observar una dinámica inicial de formación y retracción de prolongaciones de membrana que sugerían el comienzo del crecimiento neurítico. Este

fenómeno se observaba a las 3 horas de la despolarización, pero sólo en las células tratadas con RA (Fig 17A) y no en las condiciones basales (Fig 17B).

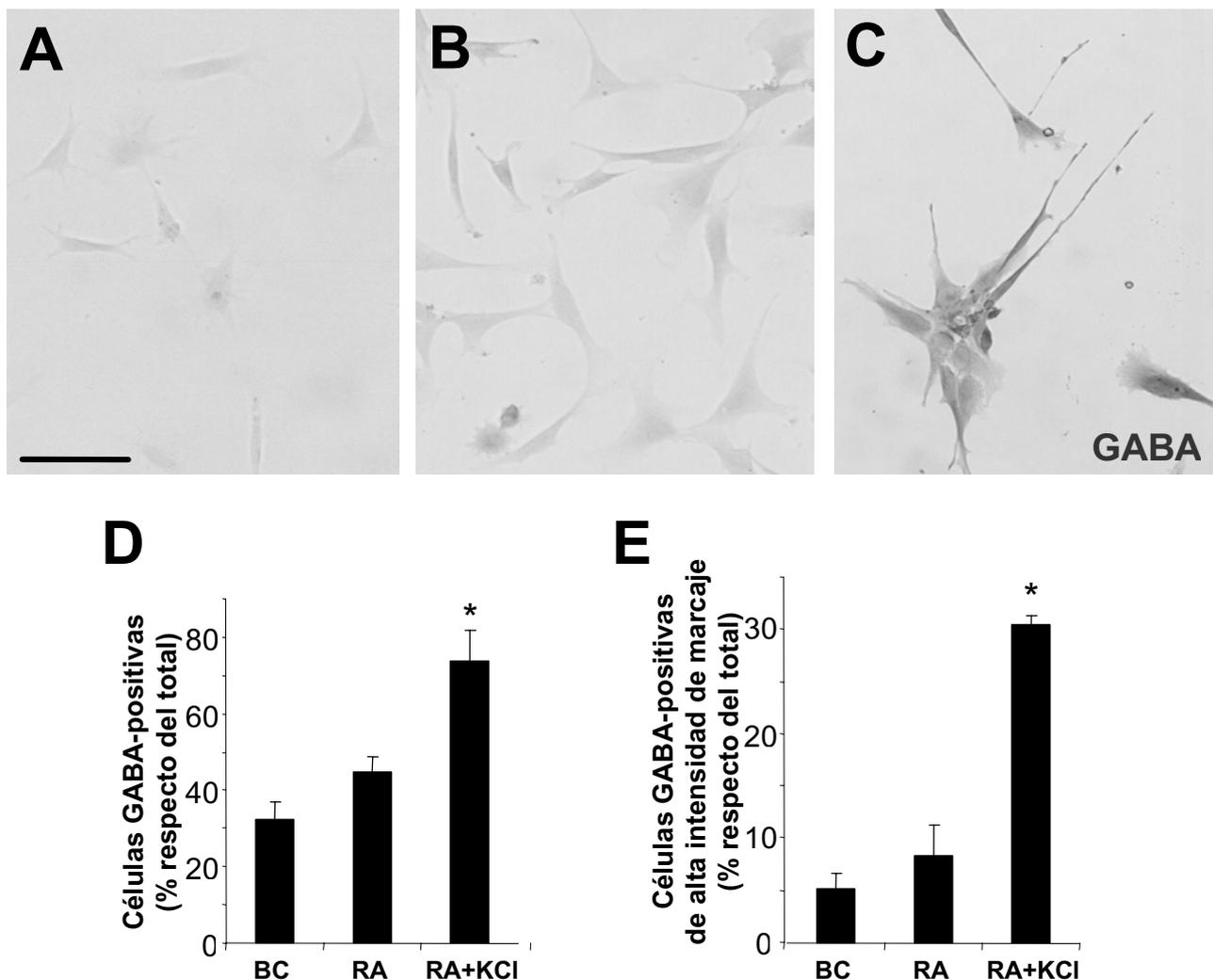
Estos datos nos sugerían que los efectos que ejercía la adición de KCl eran mediados por una despolarización y una entrada de calcio al interior celular.



**Figura 18.** El KCl reduce la expresión de Nestina. (A-C) *Inmunocitoquímica* contra Nestina de células cultivadas en condiciones basales (A), tratadas con RA (B) o tratadas secuencialmente con RA y con KCl (C). (D) *Cuantificación* del número de células Nestina –positivas con respecto al total de células a los 15 DIV. Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM de 3 pozos de 3 cultivos independientes. \*  $P < 0,05$  con respecto a las condiciones basales (CB) y al tratamiento con RA. La barra representa 20  $\mu$ m.

## 5.- El tratamiento con KCl promueve la adquisición de un fenotipo GABAérgico maduro y funcional.

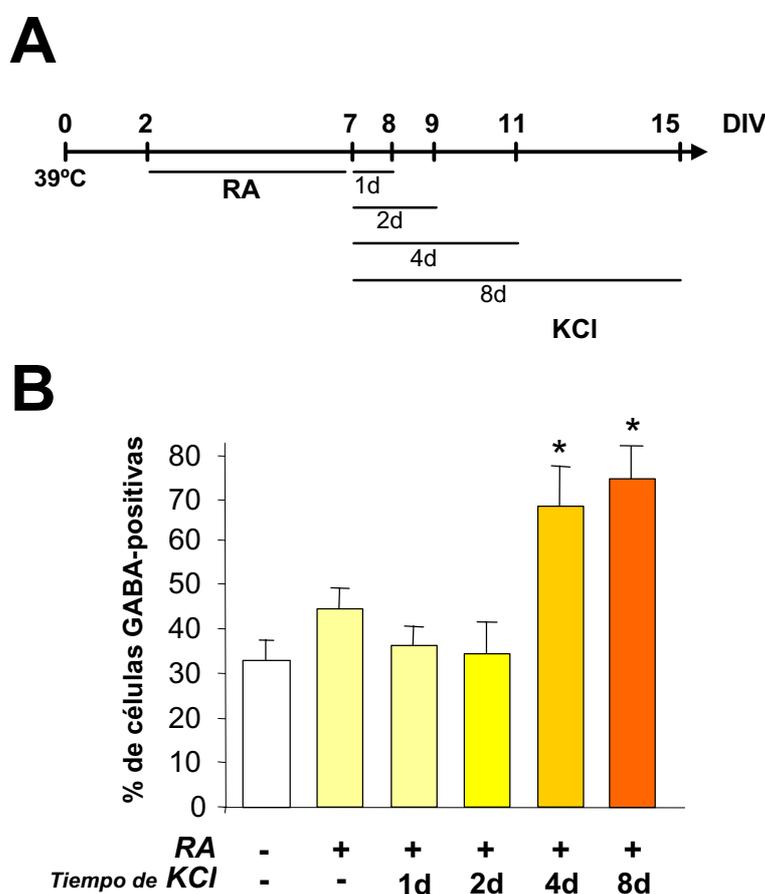
Cuando realizamos inmunocitoquímicas para estudiar el fenotipo de las células después de la exposición secuencial a RA y KCl, vimos en primer lugar que el número de células positivas para Nestina, un marcador de progenitor neural inmaduro, se había



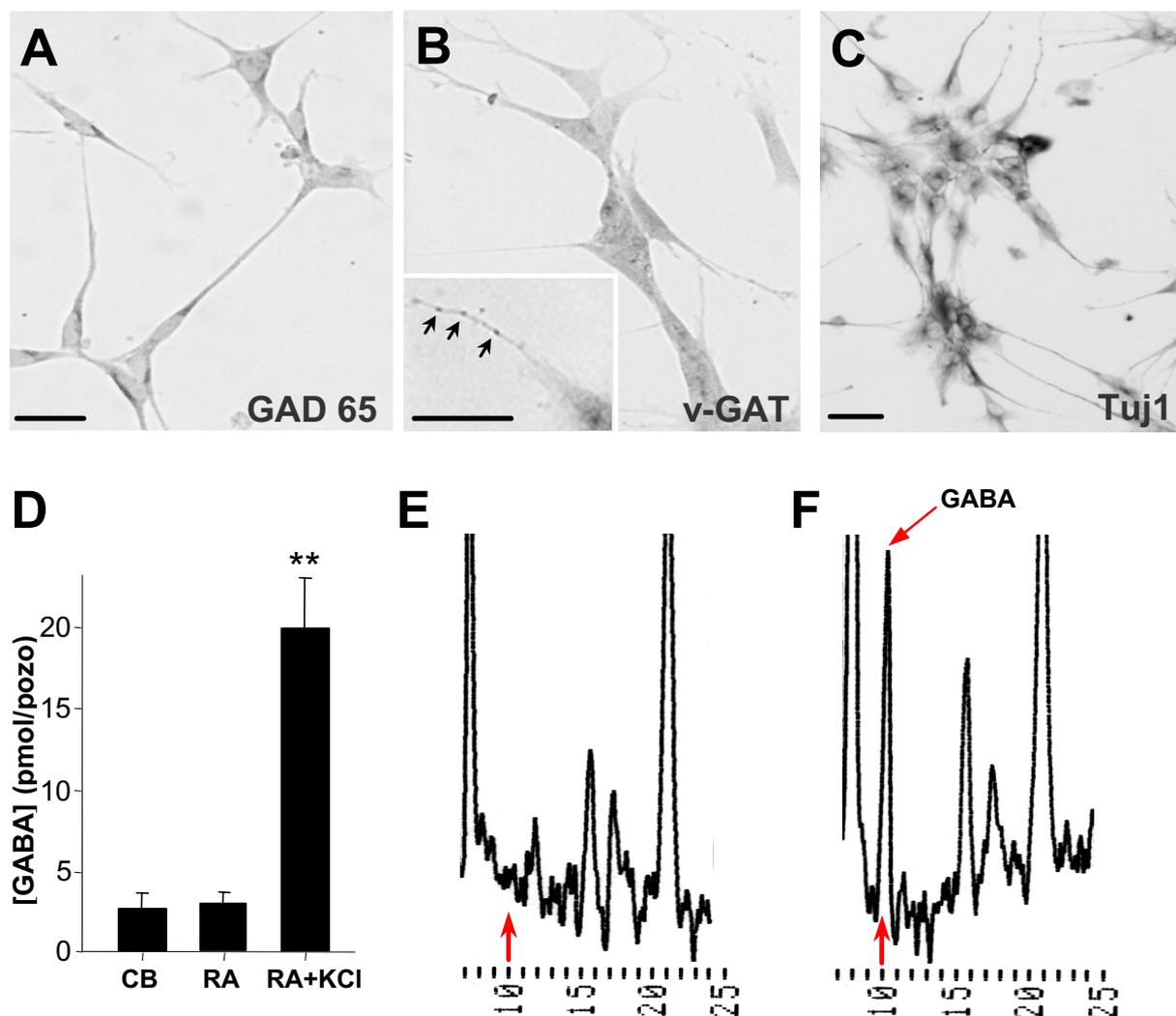
**Figura 19.** El KCl aumenta el marcaje para GABA. (A-C) Inmunocitoquímica contra GABA de células cultivadas en condiciones basales (A), tratadas con RA (B) o tratadas secuencialmente con RA y con KCl (C). (D) Cuantificación del número de células GABA-positivas con respecto al total de células a los 15 DIV. (E) Cuantificación del número de células con un marcaje de alta intensidad para GABA con respecto al total de células a los 15 DIV. Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM de 3-4 pozos de 4 experimentos independientes. \*  $P < 0,05$  con respecto a las condiciones basales (CB) y al tratamiento con RA. La barra representa 20  $\mu$ m.

reducido en un  $49 \pm 11$  % con respecto al tratamiento con sólo RA a los 15 DIV (Fig 18).

Pero lo más interesante fue observar como el número de células positivas para el marcaje contra GABA había aumentado hasta alcanzar un  $74 \pm 8$  % del número total de células en cultivo a los 15 DIV (Fig 19D). Sólo el  $32 \pm 5\%$  y el  $45 \pm 4\%$  del total de células eran positivas para GABA en condiciones basales y en el tratamiento con RA, respectivamente. Además, la intensidad del marcaje también era muy superior en las células tratadas con RA y KCl. De todas las células GABA-positivas tratadas con RA y



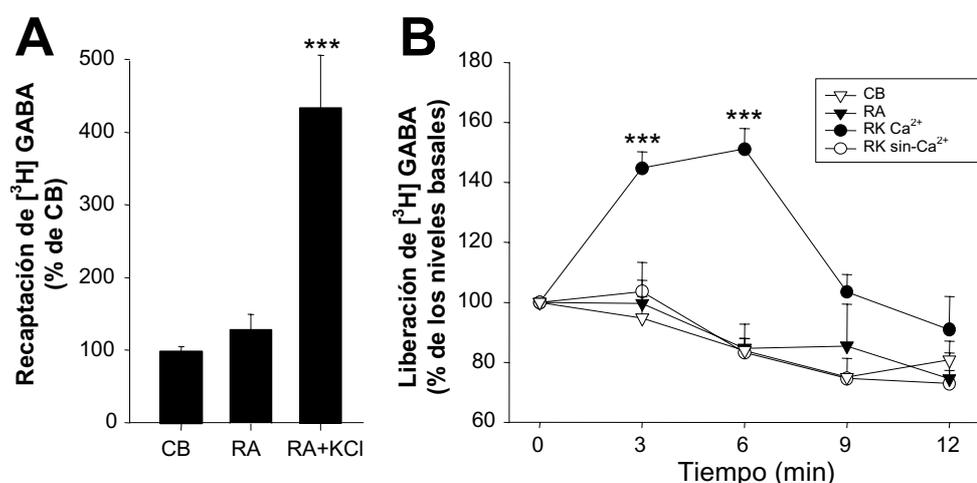
**Figura 20.** (A) KCl fue añadido al medio a 40 mM durante 1, 2, 4 ó 8 días. (B) La cuantificación del número de células GABA-positivas a los 15 DIV indica que son necesarios al menos 4 días de exposición al KCl para aumentar significativamente el número de células GABA-positivas. Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM de 3 pozos de 3 cultivos independientes. \*  $P < 0,05$  con respecto a las condiciones basales y al tratamiento con RA.



**Figura 21.** Las células diferenciadas presentan un fenotipo GABAérgico completo. Después del tratamiento con RA y KCl las células expresan GAD 65 (A), v-GAT en el citoplasma y en los procesos neuríticos (flechas), y  $\beta$ -III-tubulina (Tuj1, C). (D) Los análisis por HPLC demuestran que las células tratadas con RA y KCl contienen 7 veces más GABA intracelular que las células tratadas con RA o en condiciones basales (CB). (E-F) Cromatogramas representativos de lisados de cultivos tratados con RA (E) o tratados con RA y KCl (F). Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM de 4 pozos de 3 experimentos independientes. \*\* $P < 0,005$  con respecto a las condiciones basales y al tratamiento con RA. Las barras representan 20  $\mu$ m.

KCl, un  $41 \pm 1$  % presentaba un marcaje de alta intensidad, mientras que sólo un  $16 \pm 2$  % de las células en condiciones basales y un  $18 \pm 8$  % de las tratadas con RA presentaban esta intensidad de marcaje (Fig 19E). Este aumento del marcaje para GABA no se observó en los cultivos tratados con BDNF, NT-3, GDNF o NTRN (todos a 10-50 ng/ml) en ninguno de los tiempos examinados.

Analizamos también el tiempo de exposición mínima al KCl para conseguir este incremento del fenotipo GABAérgico. Con sólo 1 ó 2 días de exposición al KCl no éramos capaces de provocar un efecto observable sobre el cultivo. En cambio con 4 días de exposición al KCl ya podíamos detectar un incremento significativo en el número de células GABAérgicas (hasta un  $68 \pm 10$  % del total de células) y también en la intensidad del marcaje, a los 15 DIV (Fig 20).



**Figura 22.** Las células diferenciadas son capaces de recaptar y liberar GABA. (A) El ensayo de recaptación de GABA tritado demuestra que las células tratadas con RA y KCl recaptan 4 veces más que las tratadas en condiciones basales (CB) o tratadas con RA. (B) Las células tratadas con RA y KCl (RK Ca<sup>2+</sup>) son las únicas capaces de liberar GABA al ser despolarizadas, aunque no pueden hacerlo en ausencia de Ca<sup>2+</sup> extracelular (RK sin-Ca<sup>2+</sup>). Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM de 5-6 pozos de 3 experimentos independientes. \*\*\*  $P < 0,001$  con respecto a las condiciones basales (CB) y al tratamiento con RA.

Para caracterizar de forma más completa el fenotipo de las células tratadas con RA y KCl examinamos la expresión de la Glutamato Descarboxilasa (GAD 65), uno de los enzimas responsables de la síntesis de GABA, y del transportador que empaqueta el GABA en las vesículas (v-GAT). Detectamos claramente la presencia de GAD 65, en la región perinuclear del soma de la célula (Fig 21A), y de v-GAT en todo el citoplasma celular (Fig 21B) y también de forma punteada en los procesos neuríticos (Fig 21B flechas) de las células cultivadas con el tratamiento secuencial. También comprobamos cómo estas células expresan marcadores neuronales específicos, como la  $\beta$ -III-tubulina

(Tuj1, Fig 21C). No observamos asimismo la aparición de marcaje para ninguno de los marcadores gliales como el GFAP, el O4 y el OX-42.

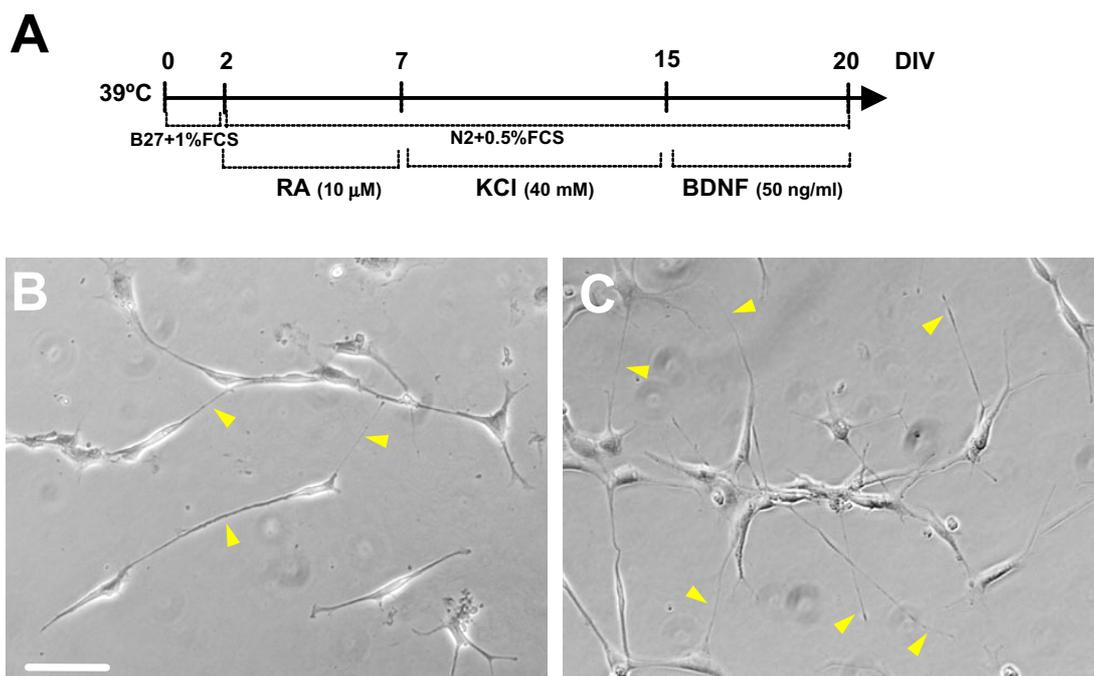
A continuación quisimos comprobar de una forma más cuantitativa el aumento que habíamos observado mediante inmunocitoquímica en el marcaje para GABA. Analizamos los contenidos intracelulares de GABA por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y observamos como las células diferenciadas mediante el tratamiento secuencial con RA y KCl habían incrementado su contenido en GABA alrededor de un 600% respecto a las condiciones basales o al tratamiento con RA (Fig 21D-F).

Finalmente examinamos las propiedades funcionales de captación y liberación de GABA de las células diferenciadas. Comprobamos que las células tratadas con RA y KCl eran capaces de recaptar 4 veces más GABA marcado radioactivamente que las células tratadas con RA o sin tratar (Fig 22A). A continuación determinamos si las células diferenciadas eran realmente capaces de liberar el neurotransmisor GABA en respuesta a una despolarización. Puesto que estas células ya estaban siendo cultivadas en concentraciones despolarizantes de KCl, usamos 0,1  $\mu$ M de ionomicina para inducir una entrada de calcio al interior de la célula. Comprobamos como las células tratadas con RA y KCl eran capaces de liberar GABA al medio, mientras que ni las células cultivadas en condiciones basales ni las tratadas con RA eran capaces de hacerlo (Fig 22B). Esta liberación era, además, dependiente de la presencia de calcio extracelular, ya que en un medio libre de calcio y con EGTA no tenía lugar la liberación (Fig 22B). Mediante el ensayo de exclusión al Azul de Tripán comprobamos que después de la recaptación y liberación de GABA las células seguían siendo viables en más del 90%.

