

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

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

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

I. Introducción

INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso central es una de las estructuras más complejas del organismo ya que está formado por cientos de tipos neuronales, así como diferentes células gliales que establecen complejas conexiones entre ellas. La precisión de dichas conexiones va a controlar las diversas funciones del sistema nervioso que incluyen desde la percepción sensitiva y la coordinación motora a la motivación y la memoria.

Dada la complejidad del sistema nervioso, hasta el momento solo se conocen algunos de los mecanismos moleculares y genéticos que intervienen en su desarrollo. Un entendimiento más profundo de los procesos que controlan la generación de los diferentes tipos de células del sistema nervioso, así como del establecimiento de sus conexiones no sólo nos va a permitir dilucidar como se desarrolla el cerebro y sus funciones, sino que también nos va a aportar conocimientos necesarios para la aplicación de terapias de sustitución celular en enfermedades neurodegenerativas.

La esperanza de vida es cada vez más larga y esto hace que la población en conjunto esté envejeciendo rápidamente con el consecuente incremento en la prevalencia de una gran variedad de enfermedades degenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la corea de Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica entre otras, para las que actualmente no hay tratamiento.

La investigación con células madre ofrece una gran esperanza para el tratamiento de dichas enfermedades debido al gran potencial reparador del que estas células disponen. Numerosos estudios se están llevando a cabo a cerca de las propiedades biológicas de estas células y sobre sus posibles aplicaciones terapéuticas. El conocimiento de los mecanismos exactos para guiar su diferenciación, así como el establecimiento de métodos efectivos para el aislamiento, enriquecimiento y propagación de una población homogénea, nos va a permitir disponer de valiosas herramientas para la terapia de muchas enfermedades hoy en día incurables, entre ellas, las del sistema nervioso.

1. CÉLULAS MADRE

1.1. Definición y propiedades

Las células madre son células primitivas que se caracterizan principalmente por: su potencial de auto-renovación, su habilidad de generar copias idénticas de ellas mismas durante largos periodos de tiempo (incluso durante toda la vida del organismo) y su capacidad de diferenciarse a células de múltiples linajes (Weissman, 2000). Sin embargo, las células madre presentan un variado rango en su potencial de diferenciación que va desde las células **totipotentes** del óvulo fecundado (el