Con estos resultados, por lo tanto, demostramos que estas células eran capaces de sintetizar GABA, empaquetarlo en vesículas, secretarlo y recaptarlo del medio externo. Estos resultados nos indican que las células ST14A podían ser diferenciadas *in vitro* hacia un fenotipo neuronal GABAérgico maduro y funcional, de forma homogénea, mediante el tratamiento secuencial con RA y KCl.

## 6.- El BDNF incrementa el crecimiento neurítico de las células previamente tratadas con RA y KCl

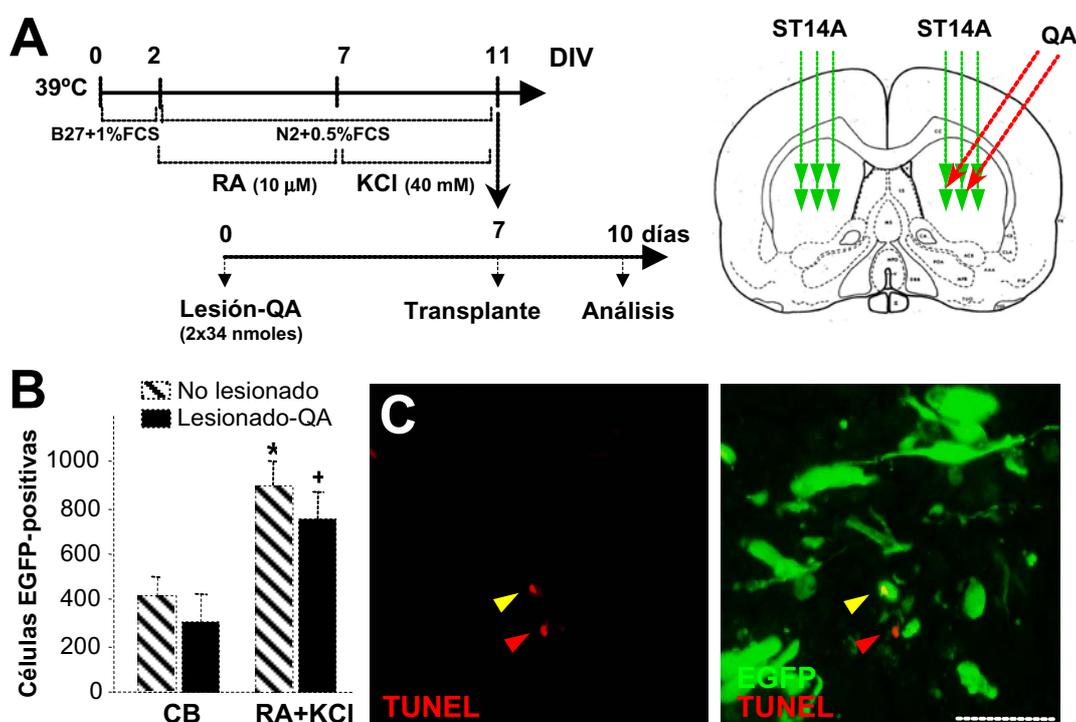
Dado que se había relacionado el BDNF con la maduración de las neuronas GABAérgicas (Gavalda et al., 2004; Mizuno et al., 1994), quisimos comprobar, en último término, el efecto que tendría la adición de esta neurotrofina sobre las células ya diferenciadas con el protocolo secuencial de RA y KCl. Los anteriores resultados nos habían mostrado como la adición de BDNF a las células cultivadas en condiciones basales o tratadas con RA durante 5 días no ejercía efecto en ninguno de los parámetros examinados. En cambio, si tratábamos los cultivos con 50 ng/ml de BDNF durante 5 DIV después de la exposición al KCl (de los 15 DIV a los 20 DIV; Fig 23A) pudimos observar un incremento aún mayor de la longitud y las ramificaciones de los procesos neuríticos en muchas de las células presentes en el cultivo (Fig 23C).



**Figura 23.** El BDNF promueve el crecimiento neurítico tras el tratamiento con RA y KCl. (A) Se añadió 50 ng/ml de BDNF de los 15 DIV a los 20 DIV después del tratamiento con KCl. (B) A los 20 DIV las células tratadas con RA y KCl muestran cierto desarrollo neurítico inducido por el KCl. (C) A los 20 DIV las células tratadas con RA, KCl y BDNF presentan un incremento mayor de la arborización neurítica (flechas). La barra representa 30  $\mu$ m.

## 7.- Supervivencia de las células ST14A diferenciadas *in vitro*, después de su transplante en un modelo de la enfermedad de Huntington.

A continuación estudiamos la capacidad de supervivencia, integración, diferenciación y funcionalidad de las células ST14A diferenciadas mediante el protocolo desarrollado *in vitro*, después del transplante en un modelo de la enfermedad de Huntington. Las células fueron diferenciadas siguiendo el tratamiento secuencial con RA y KCl hasta los 11 DIV, momento en que las células ya se encontraban especificadas hacia el fenotipo GABAérgico (Fig 24A).



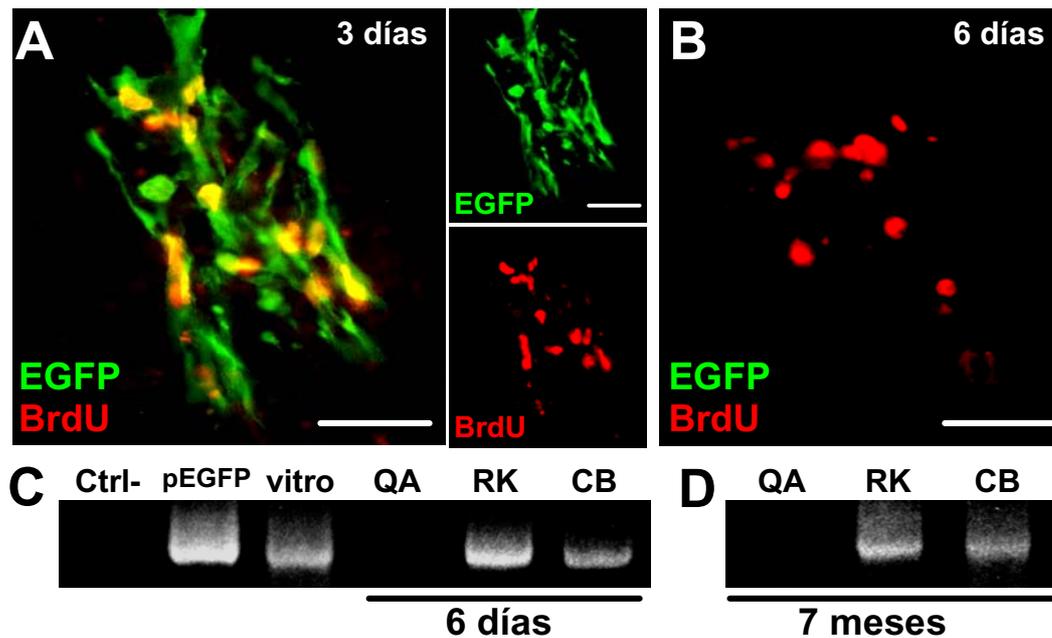
**Figura 24.** Transplante de las células prediferenciadas *in vitro* en un modelo de la enfermedad de Huntington. (A) Esquema del proceso de transplante: las células fueron cultivadas siguiendo el tratamiento secuencial o las condiciones basales hasta los 11 DIV y entonces fueron transplantadas en un núcleo estriado lesionado con QA o no-lesionado. (B) Cuantificación del número de células EGFP-positivas por núcleo estriado lesionado o no-lesionado a los tres días del transplante. (C) Ensayo de TUNEL para la detección de células apoptóticas 3 días después del transplante. Algunas células TUNEL-positivas colocalizan con la EGFP (flecha amarilla) y otras no (flecha roja). Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM ( $n=4$  animales por condición). \*, +  $P<0,05$  respecto a CB. La barra representa 30  $\mu$ m.

Los trasplantes fueron realizados en ratas inmunodeprimidas para evitar los problemas del rechazo inmunológico. Las células fueron transplantadas en seis localizaciones diferentes del núcleo estriado de una rata adulta de forma bilateral. Uno de los núcleos estriados había sido lesionado 7 días antes con dos inyecciones de 34 nmoles de QA (Fig 24A). Este tipo de lesión ha sido utilizado durante mucho tiempo como modelo de la enfermedad de Huntington (Beal et al., 1986). De esta manera podíamos examinar el comportamiento de las células en dos entornos diferentes: un núcleo estriado adulto intacto y en un núcleo estriado con una buena parte de las neuronas GABAérgicas de proyección eliminadas y cierto grado de reacción astrocitaria. El mismo procedimiento se siguió para el trasplante de células control, cultivadas en condiciones basales hasta los 11 DIV. Tanto antes como durante el proceso de trasplante se comprobó la viabilidad celular por el método del Azul de Tripán. Se evidenció que las células eran viables en más del 90% en el momento del trasplante.

Las células ST14A utilizadas en este trabajo expresan el gen marcador EGFP, cuya proteína se localiza en todo el citoplasma. Esto permite, en principio, detectar las células *in vivo* y observar su completa morfología. A los tres días del trasplante podíamos detectar células EGFP-positivas en casi todas las ratas transplantadas, pero encontramos aproximadamente el doble de células pre-diferenciadas con RA y KCl que células cultivadas en condiciones basales (Fig 24B). No obstante, no observamos diferencias entre los núcleos estriados intactos y los núcleos estriados lesionados con QA (Fig 24B).

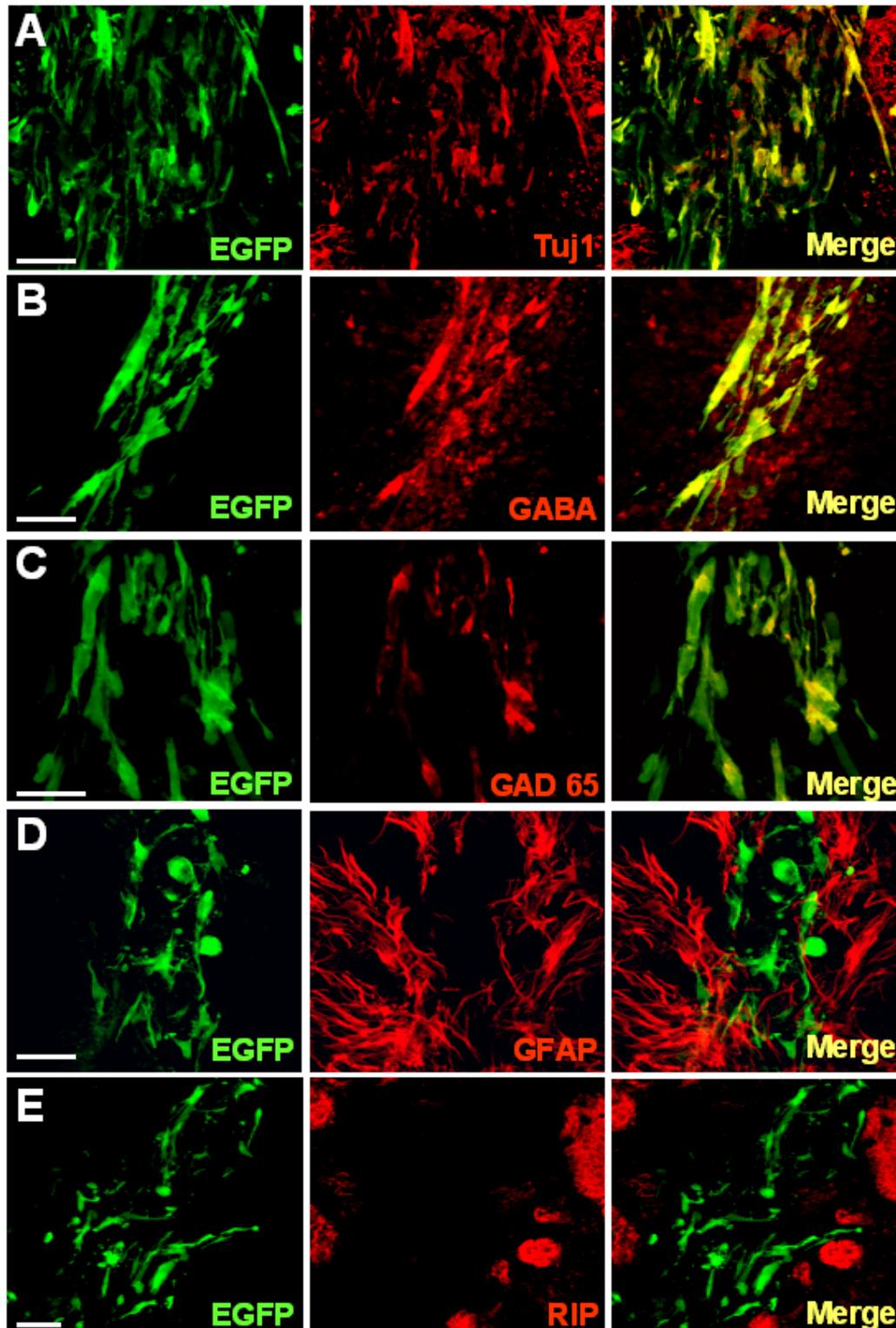
Cuando analizamos las ratas seis días después del trasplante, sin embargo, detectamos un número extremadamente bajo de células EGFP-positivas, y a los 12 días del trasplante ya no éramos capaces de detectar ninguna célula transplantada. La explicación más razonable a estas observaciones era que las células habían muerto masivamente entre los 3 y los 6 días después del trasplante. Llevamos a cabo el ensayo de TUNEL para detectar las células apoptóticas, pero encontramos que a los 3 días sólo un  $3,9 \pm 2,1\%$  de las células eran TUNEL-positivas (Fig 24C). A los 6 días prácticamente ya no encontramos ninguna célula TUNEL-positiva.

Otra explicación para la desaparición de las células *in vivo* podría ser la inactivación de la expresión del gen marcador, tal y como ha sido descrito para otras

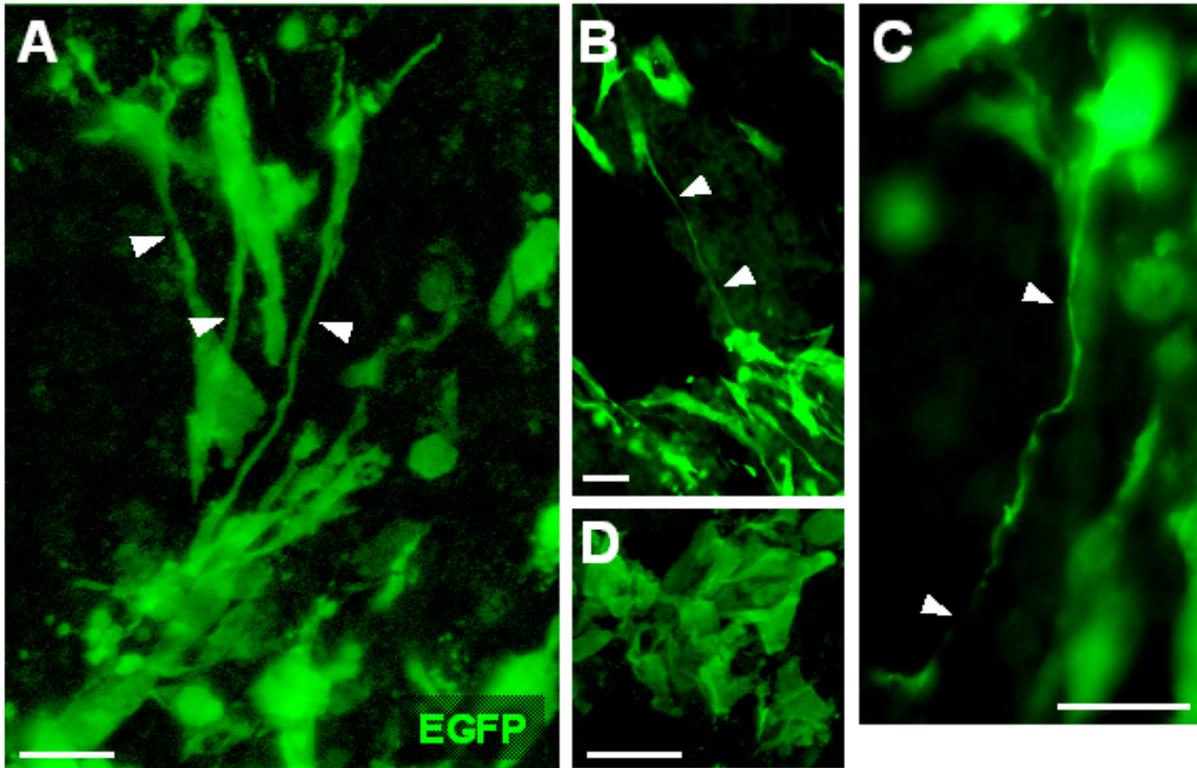


**Figura 25.** Supervivencia a largo plazo de las células después del trasplante. Para detectar las células transplantadas más allá de la pérdida de expresión del gen marcador EGFP, las células fueron incubadas con BrdU antes del trasplante. (A) A los 3 días del trasplante podemos observar células marcadas tanto con EGFP como con BrdU. (B) A los 6 días del trasplante pueden detectarse células BrdU-positivas pero el marcaje por EGFP ha desaparecido completamente. (C) Las células son también detectadas *in vivo* mediante PCR contra el gen de la EGFP, tanto las células cultivadas con el tratamiento secuencial (RK) como en las condiciones basales (CB) a los 6 días. No aparece señal en animales lesionados pero no transplantados (QA). Los controles positivos para la PCR son el plásmido con la secuencia de la EGFP (pEGFP), y DNA extraído de células ST14A proliferantes *in vitro* ("vitro"). (D) La banda específica para la EGFP también se detecta en animales transplantados con células cultivadas con el tratamiento secuencial (RK) o en las condiciones basales (CB) a los 7 meses del trasplante. Las barras representan 30  $\mu\text{m}$ .

líneas celulares (Akerud et al., 2001; Martínez-Serrano y Bjorklund 1997). Para comprobarlo, usamos el marcaje alternativo con BrdU. Las células fueron incubadas *in vitro* con BrdU durante 24 horas y transplantadas siguiendo el mismo protocolo. A los tres días del trasplante, observamos como aproximadamente la mitad de las células EGFP-positivas eran también positivas para BrdU (Fig 25A), tal y como esperábamos por la tasa de incorporación del BrdU *in vitro*. Seis días después del trasplante detectábamos un número similar de células BrdU-positivas pero completamente negativas para EGFP (Fig 25B). Esto nos sugería que realmente las células seguían presentes pero habían perdido la expresión del gen marcador.



**Figura 26.** Las células ST14A pre-diferenciadas *in vitro* mantienen el fenotipo neuronal GABAérgico después del trasplante. Mediante doble inmunohistoquímica observamos como las células diferenciadas con el protocolo a base de RA y KCl son inmunopositivas para el marcador neuronal Tuj1 (A) y presentan marcaje positivo para GABA (B) y para el enzima GAD 65 (C). En cambio no se observa colocalización alguna entre la células EGFP-positivas y los marcadores para astrocitos GFAP (D) o para oligodendrocitos RIP (E). Las barras representan 30  $\mu$ m.



**Figura 27.** Tres días después del trasplante las células diferenciadas según el tratamiento con RA y KCl (A, B y C) desarrollan largos procesos neuríticos (flechas). Este fenómeno no se observa en células cultivadas en condiciones basales (D). Las barras representan 10  $\mu$ m.

Para confirmar la presencia de las células vivas más allá de los 3 días después del trasplante, procedimos a la detección del gen de la EGFP mediante PCR. Efectivamente, a los 6 días del trasplante podíamos detectar la banda específica correspondiente a la EGFP en los núcleos estriados lesionados y no lesionados, en los trasplantes con las células diferenciadas con RA y KCl o con las condiciones basales (Fig 25C). Algunas de las ratas transplantadas fueron sacrificadas al cabo de un mes y medio del trasplante, y otras fueron mantenidas hasta los 7 meses (Fig 25D). Se extrajo el DNA estriatal y en todos los casos se detectó la presencia de las células por PCR contra la EGFP, tanto las cultivadas con el tratamiento secuencial como en condiciones basales. Estos resultados nos indican que las células pueden sobrevivir por lo menos hasta los 7 meses *in vivo*.

## **8.- Las células pre-diferenciadas *in vitro* mantienen su fenotipo neuronal GABAérgico después del trasplante.**

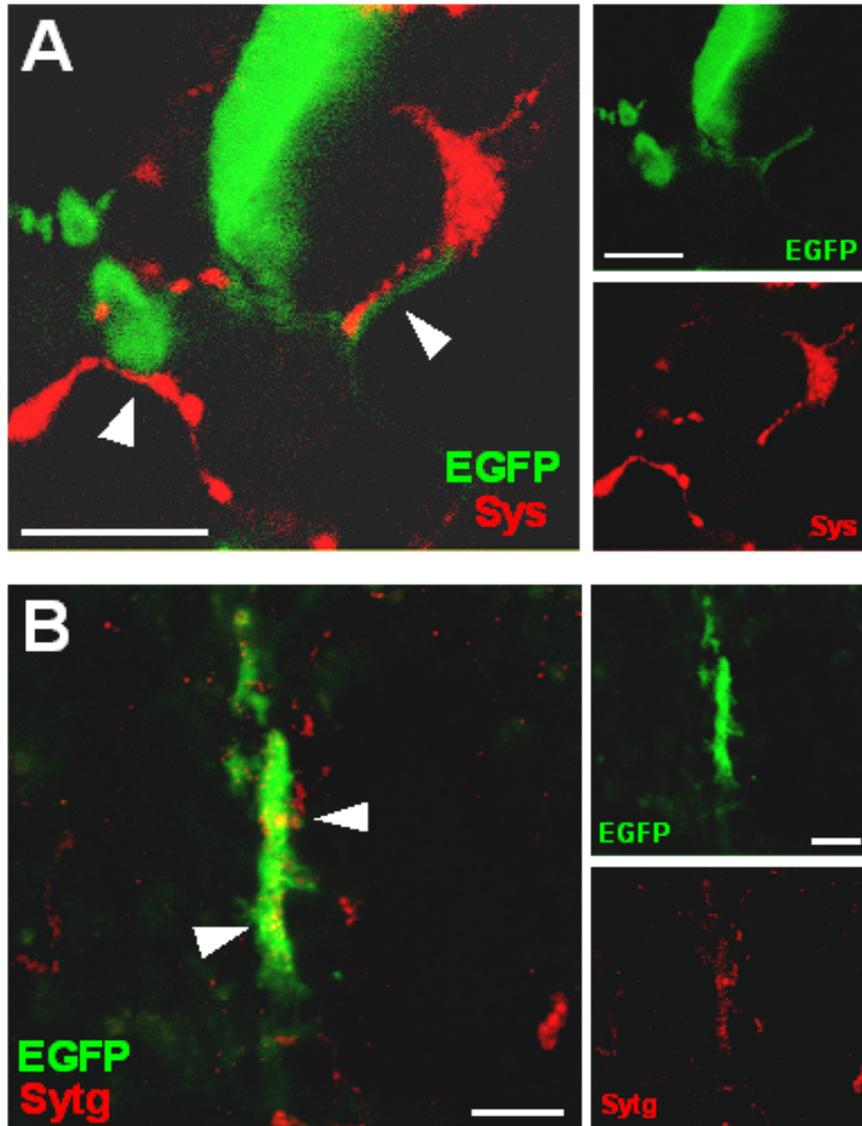
Analizamos también el fenotipo que las células habían adoptado a los 3 días del trasplante, tanto en un núcleo estriado intacto como en un núcleo estriado lesionado con QA, mediante doble inmunohistoquímica contra la EGFP y contra marcadores fenotípicos específicos. Comprobamos que las células transplantadas, tanto las cultivadas con tratamiento secuencial como en las condiciones basales, eran positivas para el marcador neuronal  $\beta$ -III-tubulina (Tuj1, Fig 26A). Sin embargo, sólo las células que habían sido tratadas *in vitro* con RA y KCl eran claramente positivas para el marcaje contra GABA (Fig 26B) y contra la GAD 65 (Fig 26C). Las células cultivadas en condiciones basales no colocalizaban con estos marcadores. También comprobamos como en ningún caso las células transplantadas podían ser detectadas con antígenos gliales, tales como el marcador astrocitario GFAP (Fig 26D), el marcador oligodendroglial RIP (Fig 26E), o el marcador microglial OX-42. El fenotipo expresado por las células transplantadas en un núcleo estriado intacto era muy similar al de las células transplantadas en un núcleo estriado lesionado.

## **9.- Las células pre-diferenciadas desarrollan procesos neuríticos asociados a la presencia de vesículas sinápticas GABAérgicas.**

Tres días después del trasplante, algunas de las células previamente tratadas con RA y KCl mostraban evidentes signos morfológicos de diferenciación: habían desarrollado largos procesos neuríticos que interconectaban unas células con otras (Fig 27A-C). En ningún caso las células tratadas en las condiciones basales mostraban este tipo de morfologías (Fig 27D).

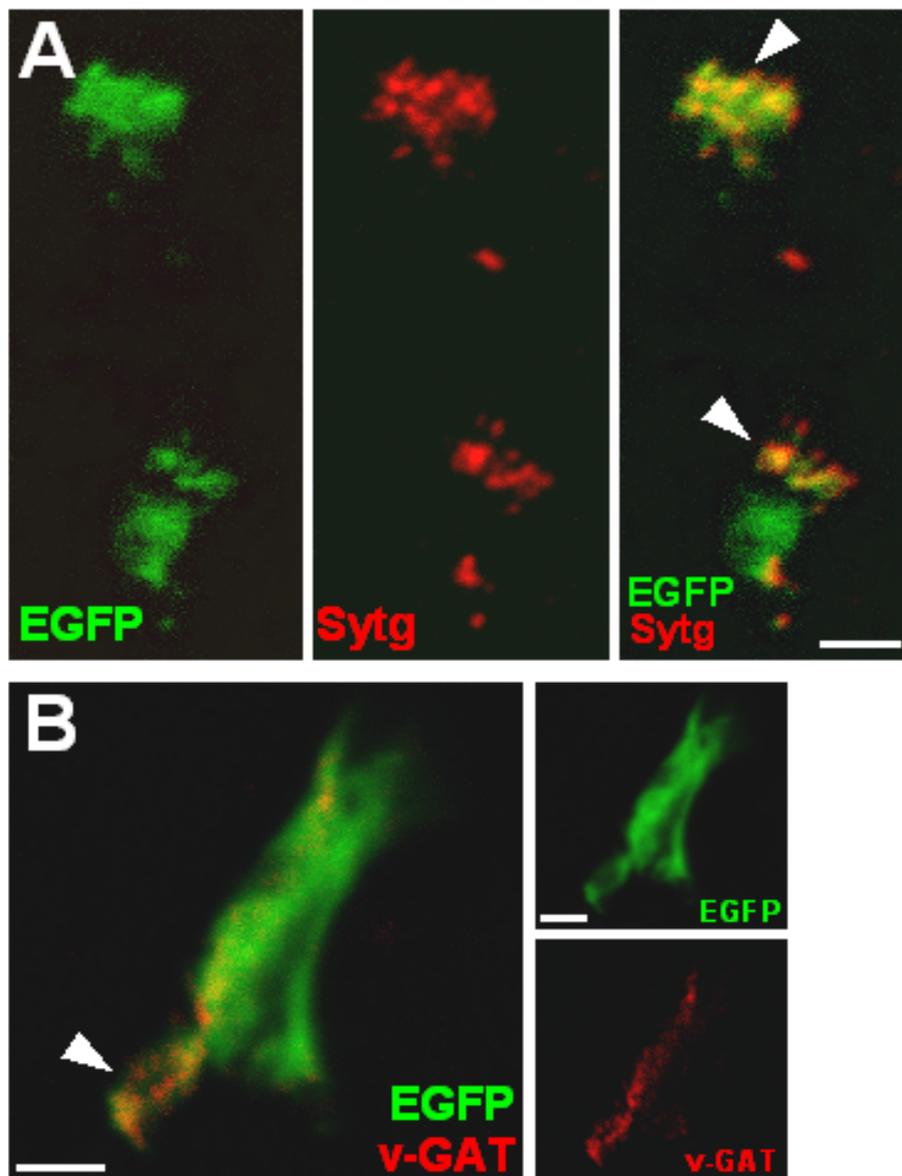
Para buscar evidencias de la posible funcionalidad de las células transplantadas, llevamos a cabo la inmunodetección de proteínas relacionadas con la actividad sináptica. Analizamos la localización de proteínas asociadas a vesículas pre-sinápticas (proteínas vSNARE) (Trimble 1998) tales como la sinapsina I y la sinaptotagmina, y también de la v-GAT. Observamos la presencia de vesículas inmunopositivas para la

sinapsina (Fig 28A) y para la sinaptotagmina (Fig 28B) alrededor del soma y de los procesos de las células transplantadas, sugiriéndonos que estas células podrían estar recibiendo contactos sinápticos de las células vecinas o células del huésped. Detectamos también la presencia de vesículas inmunopositivas para la sinaptotagmina (Fig 29A) o



**Figura 28.** Las células pre-diferenciadas reciben posibles contactos sinápticos *in vivo*. (A, B) Inmunohistoquímica doble revela la presencia de proteínas de vesículas sinápticas, tales como la sinapsina I (Sys, A) o la sinaptotagmina (Sytg, B) alrededor del soma y los procesos de las células EGFP-positivas. Las barras representan 5  $\mu\text{m}$ .

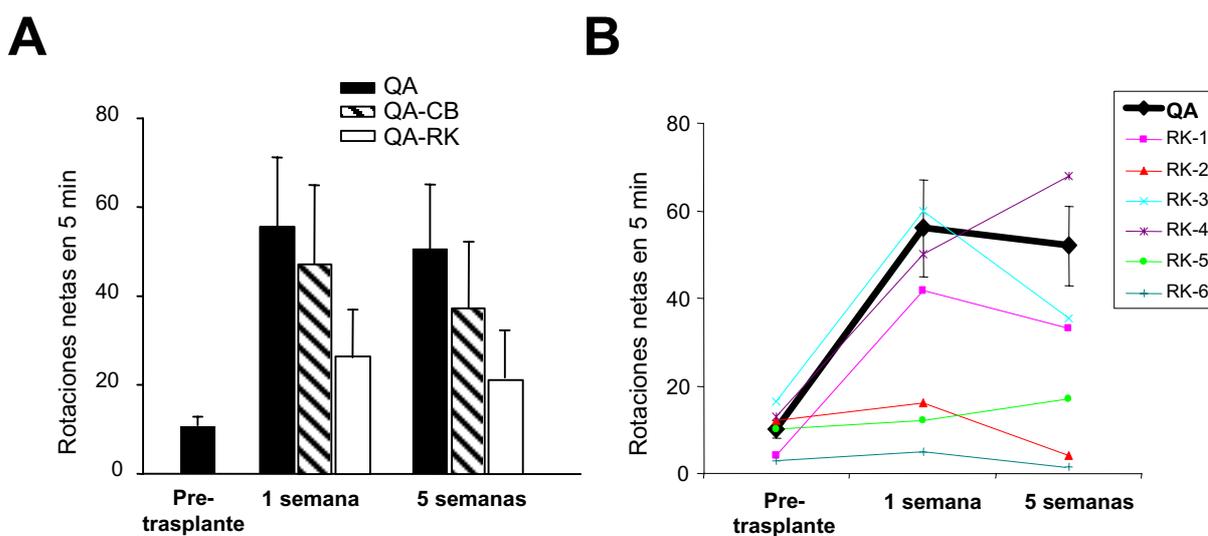
para la v-GAT (Fig 29B) que colocalizaban con estructuras EGFP-positivas. Esto nos indicaba la posibilidad que nuestras células transplantadas desarrollaran contactos sinápticos de naturaleza GABAérgica con células de su entorno.



**Figura 29.** Las células pre-diferenciadas emiten posibles contactos sinápticos GABAérgicos *in vivo*. (A, B) Los propios procesos EGFP-positivos de las células transplantadas colocalizan con proteínas de vesículas sinápticas como la sinaptotagmina (A) o la v-GAT (B). Las barras representan 2  $\mu$ m.

## 10.- Los trasplantes de células pre-diferenciadas recuperan la funcionalidad en algunos animales del modelo excitotóxico de la enfermedad de Huntington.

Finalmente examinamos la capacidad que tendrían los trasplantes de células diferenciadas *in vitro* para revertir los déficits motores de un núcleo estriado lesionado. En este ensayo las ratas fueron lesionadas unilateralmente con QA y, una semana después, se transplantaron en el mismo núcleo estriado las células diferenciadas con el tratamiento secuencial o en las condiciones basales. Como control, algunas ratas fueron inyectadas simplemente con el vehículo de administración de las células. Después de 1 y 5 semanas del trasplante se examinó el patrón de rotaciones asimétricas inducidas por la administración de apomorfina, un agonista de los receptores dopaminérgicos. En este modelo la lesión unilateral por QA induce un comportamiento rotacional ipsilateral



**Figura 30.** Test de rotaciones para la detección de recuperación funcional. Las ratas lesionadas unilateralmente realizan rotaciones ipsilaterales con la administración de apomorfina. (A) Los trasplantes de células tratadas con RA y KCl (QA-RK) tienden a reducir el número de rotaciones más que los trasplantes de células cultivadas en condiciones basales (QA-CB) aunque no de forma significativa con respecto a los animales sin trasplante (QA), a 1 ó 5 semanas después del trasplante. Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM de 6-7 animales por condición. (B) Número de rotaciones detalladas para cada uno de las 6 ratas transplantadas con células diferenciadas con RA y KCl (RK-*i*, donde *i*=1-6), comparadas con la media  $\pm$  SEM de las ratas no transplantadas (QA, en negro).

a la lesión tras la administración de la apomorfina. Una reducción de las rotaciones indica una recuperación funcional del núcleo estriado lesionado.

Los animales transplantados con células cultivadas en condiciones basales reducían el número de rotaciones un 13 % en la primera semana y un 32 % al cabo de 5 semanas, respecto los animales inyectados con vehículo. Los animales transplantados con células tratadas con RA y KCl veían reducido el número de rotaciones en un 58 % al cabo de una semana y en un 64 % a las 5 semanas del trasplante, respecto los animales inyectados con vehículo (Fig 30A). Aunque los resultados no son significativos, se aprecia claramente una tendencia a la reducción del comportamiento rotacional en los animales transplantados con las células GABAérgicas. La falta de significación se debe a la disparidad de los datos rotacionales entre los diferentes animales. De los 6 animales transplantados con células pre-diferenciadas, 3 no experimentaron ninguna mejora con respecto a los no transplantados, pero los otros 3 animales sí mejoraron el patrón de rotaciones con respecto a los no transplantados (Fig 30B). Aunque los resultados muestran la existencia de cierta recuperación funcional, deben aún optimizarse varios de los parámetros de este ensayo para demostrar un efecto reproducible en los trasplantes de células diferenciadas.



## **V. DISCUSIÓN**

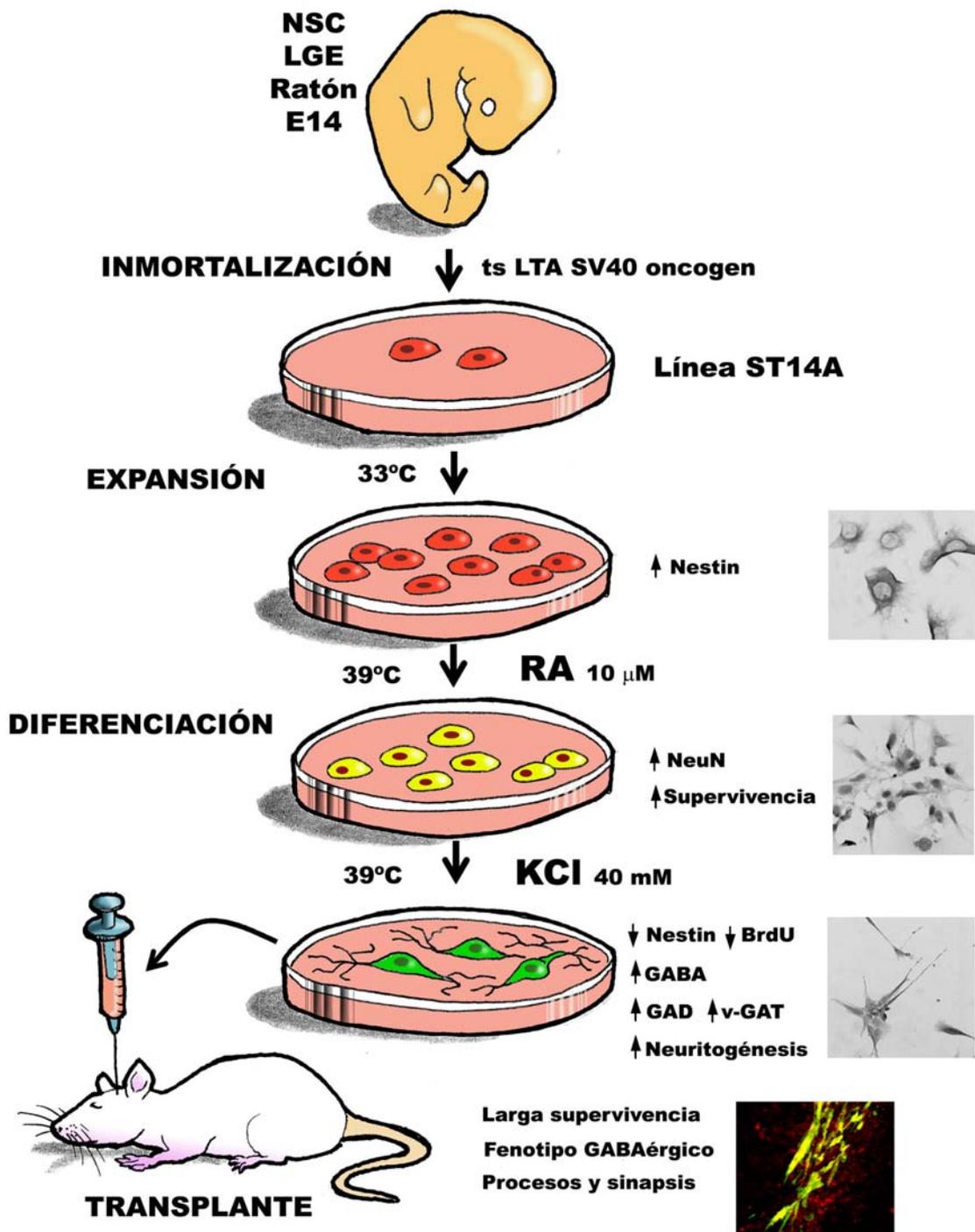


## DISCUSIÓN

La complejidad del sistema nervioso es verdaderamente extraordinaria. El reto de repararlo cuando falla es, pues, igual de extraordinario. Sin embargo, la emergente tecnología que ofrecen las células madre abre nuevas posibilidades con las que luchar contra muchas de las enfermedades del sistema nervioso que actualmente no disponen de tratamiento alguno. Las aplicaciones clínicas totalmente controladas y eficaces quedan aún lejos, pero los conocimientos sobre las propiedades y las capacidades de las células madre crecen enormemente día tras día y apuntan hacia futuras terapias realmente viables.

En la presente tesis aportamos datos que apoyan la posibilidad de desarrollar terapias de sustitución celular para enfermedades neurodegenerativas a partir de células madre. Demostramos que es posible controlar el destino fenotípico de las células madre y que los trasplantes de células pre-diferenciadas *in vitro* son factibles. En concreto, hemos desarrollado un procedimiento para la generación *in vitro* de una población homogénea de neuronas GABAérgicas a partir de una línea de progenitores neurales mediante la manipulación externa del medio de cultivo. El procedimiento se basa en la adición de factores epigenéticos, sin una manipulación genética de las células. El tratamiento secuencial con RA y KCl induce la adquisición de un fenotipo neuronal GABAérgico maduro, postmitótico y funcional. Estas células diferenciadas *in vitro* pueden ser transplantadas en un cerebro adulto donde conservan sus características fenotípicas y elaboran procesos neuríticos con posibles contactos pre- y post-sinápticos (**Figura 31**).

Para generar neuronas de un fenotipo muy concreto podemos partir de células madre muy indiferenciadas, como el caso de las ESC, o bien de células madre más restringidas en su linaje, como el caso de NSC o progenitores neurales. En el primer caso será necesario dirigir la célula a través de un largo camino. Primero, la especificación hacia células de la capa germinal del ectodermo. Después, la generación de progenitores neurales que, a su vez, deberán convertirse en neuronas. Finalmente, la consecución del fenotipo concreto con su neurotransmisor adecuado. En cambio si partimos de células más desarrolladas puede resultar más sencillo controlar el producto



**Figura 31.** Esquema del proceso experimental llevado a cabo como modelo de terapia celular. Se resume la generación de la línea inmortalizada ST14A a partir de células madre neuronales (NSC) de la eminencia ganglionar lateral (LGE) de un feto de 14 días (E14), su expansión a 33°C, su diferenciación al fenotipo neuronal GABAérgico mediante un tratamiento secuencial con RA y KCl, y su transplante en un modelo de la enfermedad de Huntington.

final de la diferenciación. Por este motivo en el presente trabajo decidimos trabajar con líneas inmortalizadas de células madre neurales aisladas de la eminencia ganglionar lateral, primordio del núcleo estriado. La inmortalización mediante oncogenes permite el cultivo de grandes cantidades de células con propiedades homogéneas y son un excelente modelo para el estudio de su potencial de diferenciación o integración después de un trasplante (Martinez-Serrano y Bjorklund 1997). El modelo utilizado en este trabajo es la línea celular inmortalizada ST14A. Estas células han sido utilizadas en numerosos estudios sobre diferenciación *in vitro* (Cattaneo et al., 1996; Conti et al., 2001; Weinelt et al., 2003) o usadas como vehículos de terapia génica (Barresi et al., 2003; Benedetti et al., 2000; Corti et al., 1996; Torchiana et al., 1998). En experimentos previos se había observado como el trasplante de las células ST14A directamente desde el estado proliferante a 33°C en un cerebro adulto conducía a una diferenciación espontánea muy pobre y mayoritariamente hacia fenotipos gliales (Cattaneo et al., 1994; Lundberg et al., 1997). En el presente estudio nos planteamos, pues, un proceso de diferenciación estable y eficaz hacia neuronas de tipo GABAérgico *in vitro*, y el posterior trasplante de estas células pre-diferenciadas en el cerebro adulto.

Para desarrollar un procedimiento de diferenciación específica *in vitro* debíamos en primer lugar rediseñar las condiciones de cultivo de las células ST14A para adaptarlas a nuestros objetivos. Estas necesidades requerían un medio de cultivo donde fuese posible inducir una diferenciación completa y funcional a la vez que garantizar una supervivencia celular aceptable. Queríamos transplantar células con el máximo grado de diferenciación pero con buenas expectativas de supervivencia *in vivo*. Con el fin de encontrar un equilibrio entre supervivencia y diferenciación, hemos ensayado toda una serie de estrategias con nuestros cultivos. Hemos comprobado como la muerte inducida por el cambio de temperatura y la eliminación del suero es independiente de caspasas. Su potencial de proliferación depende de los factores presentes en el suero, pero estos factores no son los mitógenos de la familia del FGF y del EGF. Del mismo modo, la supervivencia celular es también insensible a los factores secretados por los astrocitos. Hemos conseguido finalmente ese equilibrio con la adición de suero a la concentración del 0,5% en el medio mínimo N2. Si disminuimos el suero, las células adquieren una diferenciación morfológica más evidente, pero su supervivencia es muy pobre. En cambio si aumentamos la proporción de suero, las células viven mucho más

tiempo pero se hace imposible promover su diferenciación. Otros trabajos utilizan de la misma forma medios con bajas concentraciones de suero para la diferenciación de líneas celulares (Rubio et al., 1999). Una vez optimizados los parámetros de supervivencia en condiciones favorables a la diferenciación hemos proseguido con el desarrollo de un protocolo específico de diferenciación GABAérgica.

La adición del RA en nuestros cultivos nos produce dos efectos evidentes. En primer lugar, aumenta sensiblemente el número de células en cultivo, mediante la inhibición de la muerte celular. En segundo lugar nos promueve la adquisición de un fenotipo neuronal maduro. Estos resultados están de acuerdo con los efectos descritos del RA en cultivos de diferentes tipos de células madre. Se ha visto como el RA promueve la supervivencia de los progenitores neuronales (Henion y Weston 1994; Kornyei et al., 1998), probablemente mediante la activación de proteínas antiapoptóticas tales como el Bcl-2 (Daadi et al., 2001; Hanada et al., 1993).

El RA, asimismo, ha sido descrito como un potente inductor de la diferenciación hacia fenotipo neuronal en múltiples líneas celulares: células pluripotentes como las ESC (Bain et al., 1996; Bibel et al., 2004; Dinsmore et al., 1996; Okada et al., 2004) o las ECC (Bain et al., 1996; Jones-Villeneuve et al., 1982), o células multipotentes como las NSC (Palmer et al., 1997; Takahashi et al., 1999), líneas de neuroblastoma (Encinas et al., 2000) o células madre hematopoyéticas (Jang et al., 2004). En nuestro tratamiento con RA durante 5 días observamos un claro incremento de la expresión de NeuN, un marcador neuronal maduro. Del mismo modo, se ha descrito como el tratamiento con RA de progenitores neuronales derivados de embriones de ratón en el estadio embrionario E9 incrementan la expresión de NeuN a partir del quinto día en cultivo (Herberth et al., 2002). Se sabe que los retinoides juegan un papel muy importante en el desarrollo temprano del sistema nervioso (Maden y Holder 1991; Ross et al., 2000), aunque también podrían ser importantes para el desarrollo más avanzado del telencéfalo, o incluso en la etapa adulta (Zetterstrom et al., 1999). En concreto, se ha establecido una estrecha relación entre los retinoides y el desarrollo específico del núcleo estriado (Toresson et al., 1999). Los receptores de los retinoides empiezan a expresarse en el núcleo estriado hacia E12.5 (Ruberte et al., 1993) y se ha visto como en cultivos primarios de la eminencia ganglionar lateral a E13.5 los retinoides favorecen la adquisición de las características propias de las neuronas estriatales (Toresson et al., 1999).

Sin embargo la adición de RA no es suficiente para fomentar la adquisición de características GABAérgicas en nuestras células de origen estriatal. Trabajos previos muestran el efecto de inducción neuronal del RA, pero describen la necesidad de tratamientos posteriores para conseguir la maduración hacia fenotipos concretos (Encinas et al., 2000; Takahashi et al., 1999). Se ha postulado que las células gliales pueden jugar un papel muy importante en la diferenciación de los precursores neuronales. Los astrocitos promueven la supervivencia y la diferenciación o maduración neuronal de las células madre (Hall et al., 2003; Song et al., 2002; Wagner et al., 1999a) y la glía radial de la eminencia ganglionar lateral se perfila como la fuente de retinoides que promovería el desarrollo de las neuronas estriatales (Toresson et al., 1999). A pesar de ello, en nuestros experimentos con medios condicionados o con cocultivos de astrocitos del núcleo estriado neonatal no conseguimos mejorar la supervivencia ni promover la diferenciación de las células ST14A. Esto nos sugiere que otros factores o parámetros deben ser necesarios para la maduración específica del fenotipo GABAérgico.

Las neurotrofinas son factores cuya implicación en la diferenciación GABAérgica también ha sido estudiada. Sin embargo parece que su acción sobre los progenitores neuronales depende en gran medida del estadio del desarrollo de esas células. Ventimiglia y colaboradores observaron como la adición de BDNF, NT-3 y NT4/5 promovía la supervivencia y la diferenciación de las neuronas estriatales de E17 hacia el fenotipo GABAérgico y positivo para calbindina (Ventimiglia et al., 1995). Otros trabajos han mostrado, por el contrario, como la exposición de cultivos primarios estriatales de E18-19 al BDNF no aumentan el número de células GABAérgicas pero sí estimulan la maduración de esas células GABAérgicas hacia fenotipos estriatales (positivas para marcadores como GAD, parvalbumina, calbindina) (Gavalda et al., 2004; Mizuno et al., 1994). Las células ST14A derivan de progenitores estriatales a E14 y aunque expresan los receptores para las neurotrofinas, tanto en condiciones proliferantes como favorables a la diferenciación (Cattaneo y Conti 1998), no responden a la acción de los factores tróficos en condiciones basales o después del tratamiento con RA. Del mismo modo, se ha visto que los precursores estriatales nestina-positivos de un cultivo primario estriatal (Gavalda et al., 2004) o hipocampal (Vicario-Abejon et al., 2000) no parecen responder a las neurotrofinas. En cambio, hemos observado como la

adición de BDNF a las células ST14A después del doble tratamiento con RA y KCl, cuando la célula ya ha sido diferenciada específicamente al fenotipo GABAérgico, sí es capaz de promover un evidente crecimiento neurítico. Este resultado concuerda con lo observado en cultivos primarios estriatales a E19 donde las neuronas GABAérgicas responden al BDNF incrementando su arborización dendrítica (Gavalda et al., 2004). De manera similar, el BDNF no aumenta el número total de neuronas GABAérgicas en cultivos de hipocampo pero sí es capaz de incrementar claramente su maduración y su arborización dendrítica y axonal (Yamada et al., 2002; Vicario-Abejon et al., 1998). Además, en la diferenciación de las ESC hacia fenotipo GABAérgico que describen Barberi y colaboradores, la acción de las neurotrofinas tiene lugar en la última etapa del proceso (Barberi et al., 2003). Estos datos nos sugieren que las neurotrofinas pueden ejercer su actividad en fases relativamente avanzadas del proceso de diferenciación, promoviendo la posterior maduración de las neuronas GABAérgicas.

Otro de los fenómenos que han sido implicados en la adquisición del fenotipo GABAérgico es la actividad sináptica. Por este motivo examinamos el efecto que tendría sobre las células ST14A una despolarización inducida por KCl. La adición de KCl (40 mM) provoca un profundo cambio en nuestras células, tanto a nivel morfológico como bioquímico. Se observa claramente un incremento del crecimiento neurítico, fenómeno que concuerda con datos de trabajos previos donde se ha implicado estrechamente la actividad neuronal con el desarrollo dendrítico (Wong y Ghosh 2002). La estimulación por KCl reduce drásticamente la tasa de proliferación a través de una entrada de calcio al interior de la célula. Existen datos contradictorios sobre los efectos anti- o pro-mitóticos de la actividad neuronal. Hay estudios que demuestran un claro efecto de inhibición de la proliferación después de una despolarización por KCl o glutamato en precursores neuronales (Antonopoulos et al., 1997; Cui y Bulleit 1998; Haydar et al., 2000; LoTurco et al., 1995; Pardo y Honegger 2000), mientras que otros observan un aumento de la tasa de proliferación (Borodinsky y Fiszman 1998; Haydar et al., 2000). Estas discrepancias pueden ser debidas a diferencias en el nivel de maduración (Haydar et al., 2000), puesto que se ha comprobado como los niveles extracelulares de  $K^+$  influyen de diferente forma en los precursores neuronales dependiendo de su estadio de desarrollo (Herberth et al., 2002). La adición de KCl también mejora la supervivencia del cultivo por inhibición de la muerte celular, como ocurre en los cultivos de neuronas granulares cerebelares, donde la presencia de

concentraciones despolarizantes de KCl es imprescindible para su supervivencia (Gallo et al., 1987).

Es interesante observar como el crecimiento neurítico y el efecto anti-mitótico se dan solamente en aquellas células tratadas previamente con RA. La exposición al RA no sólo incrementa la expresión del marcador neuronal NeuN sino que le confiere a la célula la capacidad de responder a la estimulación por KCl activando ciertos procesos internos que conducen a la formación de neuritas y a la detención del ciclo celular. Desconocemos, por el momento, la naturaleza de estos mecanismos intracelulares, aunque sabemos que puede estar implicada la señalización por calcio intracelular. Esto concuerda con varios trabajos en los que se ha estudiado el efecto de la despolarización y la entrada de calcio sobre la diferenciación de varios tipos de células neuronales (Spitzer et al., 2000) o no-neuronales (Berridge et al., 1998). En concreto, se ha descrito como la frecuencia de los picos de calcio podría codificar la adquisición del fenotipo GABAérgico en precursores estriatales de ratón (Ciccolini et al., 2003) o precursores de médula espinal de *Xenopus* (Gu y Spitzer 1995; Spitzer et al., 1993).

Nuestros resultados demuestran una estrecha relación entre la actividad sináptica y la inducción del fenotipo GABAérgico. La exposición de los cultivos a concentraciones despolarizantes de KCl promueve la adquisición de un fenotipo GABAérgico completo y funcional. El número de células GABAérgicas se incrementa hasta un 74% del total de células en cultivo, porcentaje muy similar al que se obtiene a partir de un cultivo primario del propio núcleo estriado (Gavalda et al., 2004; Mizuno et al., 1994). El fenotipo adquirido cumple con todos los parámetros que definen a una célula GABAérgica. Las células expresan GAD, el enzima sintetizador de GABA, contienen grandes cantidades de este neurotransmisor en su interior y expresan el enzima que lo empaqueta en vesículas, el v-GAT. Además, son capaces de recaptar GABA del medio y de liberarlo en respuesta a un estímulo despolarizante de una manera dependiente de calcio.

Una vez caracterizado el grado de diferenciación alcanzado por las células *in vitro* bajo el protocolo que habíamos desarrollado, proseguimos a examinar el grado de integración y la estabilidad de fenotipo que tendrían estas células *in vivo*, tras su trasplante en un cerebro de rata adulta. En numerosos trabajos se ha descrito como las

células madre transplantadas en cerebros en proceso de desarrollo muestran una gran capacidad de supervivencia y diferenciación, mientras que no ocurre lo mismo en el cerebro adulto. En huéspedes embrionarios o neonatales las células transplantadas adoptan fenotipos que dependen de su origen y del lugar de implante (Doering y Snyder 2000; Englund et al., 2002b; Lundberg et al., 2002; Snyder et al., 1992). Sin embargo, la capacidad de diferenciación neuronal es mucho más pobre en un entorno adulto, donde la mayor parte de las células permanecen en estado indiferenciado o desarrollan fenotipos gliales después de su trasplante en regiones no neurogénicas (Akerud et al., 2001; Fricker et al., 1999; Lundberg et al., 1997; Martínez-Serrano y Bjorklund 1997; Rubio et al., 2000; Snyder et al., 1997). El control sobre el fenotipo que adoptarán espontáneamente las células transplantadas es, por lo tanto, sumamente pobre después del trasplante en el cerebro adulto (Herrera et al., 1999; Rossi y Cattaneo 2002). El trasplante de células indiferenciadas con alto potencial proliferativo, como las ESC, conlleva, por otro lado, el riesgo de aparición de teratomas (Bjorklund et al., 2002; Olsson et al., 1997). Se ha demostrado, además, que el grado de recuperación funcional depende en mayor medida del número de células que mantengan el fenotipo adecuado *in vivo*, y no tanto del número total de células que sobrevivan (Brundin y Bjorklund 1998). Wang y colaboradores han comprobado la importancia del proceso de pre-diferenciación para la eficacia de la terapia celular en modelos de la enfermedad de Parkinson. Han observado que el trasplante de precursores mesencefálicos previamente diferenciados a fenotipo dopaminérgico son capaces de revertir los déficits motores del modelo de lesión por 6-hidroxidopamina, mientras que las mismas células sin diferenciar no logran ejercer ningún efecto terapéutico (Wang et al., 2004). Parece necesario, por lo tanto, un proceso previo de diferenciación *in vitro* de las células antes del trasplante para asegurar la eficacia de una terapia de sustitución celular (Bjorklund y Lindvall 2000; Donovan y Gearhart 2001; Rossi y Cattaneo 2002; Temple 2001).

Este proceso de diferenciación *in vitro* permite, además, la generación de una población homogénea de un solo tipo celular. En la enfermedad de Parkinson, por ejemplo, se estima que para lograr claros beneficios terapéuticos deberían transplantarse al menos 100 000 neuronas dopaminérgicas funcionales por Putamen (Hagell y Brundin 2001). Teniendo en cuenta que sólo un 5-10% de las células de los trasplantes de tejido fetal son dopaminérgicas (Lindvall et al., 2004), y que la supervivencia de estos trasplantes suele ser menor del 5-10% (Arenas 2002; Brundin et al., 2000), resulta que

el número de células totales a transplantar debería ser de alrededor de 10-40 millones. Es muy difícil, por lo tanto, llevar a cabo este tipo de trasplantes a partir de tejido extraído de fetos humanos. En cambio el uso de células madre y su diferenciación mediante protocolos estandarizados permitiría la generación de poblaciones celulares más homogéneas, reduciendo de esta forma el número total de células a transplantar. Eficiencias de más del 70% como las obtenidas en el presente trabajo para neuronas GABAérgicas, o las obtenidas por Wagner y colaboradores para neuronas dopaminérgicas (Wagner et al., 1999a) representan un grado de homogeneidad útil para la realización de trasplantes celulares.

Nuestros experimentos muestran como las células ST14A pre-diferenciadas siguiendo el procedimiento descrito mantienen de forma estable el fenotipo GABAérgico después de su trasplante en el cerebro adulto. No observamos en ningún caso la aparición de fenotipos gliales, contrariamente a lo descrito en los trasplantes de células ST14A indiferenciadas, donde la mayor parte de fenotipos detectados son de tipo glial (Cattaneo et al., 1994; Lundberg et al., 1997). Parecen gozar, además, de un buen grado de diferenciación e integración, como lo demuestra el desarrollo de una morfología madura con largos procesos neuríticos y la presencia de vesículas sinápticas en dichos procesos o alrededor de ellos.

Resulta por otro lado sorprendente que no se observen diferencias entre las células transplantadas en un núcleo estriado intacto respecto de uno lesionado, a diferencia de lo descrito en otros trabajos (Doering y Snyder 2000; Isacson et al., 1984). Un entorno lesionado ofrece un ambiente muy diferente al de un entorno intacto, por la secreción de factores tróficos, citoquinas, y por la presencia de astrocitos reactivos y microglía (Rossi y Cattaneo 2002; Snyder et al., 1997; Sotelo y Alvarado-Mallart 1991). Sin embargo, se sabe que cuanto más avanzado está el proceso de desarrollo de un progenitor, más restringido es su potencial y menos capacidad tienen de responder a señales exógenas (Edlund y Jessell 1999). Nuestras células transplantadas parecen tener, pues, un grado de diferenciación suficientemente restringido que las hace insensibles a las señales gliogénicas o neurogénicas de un entorno lesionado.

Uno de los principales problemas con el que nos hemos encontrado en el estudio de estas células *in vivo* ha sido la inactivación de la expresión del gen marcador de la EGFP. Hemos podido demostrar que las células siguen presentes en el cerebro más allá

de la desaparición de la EGFP mediante el marcaje alternativo con BrdU o mediante la detección de la EGFP por PCR. Sin embargo esto nos ha imposibilitado el examen minucioso de la morfología celular, la detección de contactos sinápticos o el análisis fenotípico más allá de los tres días *in vivo*. Este fenómeno de inactivación de genes marcadores ha sido observado también en otras líneas celulares, como la c17.2 o la RN33B, con marcadores distintos, como el LacZ o la luciferasa (Akerud et al., 2001; Martinez-Serrano y Bjorklund 1997; Snyder et al., 1992). En todos estos casos el gen marcador se expresa bajo un promotor de origen viral (Conti et al., 2001; Shimohama et al., 1989; Snyder et al., 1992), por lo que es posible que en el cerebro exista algún mecanismo de inactivación selectiva para este tipo de promotores víricos.

La presencia de proteínas sinápticas en las células transplantadas sugiere la posibilidad de que estas células sean funcionales y que reciban y establezcan contactos sinápticos con las células endógenas del huésped. Por este motivo comprobamos si el trasplante de estas células podría revertir las disfunciones motoras que tienen lugar en el modelo excitotóxico de la enfermedad de Huntington. Hemos observado como el trasplante de células GABAérgicas consigue evitar la aparición del comportamiento rotacional asimétrico causado por la lesión excitotóxica en algunos animales transplantados. Esto nos indica que, al menos en estos animales, las células GABAérgicas han restablecido la funcionalidad de los circuitos que integran los ganglios basales. Debido a la proximidad del *globus pallidus* con el núcleo estriado, es posible que las células transplantadas consigan secretar GABA en su diana correcta, que es el *globus pallidus*, tal y como ocurre en algunos de los trasplantes de células fetales realizados en modelos animales (Bjorklund y Lindvall 2000; Dunnett 1995; Nakao et al., 1999). En trasplantes de células estriatales fetales se ha correlacionado la reversión de los déficits de un modelo de lesión excitotóxica con la restitución de los contenidos estriatales de GABA (Campbell et al., 1993). Los trasplantes de tejido estriatal fetal también son capaces de restituir los contenidos de GABA en el *globus pallidus* (Sirinathsinghji et al., 1988). Es posible que la secreción de GABA por parte de nuestras células transplantadas tenga lugar de forma regulada en respuesta a la administración de agonistas dopaminérgicos, del mismo modo que ocurre en los trasplantes fetales (Sirinathsinghji et al., 1988), puesto que se ha visto que las células ST14A, al menos en cultivo, expresan receptores funcionales de dopamina (Ehrlich et al., 2001).

Otra explicación para las mejoras conductuales observadas podría ser la liberación de factores tróficos por parte de las células transplantadas, tal como ha sido descrito en varios trabajos (Levivier et al., 1995; Lopez-Martin et al., 1999; Lu et al., 2003; Mattsson et al., 1997; Toledo-Aral et al., 2003). Las células ST14A expresan el RNA mensajero de algunos factores como el BDNF, el NT-3 o el bFGF (Cattaneo y Conti 1998), aunque ignoramos si lo continúan haciendo después del trasplante. En los casos donde hemos observado una recuperación funcional, pues, no sabemos con total certeza si es resultado del efecto protector de estos factores o si es verdaderamente debido al establecimiento de contactos sinápticos y a la secreción local de GABA.

Aún existen muchos parámetros a mejorar en los trasplantes de células pre-diferenciadas. Uno de ellos es la supervivencia de las células después del trasplante. Aunque las células pre-diferenciadas mediante el tratamiento secuencial muestran una mejor supervivencia que las tratadas en condiciones basales, no conseguimos detectar más del 10% de las células transplantadas. Este grado de supervivencia es similar a los obtenidos en trasplantes celulares de tejido fetal (Arenas 2002; Brundin et al., 2000). Sin embargo, debido a la inactivación de la expresión de la EGFP, no sabemos con seguridad cuántas células han muerto y cuántas han perdido el marcador. Las causas de esta posible muerte se hallan en las condiciones que se encuentran las células en su nuevo entorno: hipoxia e hipoglucemia, privación de factores tróficos, daño traumático y altos niveles de radicales libres y excitotoxinas (Brundin et al., 2000). Se han ensayado diversas estrategias para mejorar la supervivencia de los trasplantes celulares, como la manipulación genética de las células donantes para la sobreexpresión de genes protectores (Brundin et al., 2000), como el Bcl-x<sub>L</sub> (Liste et al., 2004; Shim et al., 2004) o a la previa exposición en cultivo a agentes neuroprotectores o antiapoptóticos (Schierle et al., 1999).

Otro parámetro a mejorar es la reconstrucción de las conexiones sinápticas correctas. El sistema nervioso central adulto presenta mecanismos de inhibición del crecimiento axonal originados principalmente por moléculas presentes en la membrana de los oligodendrocitos o expresados por los astrocitos reactivos (Qiu et al., 2000). La supresión de este entorno inhibitorio mediante la degradación selectiva de las moléculas responsables (Moon et al., 2001) podría facilitar el envío de los axones de las células implantadas hacia las dianas correctas, en este caso el *globus pallidus*.

Dado que el núcleo estriado forma parte esencial de los circuitos que controlan el movimiento, es evidente que para lograr el éxito de una terapia celular para la enfermedad de Huntington es necesario plantearse la reconstrucción, al menos parcial, de estos circuitos neurales. Sin embargo, la generación de neuronas con un fenotipo GABAérgico que sea mantenido de forma estable después del trasplante puede ser de gran utilidad en diferentes casos. Aparte de la enfermedad de Huntington, el trasplante de células GABAérgicas puede encontrar también su aplicación en otras situaciones en donde la inhibición local de poblaciones concretas de neuronas comporte beneficios terapéuticos. Este puede ser el caso de la enfermedad de Parkinson, donde la secreción de GABA en el núcleo subtalámico podría proporcionar mejoras funcionales, tal y como se ha visto en modelos animales (During et al., 2001) y como se persigue con la implantación de electrodos de estimulación profunda. También sería posible la inhibición de los procesos de sobreactivación que tienen lugar en los casos de epilepsia mediante la secreción local de GABA (Bjorklund y Lindvall 2000).

En la actualidad, hay muchas esperanzas puestas en las células madre. Los pacientes, los medios de comunicación, los políticos, la sociedad en general observan con detenimiento el avance de la ciencia y la medicina en este campo. ¿Es realmente fundada esta expectación? ¿Es realista esperar que las células madre vayan a ser capaces de curar todas estas enfermedades? En estos momentos tenemos evidencias significativas de que a corto-medio plazo será posible disponer de nuevas terapias celulares para algunas patologías. Sin embargo, para otras enfermedades, las aplicaciones terapéuticas se vislumbran tan sólo a muy largo plazo. En realidad ya hace bastantes años que la medicina está aplicando con éxito terapias celulares basadas en el trasplante de células madre. Es el caso del sistema hematopoyético, donde se conocen muy bien sus células madre y su capacidad de regeneración del sistema sanguíneo, y que se utilizan eficazmente para el tratamiento de enfermedades como las leucemias (Siminovitch et al., 1963; Till y McCulloch 1961). Actualmente también se están iniciando ensayos clínicos para la reparación de cicatrices, fístulas o tejido óseo mediante el implante de células madre o progenitores.

Hoy en día disponemos de suficientes datos científicos sobre el potencial que poseen las células madre y sobre nuestra capacidad de controlar el destino fenotípico de estas células, como los aportados en la presente tesis, para suponer razonablemente que,

no muy a largo plazo, podamos generar eficientemente células de un determinado fenotipo para reemplazar poblaciones celulares muy específicas. Cuanto más restringida y concreta sea la población de células a reemplazar, tanto por su fenotipo como por su localización y función, más expectativas de éxito tiene una terapia de este tipo. Enfermedades como la diabetes, las cardiomiopatías, o la enfermedad de Parkinson podrían tener pronto nuevos tratamientos basados en terapias celulares. Las terapias de neuroprotección con células como vehículos de administración podrían también ver su aplicación clínica a medio plazo. En cambio, para las enfermedades neurodegenerativas donde sea necesaria una reconstrucción de circuitos más compleja, no disponemos hoy en día de claras evidencias científicas que nos indiquen la posibilidad de desarrollar terapias celulares de forma inmediata. Aunque existen buenos indicios de reconstrucción de circuitos en los trasplantes de tejido fetal (Lindvall et al., 2004; Peschanski et al., 2004) aún queda mucha investigación básica sobre el propio desarrollo del sistema nervioso, y son necesarios aún muchos ensayos en modelos experimentales para empezar a diseñar complicadas ingenierías de reparación de circuitos neurales. Parece prematuro, por lo tanto, hablar de terapias celulares basadas en las células madre para enfermedades como la de Alzheimer o los infartos cerebrales.

Queda, por lo tanto, mucho camino por recorrer hasta que las investigaciones den sus frutos y se traduzcan en tratamientos reales para los pacientes. No se deben dar falsas expectativas y los avances médicos deben apoyarse en conocimientos científicos sólidos. Tampoco debemos, asimismo, interrumpir ni retrasar las investigaciones. Debe hacerse un análisis en paralelo a estas investigaciones en cuanto a las implicaciones éticas de sus métodos o resultados, basándose en datos científicos y en el sentido común más humanista posible. La investigación básica y biomédica sobre las células madre y sus aplicaciones está aún en los inicios de lo que promete ser una aventura larga y difícil, pero enormemente emocionante.



## **VI. CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

1. El ácido retinoico promueve la supervivencia de las células madre neurales en cultivo e induce un fenotipo neuronal.
2. La inducción de la actividad sináptica mediante despolarización por KCl promueve la diferenciación hacia un fenotipo neuronal GABAérgico maduro y funcional, en un alto porcentaje de las células en cultivo.
3. La homeostasis del calcio está implicada en el proceso de diferenciación neuronal.
4. Las células pre-diferenciadas *in vitro* hacia fenotipo GABAérgico sobreviven a largo plazo tras su trasplante en un modelo excitotóxico de la enfermedad de Huntington.
5. Las células pre-diferenciadas mantienen su fenotipo neuronal GABAérgico después de su trasplante en el núcleo estriado
6. Las células pre-diferenciadas muestran una buena integración *in vivo*, donde elaboran procesos neuríticos asociados a posibles contactos post-sinápticos y pre-sinápticos de naturaleza GABAérgica.



## **VII. BIBLIOGRAFÍA**



**BIBLIOGRAFÍA**

**A**

- Abercrombie, M. (1946) Estimation of nuclear populations from microtome sections. *Anat.Rec.* **94**, 239-247.
- Aberg M. A., Aberg N. D., Hedbacker H., Oscarsson J., and Eriksson P. S. (2000) Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* **20**, 2896-2903.
- Aboody K. S., Brown A., Rainov N. G., Bower K. A., Liu S., Yang W., Small J. E., Herrlinger U., Ourednik V., Black P. M., Breakefield X. O., and Snyder E. Y. (2000) Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 12846-12851.
- Akerud P., Canals J. M., Snyder E. Y., and Arenas E. (2001) Neuroprotection through delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor by neural stem cells in a mouse model of Parkinson's disease. *J Neurosci* **21**, 8108-8118.
- Akerud P., Holm P. C., Castelo-Branco G., Sousa K., Rodriguez F. J., and Arenas E. (2002) Persephin-overexpressing neural stem cells regulate the function of nigral dopaminergic neurons and prevent their degeneration in a model of Parkinson's disease. *Mol Cell Neurosci* **21**, 205-222.
- Alberch J., Perez-Navarro E., and Canals J. M. (2002) Neuroprotection by neurotrophins and GDNF family members in the excitotoxic model of Huntington's disease. *Brain Res Bull* **57**, 817-822.
- Alberch J., Perez-Navarro E., and Canals J. M. (2004) Neurotrophic factors in Huntington's disease. *Prog Brain Res* **146**, 195-229.
- Altman J. (1962) Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* **135**, 1127-1128.
- Alvarez-Buylla A., Seri B., and Doetsch F. (2002) Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. *Brain Res Bull* **57**, 751-758.

- Alvarez-Dolado M., Pardal R., Garcia-Verdugo J. M., Fike J. R., Lee H. O., Pfeffer K., Lois C., Morrison S. J., and Alvarez-Buylla A. (2003) Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* **425**, 968-973.
- Anderson S. A., Qiu M., Bulfone A., Eisenstat D. D., Meneses J., Pedersen R., and Rubenstein J. L. (1997) Mutations of the homeobox genes *Dlx-1* and *Dlx-2* disrupt the striatal subventricular zone and differentiation of late born striatal neurons. *Neuron* **19**, 27-37.
- Anton R., Kordower J. H., Maidment N. T., Manaster J. S., Kane D. J., Rabizadeh S., Schueller S. B., Yang J., Rabizadeh S., Edwards R. H., and . (1994) Neural-targeted gene therapy for rodent and primate hemiparkinsonism. *Exp Neurol* **127**, 207-218.
- Antonopoulos J., Pappas I. S., and Parnavelas J. G. (1997) Activation of the GABAA receptor inhibits the proliferative effects of bFGF in cortical progenitor cells. *Eur J Neurosci* **9**, 291-298.
- Arber S., Han B., Mendelsohn M., Smith M., Jessell T. M., and Sockanathan S. (1999) Requirement for the homeobox gene *Hb9* in the consolidation of motor neuron identity. *Neuron* **23**, 659-674.
- Arenas E. (2002) Stem cells in the treatment of Parkinson's disease. *Brain Res Bull* **57**, 795-808.
- Arvidsson A., Collin T., Kirik D., Kokaia Z., and Lindvall O. (2002) Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* **8**, 963-970.

## **B**

---

- Bachoud-Levi A., Bourdet C., Brugieres P., Nguyen J. P., Grandmougin T., Haddad B., Jeny R., Bartolomeo P., Boisse M. F., Barba G. D., Degos J. D., Ergis A. M., Lefaucheur J. P., Lisovoski F., Pailhous E., Remy P., Palfi S., Defér G. L., Cesaro P., Hantraye P., and Peschanski M. (2000a) Safety and tolerability assessment of intrastriatal neural allografts in five patients with Huntington's disease. *Exp Neurol* **161**, 194-202.

- Bachoud-Levi A. C., Remy P., Nguyen J. P., Brugieres P., Lefaucheur J. P., Bourdet C., Baudic S., Gaura V., Maison P., Haddad B., Boisse M. F., Grandmougin T., Jeny R., Bartolomeo P., Dalla B. G., Degos J. D., Lisovoski F., Ergis A. M., Pailhous E., Cesaro P., Hantraye P., and Peschanski M. (2000b) Motor and cognitive improvements in patients with Huntington's disease after neural transplantation. *Lancet* **356**, 1975-1979.
- Bachoud-Levi A. C., Deglon N., Nguyen J. P., Bloch J., Bourdet C., Winkel L., Remy P., Goddard M., Lefaucheur J. P., Brugieres P., Baudic S., Cesaro P., Peschanski M., and Aebischer P. (2000c) Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease using a polymer encapsulated BHK cell line engineered to secrete human CNTF. *Hum Gene Ther* **11**, 1723-1729.
- Bain G., Ray W. J., Yao M., and Gottlieb D. I. (1996) Retinoic acid promotes neural and represses mesodermal gene expression in mouse embryonic stem cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* **223**, 691-694.
- Barberi T., Klivenyi P., Calingasan N. Y., Lee H., Kawamata H., Loonam K., Perrier A. L., Bruses J., Rubio M. E., Topf N., Tabar V., Harrison N. L., Beal M. F., Moore M. A., and Studer L. (2003) Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice. *Nat Biotechnol* **21**, 1200-1207.
- Barresi V., Belluardo N., Sipione S., Mudo G., Cattaneo E., and Condorelli D. F. (2003) Transplantation of prodrug-converting neural progenitor cells for brain tumor therapy. *Cancer Gene Ther* **10**, 396-402.
- Bartlett P. F., Reid H. H., Bailey K. A., and Bernard O. (1988) immortalization of mouse neural precursor cells by the c-myc oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 3255-3259.
- Beal M. F., Kowall N. W., Ellison D. W., Mazurek M. F., Swartz K. J., and Martin J. B. (1986) Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature* **321**, 168-171.
- Beal M. F., Ferrante R. J., Swartz K. J., and Kowall N. W. (1991) Chronic quinolinic acid lesions in rats closely resemble Huntington's disease. *J Neurosci* **11**, 1649-1659.
- Beal M. F. (1995) Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann Neurol* **38**, 357-366.

- Belhage B., Hansen G. H., and Schousboe A. (1993) Depolarization by K<sup>+</sup> and glutamate activates different neurotransmitter release mechanisms in GABAergic neurons: vesicular versus non-vesicular release of GABA. *Neuroscience* **54**, 1019-1034.
- Benedetti S., Pirola B., Pollo B., Magrassi L., Bruzzone M. G., Rigamonti D., Galli R., Selleri S., Di Meco F., De Fraja C., Vescovi A., Cattaneo E., and Finocchiaro G. (2000) Gene therapy of experimental brain tumors using neural progenitor cells. *Nat Med* **6**, 447-450.
- Benraiss A., Chmielnicki E., Lerner K., Roh D., and Goldman S. A. (2001) Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain. *J Neurosci* **21**, 6718-6731.
- Berridge M. J., Bootman M. D., and Lipp P. (1998) Calcium--a life and death signal. *Nature* **395**, 645-648.
- Bibel M., Richter J., Schrenk K., Tucker K. L., Staiger V., Korte M., Goetz M., and Barde Y. A. (2004) Differentiation of mouse embryonic stem cells into a defined neuronal lineage. *Nat Neurosci* **7**, 1003-1009.
- Bjorklund A. and Lindvall O. (2000) Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat Neurosci* **3**, 537-544.
- Bjorklund L. M., Sanchez-Pernaute R., Chung S., Andersson T., Chen I. Y., McNaught K. S., Brownell A. L., Jenkins B. G., Wahlestedt C., Kim K. S., and Isacson O. (2002) Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 2344-2349.
- Bjornson C. R., Rietze R. L., Reynolds B. A., Magli M. C., and Vescovi A. L. (1999) Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* **283**, 534-537.
- Borlongan C. V., Koutouzis T. K., Randall T. S., Freeman T. B., Cahill D. W., and Sanberg P. R. (1995) Systemic 3-nitropropionic acid: behavioral deficits and striatal damage in adult rats. *Brain Res Bull* **36**, 549-556.
- Borodinsky L. N. and Fiszman M. L. (1998) Extracellular potassium concentration regulates proliferation of immature cerebellar granule cells. *Brain Res Dev Brain Res* **107**, 43-48.

- Brasted P. J., Watts C., Robbins T. W., and Dunnett S. B. (1999) Associative plasticity in striatal transplants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10524-10529.
- Brazelton T. R., Rossi F. M., Keshet G. I., and Blau H. M. (2000) From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* **290**, 1775-1779.
- Brouillet E., Conde F., Beal M. F., and Hantraye P. (1999) Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Prog Neurobiol* **59**, 427-468.
- Brundin P. and Bjorklund A. (1998) Survival of expanded dopaminergic precursors is critical for clinical trials. *Nat Neurosci* **1**, 537.
- Brundin P., Karlsson J., Emgard M., Schierle G. S., Hansson O., Petersen A., and Castilho R. F. (2000) Improving the survival of grafted dopaminergic neurons: a review over current approaches. *Cell Transplant* **9**, 179-195.
- Brustle O., Jones K. N., Learish R. D., Karram K., Choudhary K., Wiestler O. D., Duncan I. D., and McKay R. D. (1999) Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science* **285**, 754-756.

## **C**

---

- Cameron H. A. and McKay R. (1998) Stem cells and neurogenesis in the adult brain. *Curr Opin Neurobiol* **8**, 677-680.
- Cameron H. A. and McKay R. D. (1999) Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nat Neurosci* **2**, 894-897.
- Campbell K., Kalen P., Victorin K., Lundberg C., Mandel R. J., and Bjorklund A. (1993) Characterization of GABA release from intrastriatal striatal transplants: dependence on host-derived afferents. *Neuroscience* **53**, 403-415.
- Campbell K. (2003) Dorsal-ventral patterning in the mammalian telencephalon. *Curr Opin Neurobiol* **13**, 50-56.

- Canals J. M., Pineda J. R., Torres-Peraza J. F., Bosch M., Martin-Ibanez R., Munoz M. T., Mengod G., Ernfors P., and Alberch J. (2004) Brain-derived neurotrophic factor regulates the onset and severity of motor dysfunction associated with enkephalinergic neuronal degeneration in Huntington's disease. *J Neurosci* **24**, 7727-7739.
- Carlsson A. (1993) Thirty years of dopamine research. *Adv Neurol* **60**, 1-10.
- Carpenter M. K., Cui X., Hu Z. Y., Jackson J., Sherman S., Seiger A., and Wahlberg L. U. (1999) In vitro expansion of a multipotent population of human neural progenitor cells. *Exp Neurol* **158**, 265-278.
- Carvey P. M., Ling Z. D., Sortwell C. E., Pitzer M. R., McGuire S. O., Storch A., and Collier T. J. (2001) A clonal line of mesencephalic progenitor cells converted to dopamine neurons by hematopoietic cytokines: a source of cells for transplantation in Parkinson's disease. *Exp Neurol* **171**, 98-108.
- Castelo-Branco G., Wagner J., Rodriguez F. J., Kele J., Sousa K., Rawal N., Pasolli H. A., Fuchs E., Kitajewski J., and Arenas E. (2003) Differential regulation of midbrain dopaminergic neuron development by Wnt-1, Wnt-3a, and Wnt-5a. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12747-12752.
- Cattaneo E., Magrassi L., Butti G., Santi L., Giavazzi A., and Pezzotta S. (1994) A short term analysis of the behaviour of conditionally immortalized neuronal progenitors and primary neuroepithelial cells implanted into the fetal rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* **83**, 197-208.
- Cattaneo E., De Fraja C., Conti L., Reinach B., Bolis L., Govoni S., and Liboi E. (1996) Activation of the JAK/STAT pathway leads to proliferation of ST14A central nervous system progenitor cells. *J Biol Chem* **271**, 23374-23379.
- Cattaneo E. and Conti L. (1998) Generation and characterization of embryonic striatal conditionally immortalized ST14A cells. *J Neurosci Res* **53**, 223-234.
- Cattaneo E., Rigamonti D., Goffredo D., Zuccato C., Squitieri F., and Sipione S. (2001) Loss of normal huntingtin function: new developments in Huntington's disease research. *Trends Neurosci* **24**, 182-188.
- Cha J. H. (2000) Transcriptional dysregulation in Huntington's disease. *Trends Neurosci* **23**, 387-392.

- Chang C. W., Tsai C. W., Wang H. F., Tsai H. C., Chen H. Y., Tsai T. F., Takahashi H., Li H. Y., Fann M. J., Yang C. W., Hayashizaki Y., Saito T., and Liu F. C. (2004) Identification of a developmentally regulated striatum-enriched zinc-finger gene, *Nolz-1*, in the mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2613-2618.
- Chen G. J., Jeng C. H., Lin S. Z., Tsai S. H., Wang Y., and Chiang Y. H. (2002) Fetal striatal transplants restore electrophysiological sensitivity to dopamine in the lesioned striatum of rats with experimental Huntington's disease. *J Biomed Sci* **9**, 303-310.
- Chen K. S. and Gage F. H. (1995) Somatic gene transfer of NGF to the aged brain: behavioral and morphological amelioration. *J Neurosci* **15**, 2819-2825.
- Chiba S., Iwasaki Y., Sekino H., and Suzuki N. (2003) Transplantation of motoneuron-enriched neural cells derived from mouse embryonic stem cells improves motor function of hemiplegic mice. *Cell Transplant* **12**, 457-468.
- Chmielnicki E., Benraiss A., Economides A. N., and Goldman S. A. (2004) Adenovirally expressed noggin and brain-derived neurotrophic factor cooperate to induce new medium spiny neurons from resident progenitor cells in the adult striatal ventricular zone. *J Neurosci* **24**, 2133-2142.
- Chung S., Sonntag K. C., Andersson T., Bjorklund L. M., Park J. J., Kim D. W., Kang U. J., Isacson O., and Kim K. S. (2002) Genetic engineering of mouse embryonic stem cells by *Nurr1* enhances differentiation and maturation into dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci* **16**, 1829-1838.
- Ciccolini F., Collins T. J., Sudhoelter J., Lipp P., Berridge M. J., and Bootman M. D. (2003) Local and global spontaneous calcium events regulate neurite outgrowth and onset of GABAergic phenotype during neural precursor differentiation. *J Neurosci* **23**, 103-111.
- Clarke D. L., Johansson C. B., Wilbertz J., Veress B., Nilsson E., Karlstrom H., Lendahl U., and Frisen J. (2000) Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* **288**, 1660-1663.
- Conti L., Sipione S., Magrassi L., Bonfanti L., Rigamonti D., Pettirossi V., Peschanski M., Haddad B., Pelicci P., Milanesi G., Pelicci G., and Cattaneo E. (2001) Shc signaling in differentiating neural progenitor cells. *Nat Neurosci* **4**, 579-586.

- Corti O., Horellou P., Colin P., Cattaneo E., and Mallet J. (1996) Intracerebral tetracycline-dependent regulation of gene expression in grafts of neural precursors. *Neuroreport* **7**, 1655-1659.
- Coyle J. T. and Schwarcz R. (1976) Lesion of striatal neurones with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. *Nature* **263**, 244-246.
- Craig C. G., Tropepe V., Morshead C. M., Reynolds B. A., Weiss S., and van der K. D. (1996) In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *J Neurosci* **16**, 2649-2658.
- Cui H. and Bulleit R. F. (1998) Potassium chloride inhibits proliferation of cerebellar granule neuron progenitors. *Brain Res Dev Brain Res* **106**, 129-135.
- Curtis M. A., Penney E. B., Pearson A. G., Roon-Mom W. M., Butterworth N. J., Dragunow M., Connor B., and Faull R. L. (2003) Increased cell proliferation and neurogenesis in the adult human Huntington's disease brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9023-9027.

## **D**

---

- Daadi M. M. and Weiss S. (1999) Generation of tyrosine hydroxylase-producing neurons from precursors of the embryonic and adult forebrain. *J Neurosci* **19**, 4484-4497.
- Daadi M. M., Saporta S., Willing A. E., Zigova T., McGrogan M. P., and Sanberg P. R. (2001) In vitro induction and in vivo expression of bcl-2 in the hNT neurons. *Brain Res Bull* **56**, 147-152.
- Deckel A. W., Robinson R. G., Coyle J. T., and Sanberg P. R. (1983) Reversal of long-term locomotor abnormalities in the kainic acid model of Huntington's disease by day 18 fetal striatal implants. *Eur J Pharmacol* **93**, 287-288.
- Deng W., Obrocka M., Fischer I., and Prockop D. J. (2001) In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem Biophys Res Commun* **282**, 148-152.
- DiFiglia M. (1990) Excitotoxic injury of the neostriatum: a model for Huntington's disease. *Trends Neurosci* **13**, 286-289.

- Dinsmore J., Ratliff J., Deacon T., Pakzaban P., Jacoby D., Galpern W., and Isacson O. (1996) Embryonic stem cells differentiated in vitro as a novel source of cells for transplantation. *Cell Transplant* **5**, 131-143.
- Doering L. C. and Snyder E. Y. (2000) Cholinergic expression by a neural stem cell line grafted to the adult medial septum/diagonal band complex. *J Neurosci Res* **61**, 597-604.
- Doetsch F., Garcia-Verdugo J. M., and Alvarez-Buylla A. (1997) Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* **17**, 5046-5061.
- Donovan P. J. and Gearhart J. (2001) The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature* **414**, 92-97.
- Draper J. S., Smith K., Gokhale P., Moore H. D., Maltby E., Johnson J., Meisner L., Zwaka T. P., Thomson J. A., and Andrews P. W. (2004) Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* **22**, 53-54.
- Du X., Stull N. D., and Iacovitti L. (1994) Novel expression of the tyrosine hydroxylase gene requires both acidic fibroblast growth factor and an activator. *J Neurosci* **14**, 7688-7694.
- Duman R. S., Malberg J., and Thome J. (1999) Neural plasticity to stress and antidepressant treatment. *Biol Psychiatry* **46**, 1181-1191.
- Dunnett S. B. (1995) Functional repair of striatal systems by neural transplants: evidence for circuit reconstruction. *Behav Brain Res* **66**, 133-142.
- Dunnett S. B., Nathwani F., and Bjorklund A. (2000) The integration and function of striatal grafts. *Prog Brain Res* **127**, 345-380.
- During M. J., Kaplitt M. G., Stern M. B., and Eidelberg D. (2001) Subthalamic GAD gene transfer in Parkinson disease patients who are candidates for deep brain stimulation. *Hum Gene Ther* **12**, 1589-1591.
- Duyao M. P., Auerbach A. B., Ryan A., Persichetti F., Barnes G. T., McNeil S. M., Ge P., Vonsattel J. P., Gusella J. F., Joyner A. L., and . (1995) Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. *Science* **269**, 407-410.

**E**

---

- Eklund T. and Jessell T. M. (1999) Progression from extrinsic to intrinsic signaling in cell fate specification: a view from the nervous system. *Cell* **96**, 211-224.
- Ehrlich M. E., Conti L., Toselli M., Taglietti L., Fiorillo E., Taglietti V., Ivkovic S., Guinea B., Tranberg A., Sipione S., Rigamonti D., and Cattaneo E. (2001) ST14A cells have properties of a medium-size spiny neuron. *Exp Neurol* **167**, 215-226.
- Ekdahl C. T., Mohapel P., Weber E., Bahr B., Blomgren K., and Lindvall O. (2002) Caspase-mediated death of newly formed neurons in the adult rat dentate gyrus following status epilepticus. *Eur J Neurosci* **16**, 1463-1471.
- Ekdahl C. T., Claassen J. H., Bonde S., Kokaia Z., and Lindvall O. (2003) Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13632-13637.
- Emerich D. F., Lindner M. D., Winn S. R., Chen E. Y., Frydel B. R., and Kordower J. H. (1996) Implants of encapsulated human CNTF-producing fibroblasts prevent behavioral deficits and striatal degeneration in a rodent model of Huntington's disease. *J Neurosci* **16**, 5168-5181.
- Emerich D. F., Cain C. K., Greco C., Saydoff J. A., Hu Z. Y., Liu H., and Lindner M. D. (1997a) Cellular delivery of human CNTF prevents motor and cognitive dysfunction in a rodent model of Huntington's disease. *Cell Transplant* **6**, 249-266.
- Emerich D. F., Winn S. R., Hantraye P. M., Peschanski M., Chen E. Y., Chu Y., McDermott P., Baetge E. E., and Kordower J. H. (1997b) Protective effect of encapsulated cells producing neurotrophic factor CNTF in a monkey model of Huntington's disease. *Nature* **386**, 395-399.
- Encinas M., Iglesias M., Liu Y., Wang H., Muhaisen A., Cena V., Gallego C., and Comella J. X. (2000) Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J Neurochem* **75**, 991-1003.
- Englund U., Fricker-Gates R. A., Lundberg C., Bjorklund A., and Wictorin K. (2002a) Transplantation of human neural progenitor cells into the neonatal rat brain: extensive migration and differentiation with long-distance axonal projections. *Exp Neurol* **173**, 1-21.

Englund U., Bjorklund A., and Wictorin K. (2002b) Migration patterns and phenotypic differentiation of long-term expanded human neural progenitor cells after transplantation into the adult rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* **134**, 123-141.

Eriksson P. S., Perfilieva E., Bjork-Eriksson T., Alborn A. M., Nordborg C., Peterson D. A., and Gage F. H. (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* **4**, 1313-1317.

Evans M. J. and Kaufman M. H. (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154-156.

## **F**

---

Fallon J., Reid S., Kinyamu R., Opole I., Opole R., Baratta J., Korc M., Endo T. L., Duong A., Nguyen G., Karkehabadhi M., Twardzik D., Patel S., and Loughlin S. (2000) In vivo induction of massive proliferation, directed migration, and differentiation of neural cells in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 14686-14691.

Ferrari G., Cusella-De Angelis G., Coletta M., Paolucci E., Stornaiuolo A., Cossu G., and Mavilio F. (1998) Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* **279**, 1528-1530.

Ferrer I., Goutan E., Marin C., Rey M. J., and Ribalta T. (2000) Brain-derived neurotrophic factor in Huntington disease. *Brain Res* **866**, 257-261.

Frederiksen K., Jat P. S., Valtz N., Levy D., and McKay R. (1988) Immortalization of precursor cells from the mammalian CNS. *Neuron* **1**, 439-448.

Freeman T. B., Cicchetti F., Hauser R. A., Deacon T. W., Li X. J., Hersch S. M., Nauert G. M., Sanberg P. R., Kordower J. H., Saporta S., and Isacson O. (2000) Transplanted fetal striatum in Huntington's disease: phenotypic development and lack of pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13877-13882.

Fricker R. A., Carpenter M. K., Winkler C., Greco C., Gates M. A., and Bjorklund A. (1999) Site-specific migration and neuronal differentiation of human neural progenitor cells after transplantation in the adult rat brain. *J Neurosci* **19**, 5990-6005.

Frielingsdorf H., Schwarz K., Brundin P., and Mohapel P. (2004) No evidence for new dopaminergic neurons in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 10177-10182.

Frim D. M., Uhler T. A., Short M. P., Ezzedine Z. D., Klagsbrun M., Breakefield X. O., and Isacson O. (1993) Effects of biologically delivered NGF, BDNF and bFGF on striatal excitotoxic lesions. *Neuroreport* **4**, 367-370.

Fusco F. R., Chen Q., Lamoreaux W. J., Figueredo-Cardenas G., Jiao Y., Coffman J. A., Surmeier D. J., Honig M. G., Carlock L. R., and Reiner A. (1999) Cellular localization of huntingtin in striatal and cortical neurons in rats: lack of correlation with neuronal vulnerability in Huntington's disease. *J Neurosci* **19**, 1189-1202.

## **G**

---

Gage F. H., Ray J., and Fisher L. J. (1995) Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. *Annu Rev Neurosci* **18**, 159-192.

Gage F. H. (2000) Mammalian neural stem cells. *Science* **287**, 1433-1438.

Gallo V., Kingsbury A., Balazs R., and Jorgensen O. S. (1987) The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J Neurosci* **7**, 2203-2213.

Gaura V., Bachoud-Levi A. C., Ribeiro M. J., Nguyen J. P., Frouin V., Baudic S., Brugieres P., Mangin J. F., Boisse M. F., Palfi S., Cesaro P., Samson Y., Hantraye P., Peschanski M., and Remy P. (2004) Striatal neural grafting improves cortical metabolism in Huntington's disease patients. *Brain* **127**, 65-72.

Gauthier L. R., Charrin B. C., Borrell-Pages M., Dompierre J. P., Rangone H., Cordelieres F. P., De Mey J., MacDonald M. E., Lessmann V., Humbert S., and Saudou F. (2004) Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell* **118**, 127-138.

Gavalda N., Perez-Navarro E., Gratacos E., Comella J. X., and Alberch J. (2004) Differential involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and p42/p44 mitogen activated protein kinase pathways in brain-derived neurotrophic factor-induced trophic effects on cultured striatal neurons. *Mol Cell Neurosci* **25**, 460-468.

- Gerfen C. R. (1992) The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. *Trends Neurosci* **15**, 133-139.
- Gervais F. G., Singaraja R., Xanthoudakis S., Gutekunst C. A., Leavitt B. R., Metzler M., Hackam A. S., Tam J., Vaillancourt J. P., Houtzager V., Rasper D. M., Roy S., Hayden M. R., and Nicholson D. W. (2002) Recruitment and activation of caspase-8 by the Huntingtin-interacting protein Hip-1 and a novel partner Hipp1. *Nat Cell Biol* **4**, 95-105.
- Goldman S. A. (1998) Adult neurogenesis: from canaries to the clinic. *J Neurobiol* **36**, 267-286.
- Gordon C. J. (1990) Thermal biology of the laboratory rat. *Physiol Behav* **47**, 963-991.
- Gould E., McEwen B. S., Tanapat P., Galea L. A., and Fuchs E. (1997) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci* **17**, 2492-2498.
- Gould E., Tanapat P., McEwen B. S., Flugge G., and Fuchs E. (1998) Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3168-3171.
- Gould E., Reeves A. J., Graziano M. S., and Gross C. G. (1999) Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science* **286**, 548-552.
- Gratacos E., Perez-Navarro E., Tolosa E., Arenas E., and Alberch J. (2001) Neuroprotection of striatal neurons against kainate excitotoxicity by neurotrophins and GDNF family members. *J Neurochem* **78**, 1287-1296.
- Graybiel A. M. (2000) The basal ganglia. *Curr Biol* **10**, R509-R511.
- Greene L. A. and Tischler A. S. (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**, 2424-2428.
- Grill R., Murai K., Blesch A., Gage F. H., and Tuszynski M. H. (1997) Cellular delivery of neurotrophin-3 promotes corticospinal axonal growth and partial functional recovery after spinal cord injury. *J Neurosci* **17**, 5560-5572.

- Gritti A., Parati E. A., Cova L., Frolichsthal P., Galli R., Wanke E., Faravelli L., Morassutti D. J., Roisen F., Nickel D. D., and Vescovi A. L. (1996) Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *J Neurosci* **16**, 1091-1100.
- Gu X. and Spitzer N. C. (1995) Distinct aspects of neuronal differentiation encoded by frequency of spontaneous Ca<sup>2+</sup> transients. *Nature* **375**, 784-787.
- Gusella J. F. and MacDonald M. E. (1998) Huntingtin: a single bait hooks many species. *Curr Opin Neurobiol* **8**, 425-430.
- Gustafsson E., Andsberg G., Darsalia V., Mohapel P., Mandel R. J., Kirik D., Lindvall O., and Kokaia Z. (2003) Anterograde delivery of brain-derived neurotrophic factor to striatum via nigral transduction of recombinant adeno-associated virus increases neuronal death but promotes neurogenic response following stroke. *Eur J Neurosci* **17**, 2667-2678.
- Guyot M. C., Hantraye P., Dolan R., Palfi S., Maziere M., and Brouillet E. (1997) Quantifiable bradykinesia, gait abnormalities and Huntington's disease-like striatal lesions in rats chronically treated with 3-nitropropionic acid. *Neuroscience* **79**, 45-56.

## **H**

---

- Hagell P. and Brundin P. (2001) Cell survival and clinical outcome following intrastriatal transplantation in Parkinson disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **60**, 741-752.
- Hagell P., Piccini P., Bjorklund A., Brundin P., Rehncrona S., Widner H., Crabb L., Pavese N., Oertel W. H., Quinn N., Brooks D. J., and Lindvall O. (2002) Dyskinesias following neural transplantation in Parkinson's disease. *Nat Neurosci* **5**, 627-628.
- Hall A. C., Mira H., Wagner J., and Arenas E. (2003) Region-specific effects of glia on neuronal induction and differentiation with a focus on dopaminergic neurons. *Glia* **43**, 47-51.
- Hamasaki T., Goto S., Nishikawa S., and Ushio Y. (2003) Neuronal cell migration for the developmental formation of the mammalian striatum. *Brain Res Brain Res Rev* **41**, 1-12.

- Hanada M., Krajewski S., Tanaka S., Cazals-Hatem D., Spengler B. A., Ross R. A., Biedler J. L., and Reed J. C. (1993) Regulation of Bcl-2 oncoprotein levels with differentiation of human neuroblastoma cells. *Cancer Res* **53**, 4978-4986.
- Hantraye P., Riche D., Maziere M., and Isacson O. (1990) A primate model of Huntington's disease: behavioral and anatomical studies of unilateral excitotoxic lesions of the caudate-putamen in the baboon. *Exp Neurol* **108**, 91-104.
- Hantraye P., Riche D., Maziere M., and Isacson O. (1992) Intra-striatal transplantation of cross-species fetal striatal cells reduces abnormal movements in a primate model of Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 4187-4191.
- Harper P. S. (1992) The epidemiology of Huntington's disease. *Hum Genet* **89**, 365-376.
- Hauser R. A., Furtado S., Cimino C. R., Delgado H., Eichler S., Schwartz S., Scott D., Nauert G. M., Soety E., Sossi V., Holt D. A., Sanberg P. R., Stoessl A. J., and Freeman T. B. (2002) Bilateral human fetal striatal transplantation in Huntington's disease. *Neurology* **58**, 687-695.
- Haydar T. F., Wang F., Schwartz M. L., and Rakic P. (2000) Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones. *J Neurosci* **20**, 5764-5774.
- Henion P. D. and Weston J. A. (1994) Retinoic acid selectively promotes the survival and proliferation of neurogenic precursors in cultured neural crest cell populations. *Dev Biol* **161**, 243-250.
- Herberth B., Pataki A., Jelitai M., Schlett K., Deak F., Spat A., and Madarasz E. (2002) Changes of KCl sensitivity of proliferating neural progenitors during in vitro neurogenesis. *J Neurosci Res* **67**, 574-582.
- Herrera D. G., Garcia-Verdugo J. M., and Alvarez-Buylla A. (1999) Adult-derived neural precursors transplanted into multiple regions in the adult brain. *Ann Neurol* **46**, 867-877.
- Hodgson J. G., Agopyan N., Gutekunst C. A., Leavitt B. R., LePiane F., Singaraja R., Smith D. J., Bissada N., McCutcheon K., Nasir J., Jamot L., Li X. J., Stevens M. E., Rosemond E., Roder J. C., Phillips A. G., Rubin E. M., Hersch S. M., and Hayden M. R. (1999) A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant

huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration. *Neuron* **23**, 181-192.

Hofstetter C. P., Holmstrom N. A., Lilja J. A., Schweinhardt P., Hao J., Spenger C., Wiesenfeld-Hallin Z., Kurpad S. N., Frisen J., and Olson L. (2005) Allodynia limits the usefulness of intraspinal neural stem cell grafts; directed differentiation improves outcome. *Nat Neurosci* **8**, 346-353.

---

## I

---

Isacson O., Brundin P., Kelly P. A., Gage F. H., and Bjorklund A. (1984) Functional neuronal replacement by grafted striatal neurones in the ibotenic acid-lesioned rat striatum. *Nature* **311**, 458-460.

Isacson O., Brundin P., Gage F. H., and Bjorklund A. (1985) Neural grafting in a rat model of Huntington's disease: progressive neurochemical changes after neostriatal ibotenate lesions and striatal tissue grafting. *Neuroscience* **16**, 799-817.

Isacson O., Dunnett S. B., and Bjorklund A. (1986) Graft-induced behavioral recovery in an animal model of Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 2728-2732.

---

## J

---

Jain M., Armstrong R. J., Barker R. A., and Rosser A. E. (2001) Cellular and molecular aspects of striatal development. *Brain Res Bull* **55**, 533-540.

Jain M., Armstrong R. J., Tyers P., Barker R. A., and Rosser A. E. (2003) GABAergic immunoreactivity is predominant in neurons derived from expanded human neural precursor cells in vitro. *Exp Neurol* **182**, 113-123.

Jang Y. K., Park J. J., Lee M. C., Yoon B. H., Yang Y. S., Yang S. E., and Kim S. U. (2004) Retinoic acid-mediated induction of neurons and glial cells from human umbilical cord-derived hematopoietic stem cells. *J Neurosci Res* **75**, 573-584.

Jessell T. M. (2000) Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet* **1**, 20-29.

Jiang Y., Jahagirdar B. N., Reinhardt R. L., Schwartz R. E., Keene C. D., Ortiz-Gonzalez X. R., Reyes M., Lenvik T., Lund T., Blackstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low W. C., Largaespada D. A., and Verfaillie C. M. (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* **418**, 41-49.

Jiang Y., Henderson D., Blackstad M., Chen A., Miller R. F., and Verfaillie C. M. (2003) Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100 Suppl 1**, 11854-11860.

Jin K., Mao X. O., Sun Y., Xie L., and Greenberg D. A. (2002) Stem cell factor stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *J Clin Invest* **110**, 311-319.

Jin K., Sun Y., Xie L., Peel A., Mao X. O., Bateau S., and Greenberg D. A. (2003) Directed migration of neuronal precursors into the ischemic cerebral cortex and striatum. *Mol Cell Neurosci* **24**, 171-189.

Jones-Villeneuve E. M., McBurney M. W., Rogers K. A., and Kalnins V. I. (1982) Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *J Cell Biol* **94**, 253-262.

## **K**

---

Kalyani A., Hobson K., and Rao M. S. (1997) Neuroepithelial stem cells from the embryonic spinal cord: isolation, characterization, and clonal analysis. *Dev Biol* **186**, 202-223.

Kalyani A. J., Piper D., Mujtaba T., Lucero M. T., and Rao M. S. (1998) Spinal cord neuronal precursors generate multiple neuronal phenotypes in culture. *J Neurosci* **18**, 7856-7868.

Kanatsu-Shinohara M., Inoue K., Lee J., Yoshimoto M., Ogonuki N., Miki H., Baba S., Kato T., Kazuki Y., Toyokuni S., Toyoshima M., Niwa O., Oshimura M., Heike T., Nakahata T., Ishino F., Ogura A., and Shinohara T. (2004) Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* **119**, 1001-1012.

Kao J. P., Harootunian A. T., and Tsien R. Y. (1989) Photochemically generated cytosolic calcium pulses and their detection by fluo-3. *J Biol Chem* **264**, 8179-8184.

- Katsura M., Shuto K., Mohri Y., Shigeto M., and Ohkuma S. (2002) Functional significance of nitric oxide in ionomycin-evoked [3H]GABA release from mouse cerebral cortical neurons. *J Neurochem* **81**, 130-141.
- Kawasaki H., Mizuseki K., Nishikawa S., Kaneko S., Kuwana Y., Nakanishi S., Nishikawa S. I., and Sasai Y. (2000) Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* **28**, 31-40.
- Kempermann G., Kuhn H. G., and Gage F. H. (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* **386**, 493-495.
- Kendall A. L., Rayment F. D., Torres E. M., Baker H. F., Ridley R. M., and Dunnett S. B. (1998) Functional integration of striatal allografts in a primate model of Huntington's disease. *Nat Med* **4**, 727-729.
- Kerr D. A., Llado J., Shablott M. J., Maragakis N. J., Irani D. N., Crawford T. O., Krishnan C., Dike S., Gearhart J. D., and Rothstein J. D. (2003) Human embryonic germ cell derivatives facilitate motor recovery of rats with diffuse motor neuron injury. *J Neurosci* **23**, 5131-5140.
- Keyoung H. M., Roy N. S., Benraiss A., Louissaint A., Jr., Suzuki A., Hashimoto M., Rashbaum W. K., Okano H., and Goldman S. A. (2001) High-yield selection and extraction of two promoter-defined phenotypes of neural stem cells from the fetal human brain. *Nat Biotechnol* **19**, 843-850.
- Kim J. H., Auerbach J. M., Rodriguez-Gomez J. A., Velasco I., Gavin D., Lumelsky N., Lee S. H., Nguyen J., Sanchez-Pernaute R., Bankiewicz K., and McKay R. (2002) Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* **418**, 50-56.
- Kleinsmith L. J. and Pierce G. B., Jr. (1964) Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. *Cancer Res* **24**, 1544-1551.
- Kocher A. A., Schuster M. D., Szabolcs M. J., Takuma S., Burkhoff D., Wang J., Homma S., Edwards N. M., and Itescu S. (2001) Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* **7**, 430-436.
- Koeberle P. D. and Bahr M. (2004) Growth and guidance cues for regenerating axons: where have they gone? *J Neurobiol* **59**, 162-180.

- Kohyama J., Abe H., Shimazaki T., Koizumi A., Nakashima K., Gojo S., Taga T., Okano H., Hata J., and Umezawa A. (2001) Brain from bone: efficient "meta-differentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent. *Differentiation* **68**, 235-244.
- Kordower J. H., Chen E. Y., Winkler C., Fricker R., Charles V., Messing A., Mufson E. J., Wong S. C., Rosenstein J. M., Bjorklund A., Emerich D. F., Hammang J., and Carpenter M. K. (1997) Grafts of EGF-responsive neural stem cells derived from GFAP-hNGF transgenic mice: trophic and tropic effects in a rodent model of Huntington's disease. *J Comp Neurol* **387**, 96-113.
- Kordower J. H., Isacson O., and Emerich D. F. (1999) Cellular delivery of trophic factors for the treatment of Huntington's disease: is neuroprotection possible? *Exp Neurol* **159**, 4-20.
- Kornack D. R. and Rakic P. (2001) Cell proliferation without neurogenesis in adult primate neocortex. *Science* **294**, 2127-2130.
- Korneyi Z., Toth B., Tretter L., and Madarasz E. (1998) Effects of retinoic acid on rat forebrain cells derived from embryonic and perinatal rats. *Neurochem Int* **33**, 541-549.
- Kuhn H. G., Winkler J., Kempermann G., Thal L. J., and Gage F. H. (1997) Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci* **17**, 5820-5829.

## **L**

---

- Laforet G. A., Sapp E., Chase K., McIntyre C., Boyce F. M., Campbell M., Cadigan B. A., Warzecki L., Tagle D. A., Reddy P. H., Cepeda C., Calvert C. R., Jokel E. S., Klapstein G. J., Ariano M. A., Levine M. S., DiFiglia M., and Aronin N. (2001) Changes in cortical and striatal neurons predict behavioral and electrophysiological abnormalities in a transgenic murine model of Huntington's disease. *J Neurosci* **21**, 9112-9123.
- Lee S. H., Lumelsky N., Studer L., Auerbach J. M., and McKay R. D. (2000) Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* **18**, 675-679.

- Lescaudron L., Unni D., and Dunbar G. L. (2003) Autologous adult bone marrow stem cell transplantation in an animal model of huntington's disease: behavioral and morphological outcomes. *Int J Neurosci* **113**, 945-956.
- Levivier M., Gash D. M., and Przedborski S. (1995) Time course of the neuroprotective effect of transplantation on quinolinic acid-induced lesions of the striatum. *Neuroscience* **69**, 43-50.
- Li R., Thode S., Zhou J., Richard N., Pardinas J., Rao M. S., and Sah D. W. (2000) Motoneuron differentiation of immortalized human spinal cord cell lines. *J Neurosci Res* **59**, 342-352.
- Li Y., Chen J., Wang L., Zhang L., Lu M., and Chopp M. (2001) Intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* **316**, 67-70.
- Lie D. C., Dziewczapolski G., Willhoite A. R., Kaspar B. K., Shults C. W., and Gage F. H. (2002) The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential. *J Neurosci* **22**, 6639-6649.
- Lie D. C., Song H., Colamarino S. A., Ming G. L., and Gage F. H. (2004) Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **44**, 399-421.
- Lim D. A., Tramontin A. D., Trevejo J. M., Herrera D. G., Garcia-Verdugo J. M., and Alvarez-Buylla A. (2000) Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* **28**, 713-726.
- Lin C. H., Tallaksen-Greene S., Chien W. M., Cearley J. A., Jackson W. S., Crouse A. B., Ren S., Li X. J., Albin R. L., and Detloff P. J. (2001) Neurological abnormalities in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* **10**, 137-144.
- Lindvall O. and Hagell P. (2000) Clinical observations after neural transplantation in Parkinson's disease. *Prog Brain Res* **127**, 299-320.
- Lindvall O., Kokaia Z., and Martinez-Serrano A. (2004) Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work. *Nat Med* **10 Suppl**, S42-S50.

- Liste I., Garcia-Garcia E., and Martinez-Serrano A. (2004) The generation of dopaminergic neurons by human neural stem cells is enhanced by Bcl-XL, both in vitro and in vivo. *J Neurosci* **24**, 10786-10795.
- Liu J. P., Laufer E., and Jessell T. M. (2001) Assigning the positional identity of spinal motor neurons: rostrocaudal patterning of Hox-c expression by FGFs, Gdf11, and retinoids. *Neuron* **32**, 997-1012.
- Liu S., Qu Y., Stewart T. J., Howard M. J., Chakraborty S., Holekamp T. F., and McDonald J. W. (2000) Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6126-6131.
- Lois C. and Alvarez-Buylla A. (1993) Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2074-2077.
- Lopez-Martin E., Caruncho H. J., Rodriguez-Pallares J., Guerra M. J., and Labandeira-Garcia J. L. (1999) Striatal dopaminergic afferents concentrate in GDNF-positive patches during development and in developing intrastriatal striatal grafts. *J Comp Neurol* **406**, 199-206.
- LoTurco J. J., Owens D. F., Heath M. J., Davis M. B., and Kriegstein A. R. (1995) GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron* **15**, 1287-1298.
- Lovell-Badge R. (2001) The future for stem cell research. *Nature* **414**, 88-91.
- Lu P., Jones L. L., Snyder E. Y., and Tuszynski M. H. (2003) Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury. *Exp Neurol* **181**, 115-129.
- Lundberg C., Field P. M., Ajayi Y. O., Raisman G., and Bjorklund A. (1996) Conditionally immortalized neural progenitor cell lines integrate and differentiate after grafting to the adult rat striatum. A combined autoradiographic and electron microscopic study. *Brain Res* **737**, 295-300.
- Lundberg C., Winkler C., Whitemore S. R., and Bjorklund A. (1996) Conditionally immortalized neural progenitor cells grafted to the striatum exhibit site-specific

neuronal differentiation and establish connections with the host globus pallidus. *Neurobiol Dis* **3**, 33-50.

Lundberg C., Martinez-Serrano A., Cattaneo E., McKay R. D., and Bjorklund A. (1997) Survival, integration, and differentiation of neural stem cell lines after transplantation to the adult rat striatum. *Exp Neurol* **145**, 342-360.

Lundberg C., Englund U., Trono D., Bjorklund A., and Wictorin K. (2002) Differentiation of the RN33B cell line into forebrain projection neurons after transplantation into the neonatal rat brain. *Exp Neurol* **175**, 370-387.

## **M**

---

MacDonald V. and Halliday G. (2002) Pyramidal cell loss in motor cortices in Huntington's disease. *Neurobiol Dis* **10**, 378-386.

Maden M. and Holder N. (1991) The involvement of retinoic acid in the development of the vertebrate central nervous system. *Development Suppl* **2**, 87-94.

Magavi S. S., Leavitt B. R., and Macklis J. D. (2000) Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature* **405**, 951-955.

Mangiarini L., Sathasivam K., Seller M., Cozens B., Harper A., Hetherington C., Lawton M., Trotter Y., Lehrach H., Davies S. W., and Bates G. P. (1996) Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* **87**, 493-506.

Marco S., Canudas A. M., Canals J. M., Gavalda N., Perez-Navarro E., and Alberch J. (2002) Excitatory amino acids differentially regulate the expression of GDNF, neurturin, and their receptors in the adult rat striatum. *Exp Neurol* **174**, 243-252.

Marin C., Bove J., Bonastre M., and Tolosa E. (2003) Effect of acute and chronic administration of U50,488, a kappa opioid receptor agonist, in 6-OHDA-lesioned rats chronically treated with levodopa. *Exp Neurol* **183**, 66-73.

Martin G. R. and Evans M. J. (1974) The morphology and growth of a pluripotent teratocarcinoma cell line and its derivatives in tissue culture. *Cell* **2**, 163-172.

- Martin G. R. (1981) 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* **78**, 7634-7638.
- Martin J. B. and Gusella J. F. (1986) Huntington's disease. Pathogenesis and management. *N Engl J Med* **315**, 1267-1276.
- Martinez-Serrano A. and Bjorklund A. (1996) Protection of the neostriatum against excitotoxic damage by neurotrophin-producing, genetically modified neural stem cells. *J Neurosci* **16**, 4604-4616.
- Martinez-Serrano A., Hantzopoulos P. A., and Bjorklund A. (1996) Ex vivo gene transfer of brain-derived neurotrophic factor to the intact rat forebrain: neurotrophic effects on cholinergic neurons. *Eur J Neurosci* **8**, 727-735.
- Martinez-Serrano A. and Bjorklund A. (1997) Immortalized neural progenitor cells for CNS gene transfer and repair. *Trends Neurosci* **20**, 530-538.
- Mattsson B., Sorensen J. C., Zimmer J., and Johansson B. B. (1997) Neural grafting to experimental neocortical infarcts improves behavioral outcome and reduces thalamic atrophy in rats housed in enriched but not in standard environments. *Stroke* **28**, 1225-1231.
- Mayer-Proschel M., Kalyani A. J., Mujtaba T., and Rao M. S. (1997) Isolation of lineage-restricted neuronal precursors from multipotent neuroepithelial stem cells. *Neuron* **19**, 773-785.
- McCarthy K. D. and de Vellis J. (1980) Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol* **85**, 890-902.
- McGeer E. G. and McGeer P. L. (1976) Duplication of biochemical changes of Huntington's chorea by intrastriatal injections of glutamic and kainic acids. *Nature* **263**, 517-519.
- McKay R. (2000) Stem cells--hype and hope. *Nature* **406**, 361-364.
- McMurray C. T. (2001) Huntington's disease: new hope for therapeutics. *Trends Neurosci* **24**, S32-S38.

- Mezey E., Chandross K. J., Harta G., Maki R. A., and McKercher S. R. (2000) Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* **290**, 1779-1782.
- Mittoux V., Joseph J. M., Conde F., Palfi S., Dautry C., Poyot T., Bloch J., Deglon N., Ouary S., Nimchinsky E. A., Brouillet E., Hof P. R., Peschanski M., Aebischer P., and Hantraye P. (2000) Restoration of cognitive and motor functions by ciliary neurotrophic factor in a primate model of Huntington's disease. *Hum Gene Ther* **11**, 1177-1187.
- Mizuno K., Carnahan J., and Nawa H. (1994) Brain-derived neurotrophic factor promotes differentiation of striatal GABAergic neurons. *Dev Biol* **165**, 243-256.
- Monje M. L., Toda H., and Palmer T. D. (2003) Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* **302**, 1760-1765.
- Moon L. D., Asher R. A., Rhodes K. E., and Fawcett J. W. (2001) Regeneration of CNS axons back to their target following treatment of adult rat brain with chondroitinase ABC. *Nat Neurosci* **4**, 465-466.
- Morshead C. M., Reynolds B. A., Craig C. G., McBurney M. W., Staines W. A., Morassutti D., Weiss S., and van der K. D. (1994) Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* **13**, 1071-1082.
- Morshead C. M., Benveniste P., Iscove N. N., and van der K. D. (2002) Hematopoietic competence is a rare property of neural stem cells that may depend on genetic and epigenetic alterations. *Nat Med* **8**, 268-273.
- Mujtaba T., Piper D. R., Kalyani A., Groves A. K., Lucero M. T., and Rao M. S. (1999) Lineage-restricted neural precursors can be isolated from both the mouse neural tube and cultured ES cells. *Dev Biol* **214**, 113-127.

---

## **N**

- Nakao N., Ogura M., Nakai K., and Itakura T. (1999) Embryonic striatal grafts restore neuronal activity of the globus pallidus in a rodent model of Huntington's disease. *Neuroscience* **88**, 469-477.

Nakatomi H., Kuriu T., Okabe S., Yamamoto S., Hatano O., Kawahara N., Tamura A., Kirino T., and Nakafuku M. (2002) Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* **110**, 429-441.

Nasir J., Floresco S. B., O'Kusky J. R., Diewert V. M., Richman J. M., Zeisler J., Borowski A., Marth J. D., Phillips A. G., and Hayden M. R. (1995) Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell* **81**, 811-823.

Nery S., Fishell G., and Corbin J. G. (2002) The caudal ganglionic eminence is a source of distinct cortical and subcortical cell populations. *Nat Neurosci* **5**, 1279-1287.

Nottebohm F. (2002) Neuronal replacement in adult brain. *Brain Res Bull* **57**, 737-749.

## **O**

---

Odorico J. S., Kaufman D. S., and Thomson J. A. (2001) Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* **19**, 193-204.

Okada Y., Shimazaki T., Sobue G., and Okano H. (2004) Retinoic-acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol* **275**, 124-142.

Olsson M., Bentlage C., Wictorin K., Campbell K., and Bjorklund A. (1997) Extensive migration and target innervation by striatal precursors after grafting into the neonatal striatum. *Neuroscience* **79**, 57-78.

Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Jakoniuk I., Anderson S. M., Li B., Pickel J., McKay R., Nadal-Ginard B., Bodine D. M., Leri A., and Anversa P. (2001) Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* **410**, 701-705.

## **P**

---

Palfi S., Conde F., Riche D., Brouillet E., Dautry C., Mittoux V., Chibois A., Peschanski M., and Hantraye P. (1998) Fetal striatal allografts reverse cognitive deficits in a primate model of Huntington disease. *Nat Med* **4**, 963-966.

- Palmer T. D., Takahashi J., and Gage F. H. (1997) The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci* **8**, 389-404.
- Pardo B. and Honegger P. (2000) Differentiation of rat striatal embryonic stem cells in vitro: monolayer culture vs. three-dimensional coculture with differentiated brain cells. *J Neurosci Res* **59**, 504-512.
- Parent J. M., Vexler Z. S., Gong C., Derugin N., and Ferriero D. M. (2002) Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. *Ann Neurol* **52**, 802-813.
- Park K. I., Ourednik J., Ourednik V., Taylor R. M., Aboody K. S., Auguste K. I., Lachyankar M. B., Redmond D. E., and Snyder E. Y. (2002) Global gene and cell replacement strategies via stem cells. *Gene Ther* **9**, 613-624.
- Patz S., Wirth M. J., Gorba T., Klostermann O., and Wahle P. (2003) Neuronal activity and neurotrophic factors regulate GAD-65/67 mRNA and protein expression in organotypic cultures of rat visual cortex. *Eur J Neurosci* **18**, 1-12.
- Perez-Navarro E., Alberch J., Neveu I., and Arenas E. (1999a) Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3 and neurotrophin-4/5 differentially regulate the phenotype and prevent degenerative changes in striatal projection neurons after excitotoxicity in vivo. *Neuroscience* **91**, 1257-1264.
- Perez-Navarro E., Arenas E., Marco S., and Alberch J. (1999b) Intra-striatal grafting of a GDNF-producing cell line protects striatonigral neurons from quinolinic acid excitotoxicity in vivo. *Eur J Neurosci* **11**, 241-249.
- Perez-Navarro E., Akerud P., Marco S., Canals J. M., Tolosa E., Arenas E., and Alberch J. (2000a) Neurturin protects striatal projection neurons but not interneurons in a rat model of Huntington's disease. *Neuroscience* **98**, 89-96.
- Perez-Navarro E., Canudas A. M., Akerud P., Alberch J., and Arenas E. (2000b) Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4/5 prevent the death of striatal projection neurons in a rodent model of Huntington's disease. *J Neurochem* **75**, 2190-2199.
- Persichetti F., Ambrose C. M., Ge P., McNeil S. M., Srinidhi J., Anderson M. A., Jenkins B., Barnes G. T., Duyao M. P., Kanaley L., and . (1995) Normal and expanded

- Huntington's disease gene alleles produce distinguishable proteins due to translation across the CAG repeat. *Mol Med* **1**, 374-383.
- Peschanski M., Bachoud-Levi A. C., and Hantraye P. (2004) Integrating fetal neural transplants into a therapeutic strategy: the example of Huntington's disease. *Brain* **127**, 1219-1228.
- Petersen A., Mani K., and Brundin P. (1999) Recent advances on the pathogenesis of Huntington's disease. *Exp Neurol* **157**, 1-18.
- Peterson D. A. (2002) Stem cells in brain plasticity and repair. *Curr Opin Pharmacol* **2**, 34-42.
- Philpott L. M., Kopyov O. V., Lee A. J., Jacques S., Duma C. M., Caine S., Yang M., and Eagle K. S. (1997) Neuropsychological functioning following fetal striatal transplantation in Huntington's chorea: three case presentations. *Cell Transplant* **6**, 203-212.
- Piccini P. (2002) Dyskinesias after transplantation in Parkinson's disease. *Lancet Neurol* **1**, 472.
- Pineda J. R., Canals J. M., Bosch M., Adell A., Mengod G., Artigas F., Ernfors P., and Alberch J. (2005) Brain-derived neurotrophic factor modulates dopaminergic deficits in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Neurochem*, **en prensa**.
- Polgar S., Morris M. E., Reilly S., Bilney B., and Sanberg P. R. (2003) Reconstructive neurosurgery for Parkinson's disease: a systematic review and preliminary meta-analysis. *Brain Res Bull* **60**, 1-24.
- Pundt L. L., Kondoh T., Conrad J. A., and Low W. C. (1996b) Transplantation of human striatal tissue into a rodent model of Huntington's disease: phenotypic expression of transplanted neurons and host-to-graft innervation. *Brain Res Bull* **39**, 23-32.
- Pundt L. L., Kondoh T., Conrad J. A., and Low W. C. (1996a) Transplantation of human fetal striatum into a rodent model of Huntington's disease ameliorates locomotor deficits. *Neurosci Res* **24**, 415-420.

**Q**

---

Qiu J., Cai D., and Filbin M. T. (2000) Glial inhibition of nerve regeneration in the mature mammalian CNS. *Glia* **29**, 166-174.

**R**

---

Raymon H. K., Thode S., Zhou J., Friedman G. C., Pardinás J. R., Barrere C., Johnson R. M., and Sah D. W. (1999) Immortalized human dorsal root ganglion cells differentiate into neurons with nociceptive properties. *J Neurosci* **19**, 5420-5428.

Reddy P. H., Williams M., Charles V., Garrett L., Pike-Buchanan L., Whetsell W. O., Jr., Miller G., and Tagle D. A. (1998) Behavioural abnormalities and selective neuronal loss in HD transgenic mice expressing mutated full-length HD cDNA. *Nat Genet* **20**, 198-202.

Reddy P. H., Williams M., and Tagle D. A. (1999) Recent advances in understanding the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends Neurosci* **22**, 248-255.

Reiner A., Albin R. L., Anderson K. D., D'Amato C. J., Penney J. B., and Young A. B. (1988) Differential loss of striatal projection neurons in Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 5733-5737.

Renfranz P. J., Cunningham M. G., and McKay R. D. (1991) Region-specific differentiation of the hippocampal stem cell line HiB5 upon implantation into the developing mammalian brain. *Cell* **66**, 713-729.

Renoncourt Y., Carroll P., Filippi P., Arce V., and Alonso S. (1998) Neurons derived in vitro from ES cells express homeoproteins characteristic of motoneurons and interneurons. *Mech Dev* **79**, 185-197.

Reubinoff B. E., Pera M. F., Fong C. Y., Trounson A., and Bongso A. (2000) Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* **18**, 399-404.

Reynolds B. A. and Weiss S. (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* **255**, 1707-1710.

- Richfield E. K., Maguire-Zeiss K. A., Vonkeman H. E., and Voorn P. (1995) Preferential loss of preproenkephalin versus preprotachykinin neurons from the striatum of Huntington's disease patients. *Ann Neurol* **38**, 852-861.
- Rigamonti D., Bauer J. H., De Fraja C., Conti L., Sipione S., Sciorati C., Clementi E., Hackam A., Hayden M. R., Li Y., Cooper J. K., Ross C. A., Govoni S., Vincenz C., and Cattaneo E. (2000) Wild-type huntingtin protects from apoptosis upstream of caspase-3. *J Neurosci* **20**, 3705-3713.
- Ross C. A. (2002) Polyglutamine pathogenesis: emergence of unifying mechanisms for Huntington's disease and related disorders. *Neuron* **35**, 819-822.
- Ross S. A., McCaffery P. J., Drager U. C., and De Luca L. M. (2000) Retinoids in embryonal development. *Physiol Rev* **80**, 1021-1054.
- Rosser A. E., Barker R. A., Harrower T., Watts C., Farrington M., Ho A. K., Burnstein R. M., Menon D. K., Gillard J. H., Pickard J., and Dunnett S. B. (2002) Unilateral transplantation of human primary fetal tissue in four patients with Huntington's disease: NEST-UK safety report ISRCTN no 36485475. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **73**, 678-685.
- Rossi F. and Cattaneo E. (2002) Opinion: neural stem cell therapy for neurological diseases: dreams and reality. *Nat Rev Neurosci* **3**, 401-409.
- Ruberte E., Friederich V., Chambon P., and Morriss-Kay G. (1993) Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. III. Their differential transcript distribution during mouse nervous system development. *Development* **118**, 267-282.
- Rubinsztein D. C. (2002) Lessons from animal models of Huntington's disease. *Trends Genet* **18**, 202-209.
- Rubio F., Kokaia Z., Arco A., Garcia-Simon M., Snyder E., Lindvall O., Satrustegui J., and Martinez-Serrano A. (1999) BDNF gene transfer to the mammalian brain using CNS-derived neural precursors. *Gene Ther* **6**, 1851-1866.
- Rubio F. J., Bueno C., Villa A., Navarro B., and Martinez-Serrano A. (2000) Genetically perpetuated human neural stem cells engraft and differentiate into the adult mammalian brain. *Mol Cell Neurosci* **16**, 1-13.

Ryder E. F., Snyder E. Y., and Cepko C. L. (1990) Establishment and characterization of multipotent neural cell lines using retrovirus vector-mediated oncogene transfer. *J Neurobiol* **21**, 356-375.

---

**S**

---

Schierle G. S., Hansson O., Leist M., Nicotera P., Widner H., and Brundin P. (1999) Caspase inhibition reduces apoptosis and increases survival of nigral transplants. *Nat Med* **5**, 97-100.

Schnell L. and Schwab M. E. (1990) Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody against myelin-associated neurite growth inhibitors. *Nature* **343**, 269-272.

Schumacher J. M., Short M. P., Hyman B. T., Breakefield X. O., and Isacson O. (1991) Intracerebral implantation of nerve growth factor-producing fibroblasts protects striatum against neurotoxic levels of excitatory amino acids. *Neuroscience* **45**, 561-570.

Shamblott M. J., Axelman J., Wang S., Bugg E. M., Littlefield J. W., Donovan P. J., Blumenthal P. D., Huggins G. R., and Gearhart J. D. (1998) Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13726-13731.

Shamblott M. J., Axelman J., Littlefield J. W., Blumenthal P. D., Huggins G. R., Cui Y., Cheng L., and Gearhart J. D. (2001) Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 113-118.

Shihabuddin L. S., Palmer T. D., and Gage F. H. (1999) The search for neural progenitor cells: prospects for the therapy of neurodegenerative disease. *Mol Med Today* **5**, 474-480.

Shim J. W., Koh H. C., Chang M. Y., Roh E., Choi C. Y., Oh Y. J., Son H., Lee Y. S., Studer L., and Lee S. H. (2004) Enhanced in vitro midbrain dopamine neuron differentiation, dopaminergic function, neurite outgrowth, and 1-methyl-4-phenylpyridium resistance in mouse embryonic stem cells overexpressing Bcl-XL. *J Neurosci* **24**, 843-852.

Shimohama S., Rosenberg M. B., Fagan A. M., Wolff J. A., Short M. P., Breakefield X. O., Friedmann T., and Gage F. H. (1989) Grafting genetically modified cells into the rat

- brain: characteristics of E. coli beta-galactosidase as a reporter gene. *Brain Res Mol Brain Res* **5**, 271-278.
- Shingo T., Sorokan S. T., Shimazaki T., and Weiss S. (2001) Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci* **21**, 9733-9743.
- Shors T. J., Miesegaes G., Beylin A., Zhao M., Rydel T., and Gould E. (2001) Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* **410**, 372-376.
- Siminovitch L., McCulloch E. A., and Till J. E. (1963) The Distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *J Cell Physiol* **62**, 327-336.
- Sirinathsinghji D. J., Dunnett S. B., Isacson O., Clarke D. J., Kendrick K., and Bjorklund A. (1988) Striatal grafts in rats with unilateral neostriatal lesions--II. In vivo monitoring of GABA release in globus pallidus and substantia nigra. *Neuroscience* **24**, 803-811.
- Skakkebaek N. E., Berthelsen J. G., Giwercman A., and Muller J. (1987) Carcinoma-in-situ of the testis: possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma. *Int J Androl* **10**, 19-28.
- Smith A. G., Heath J. K., Donaldson D. D., Wong G. G., Moreau J., Stahl M., and Rogers D. (1988) Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* **336**, 688-690.
- Snyder E. Y., Deitcher D. L., Walsh C., Arnold-Aldea S., Hartwig E. A., and Cepko C. L. (1992) Multipotent neural cell lines can engraft and participate in development of mouse cerebellum. *Cell* **68**, 33-51.
- Snyder E. Y., Taylor R. M., and Wolfe J. H. (1995) Neural progenitor cell engraftment corrects lysosomal storage throughout the MPS VII mouse brain. *Nature* **374**, 367-370.
- Snyder E. Y., Yoon C., Flax J. D., and Macklis J. D. (1997) Multipotent neural precursors can differentiate toward replacement of neurons undergoing targeted apoptotic degeneration in adult mouse neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11663-11668.

- Song H., Stevens C. F., and Gage F. H. (2002) Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* **417**, 39-44.
- Sotelo C. and Alvarado-Mallart R. M. (1991) The reconstruction of cerebellar circuits. *Trends Neurosci* **14**, 350-355.
- Spitzer N. C., Debaca R. C., Allen K. A., and Holliday J. (1993) Calcium dependence of differentiation of GABA immunoreactivity in spinal neurons. *J Comp Neurol* **337**, 168-175.
- Spitzer N. C., Lautermilch N. J., Smith R. D., and Gomez T. M. (2000) Coding of neuronal differentiation by calcium transients. *Bioessays* **22**, 811-817.
- Stevens L. C. (1967a) Origin of testicular teratomas from primordial germ cells in mice. *J Natl Cancer Inst* **38**, 549-552.
- Stevens L. C. (1967b) The biology of teratomas. *Adv Morphog* **6**, 1-31.
- Storch A., Paul G., Csete M., Boehm B. O., Carvey P. M., Kupsch A., and Schwarz J. (2001) Long-term proliferation and dopaminergic differentiation of human mesencephalic neural precursor cells. *Exp Neurol* **170**, 317-325.
- Studer L., Tabar V., and McKay R. D. (1998) Transplantation of expanded mesencephalic precursors leads to recovery in parkinsonian rats. *Nat Neurosci* **1**, 290-295.
- Studer L., Csete M., Lee S. H., Kabbani N., Walikonis J., Wold B., and McKay R. (2000) Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen. *J Neurosci* **20**, 7377-7383.
- Sun Y., Nadal-Vicens M., Misono S., Lin M. Z., Zubiaga A., Hua X., Fan G., and Greenberg M. E. (2001) Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell* **104**, 365-376.
- Sunol C., Artigas F., Tusell J. M., and Gelpi E. (1988) High-performance liquid chromatography-fluorescence detection method for endogenous gamma-aminobutyric acid validated by mass spectrometric and gas chromatographic techniques. *Anal Chem* **60**, 649-651.

Sussel L., Marin O., Kimura S., and Rubenstein J. L. (1999) Loss of Nkx2.1 homeobox gene function results in a ventral to dorsal molecular respecification within the basal telencephalon: evidence for a transformation of the pallidum into the striatum. *Development* **126**, 3359-3370.

## **T**

---

Takahashi J., Palmer T. D., and Gage F. H. (1999) Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adult-derived neural stem cell cultures. *J Neurobiol* **38**, 65-81.

Temple S. (2001) The development of neural stem cells. *Nature* **414**, 112-117.

Teramoto T., Qiu J., Plumier J. C., and Moskowitz M. A. (2003) EGF amplifies the replacement of parvalbumin-expressing striatal interneurons after ischemia. *J Clin Invest* **111**, 1125-1132.

The Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* **72**, 971-983.

Thoenen H. and Sendtner M. (2002) Neurotrophins: from enthusiastic expectations through sobering experiences to rational therapeutic approaches. *Nat Neurosci* **5 Suppl**, 1046-1050.

Thomson J. A., Kalishman J., Golos T. G., Durning M., Harris C. P., Becker R. A., and Hearn J. P. (1995) Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7844-7848.

Thomson J. A., Kalishman J., Golos T. G., Durning M., Harris C. P., and Hearn J. P. (1996) Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. *Biol Reprod* **55**, 254-259.

Thomson J. A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S. S., Waknitz M. A., Swiergiel J. J., Marshall V. S., and Jones J. M. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145-1147.

Till J. E. and McCulloch E. A. (1961) A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* **14**, 213-222.

- Toledo-Aral J. J., Mendez-Ferrer S., Pardal R., Echevarria M., and Lopez-Barneo J. (2003) Trophic restoration of the nigrostriatal dopaminergic pathway in long-term carotid body-grafted parkinsonian rats. *J Neurosci* **23**, 141-148.
- Torchiana E., Lulli L., Cattaneo E., Invernizzi F., Orefice R., Bertagnolio B., Di Donato S., and Finocchiaro G. (1998) Retroviral-mediated transfer of the galactocerebrosidase gene in neural progenitor cells. *Neuroreport* **9**, 3823-3827.
- Toresson H., Mata d. U., Fagerstrom C., Perlmann T., and Campbell K. (1999) Retinoids are produced by glia in the lateral ganglionic eminence and regulate striatal neuron differentiation. *Development* **126**, 1317-1326.
- Toresson H., Potter S. S., and Campbell K. (2000) Genetic control of dorsal-ventral identity in the telencephalon: opposing roles for Pax6 and Gsh2. *Development* **127**, 4361-4371.
- Trimble W. S. (1998) Synaptic vesicle proteins: A molecular study, in *Cellular & Molecular Mechanism of toxin action* (Lazarovici P., ed.), pp. 3-43. Harwood.

## V

---

- Van Praag H., Kempermann G., and Gage F. H. (1999) Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* **2**, 266-270.
- Van Praag H., Kempermann G., and Gage F. H. (2000) Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci* **1**, 191-198.
- Ventimiglia R., Mather P. E., Jones B. E., and Lindsay R. M. (1995) The neurotrophins BDNF, NT-3 and NT-4/5 promote survival and morphological and biochemical differentiation of striatal neurons in vitro. *Eur J Neurosci* **7**, 213-222.
- Vescovi A. L., Reynolds B. A., Fraser D. D., and Weiss S. (1993) bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells. *Neuron* **11**, 951-966.
- Vicario-Abejon C., Collin C., Tsoulfas P., and McKay R. D. (2000) Hippocampal stem cells differentiate into excitatory and inhibitory neurons. *Eur J Neurosci* **12**, 677-688.

Vicario-Abejon C., Collin C., McKay R. D., and Segal M. (1998) Neurotrophins induce formation of functional excitatory and inhibitory synapses between cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* **18**, 7256-7271.

Vonsattel J. P. and DiFiglia M. (1998) Huntington disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **57**, 369-384.

---

## **W**

---

Wagner J., Akerud P., Castro D. S., Holm P. C., Canals J. M., Snyder E. Y., Perlmann T., and Arenas E. (1999a) Induction of a midbrain dopaminergic phenotype in Nurr1-overexpressing neural stem cells by type 1 astrocytes. *Nat Biotechnol* **17**, 653-659.

Wagner J. P., Black I. B., and DiCicco-Bloom E. (1999b) Stimulation of neonatal and adult brain neurogenesis by subcutaneous injection of basic fibroblast growth factor. *J Neurosci* **19**, 6006-6016.

Wang X., Lu Y., Zhang H., Wang K., He Q., Wang Y., Liu X., Li L., and Wang X. (2004) Distinct efficacy of pre-differentiated versus intact fetal mesencephalon-derived human neural progenitor cells in alleviating rat model of Parkinson's disease. *Int J Dev Neurosci* **22**, 175-183.

Watt S. D., Gu X., Smith R. D., and Spitzer N. C. (2000) Specific frequencies of spontaneous Ca<sup>2+</sup> transients upregulate GAD 67 transcripts in embryonic spinal neurons. *Mol Cell Neurosci* **16**, 376-387.

Watts C. and Dunnett S. B. (2000) Towards a protocol for the preparation and delivery of striatal tissue for clinical trials of transplantation in Huntington's disease. *Cell Transplant* **9**, 223-234.

Weimann J. M., Johansson C. B., Trejo A., and Blau H. M. (2003) Stable reprogrammed heterokaryons form spontaneously in Purkinje neurons after bone marrow transplant. *Nat Cell Biol* **5**, 959-966.

Weinelt S., Peters S., Bauer P., Mix E., Haas S. J., Dittmann A., Wree A., Cattaneo E., Knoblich R., Strauss U., and Rolfs A. (2003) Ciliary neurotrophic factor overexpression in neural progenitor cells (ST14A) increases proliferation, metabolic activity, and resistance to stress during differentiation. *J Neurosci Res* **71**, 228-236.

- Weiss S. (1988) Excitatory amino acid-evoked release of gamma-[3H]aminobutyric acid from striatal neurons in primary culture. *J Neurochem* **51**, 435-441.
- Weiss S., Dunne C., Hewson J., Wohl C., Wheatley M., Peterson A. C., and Reynolds B. A. (1996) Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci* **16**, 7599-7609.
- Wheeler V. C., White J. K., Gutekunst C. A., Vrbanac V., Weaver M., Li X. J., Li S. H., Yi H., Vonsattel J. P., Gusella J. F., Hersch S., Auerbach W., Joyner A. L., and MacDonald M. E. (2000) Long glutamine tracts cause nuclear localization of a novel form of huntingtin in medium spiny striatal neurons in HdhQ92 and HdhQ111 knock-in mice. *Hum Mol Genet* **9**, 503-513.
- White L. A., Eaton M. J., Castro M. C., Klose K. J., Globus M. Y., Shaw G., and Whitemore S. R. (1994) Distinct regulatory pathways control neurofilament expression and neurotransmitter synthesis in immortalized serotonergic neurons. *J Neurosci* **14**, 6744-6753.
- Whitemore S. R. and White L. A. (1993) Target regulation of neuronal differentiation in a temperature-sensitive cell line derived from medullary raphe. *Brain Res* **615**, 27-40.
- Wichterle H., Lieberam I., Porter J. A., and Jessell T. M. (2002) Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell* **110**, 385-397.
- Williams R. L., Hilton D. J., Pease S., Willson T. A., Stewart C. L., Gearing D. P., Wagner E. F., Metcalf D., Nicola N. A., and Gough N. M. (1988) Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* **336**, 684-687.
- Wong R. O. and Ghosh A. (2002) Activity-dependent regulation of dendritic growth and patterning. *Nat Rev Neurosci* **3**, 803-812.
- Wu P., Tarasenko Y. I., Gu Y., Huang L. Y., Coggeshall R. E., and Yu Y. (2002) Region-specific generation of cholinergic neurons from fetal human neural stem cells grafted in adult rat. *Nat Neurosci* **5**, 1271-1278.
- Wurmser A. E. and Gage F. H. (2002) Stem cells: cell fusion causes confusion. *Nature* **416**, 485-487.

**X**

---

Xu C., Inokuma M. S., Denham J., Golds K., Kundu P., Gold J. D., and Carpenter M. K. (2001) Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* **19**, 971-974.

**Y**

---

Yamada M. K., Nakanishi K., Ohba S., Nakamura T., Ikegaya Y., Nishiyama N., and Matsuki N. (2002) Brain-derived neurotrophic factor promotes the maturation of GABAergic mechanisms in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* **22**, 7580-7585.

Yamamoto A., Lucas J. J., and Hen R. (2000) Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease. *Cell* **101**, 57-66.

Yan J., Studer L., and McKay R. D. (2001) Ascorbic acid increases the yield of dopaminergic neurons derived from basic fibroblast growth factor expanded mesencephalic precursors. *J Neurochem* **76**, 307-311.

Yandava B. D., Billingham L. L., and Snyder E. Y. (1999) "Global" cell replacement is feasible via neural stem cell transplantation: evidence from the dysmyelinated shiverer mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7029-7034.

Yang M., Stull N. D., Berk M. A., Snyder E. Y., and Iacovitti L. (2002) Neural stem cells spontaneously express dopaminergic traits after transplantation into the intact or 6-hydroxydopamine-lesioned rat. *Exp Neurol* **177**, 50-60.

Ying Q. L., Nichols J., Evans E. P., and Smith A. G. (2002) Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* **416**, 545-548.

Yoshimura S., Takagi Y., Harada J., Teramoto T., Thomas S. S., Waeber C., Bakowska J. C., Brakefield X. O., and Moskowitz M. A. (2001) FGF-2 regulation of neurogenesis in adult hippocampus after brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 5874-5879.

**Z**

---

Zeron M. M., Hansson O., Chen N., Wellington C. L., Leavitt B. R., Brundin P., Hayden M. R., and Raymond L. A. (2002) Increased sensitivity to N-methyl-D-aspartate

receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease. *Neuron* **33**, 849-860.

Zetterstrom R. H., Lindqvist E., Mata d. U., Tomac A., Eriksson U., Perlmann T., and Olson L. (1999) Role of retinoids in the CNS: differential expression of retinoid binding proteins and receptors and evidence for presence of retinoic acid. *Eur J Neurosci* **11**, 407-416.

Zhang S. C., Ge B., and Duncan I. D. (2000) Tracing human oligodendroglial development in vitro. *J Neurosci Res* **59**, 421-429.

Zhao M., Momma S., Delfani K., Carlen M., Cassidy R. M., Johansson C. B., Brismar H., Shupliakov O., Frisen J., and Janson A. M. (2003) Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 7925-7930.

Zigova T., Pencea V., Wiegand S. J., and Luskin M. B. (1998) Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. *Mol Cell Neurosci* **11**, 234-245.

Zuccato C., Ciammola A., Rigamonti D., Leavitt B. R., Goffredo D., Conti L., MacDonald M. E., Friedlander R. M., Silani V., Hayden M. R., Timmusk T., Sipione S., and Cattaneo E. (2001) Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science* **293**, 493-498.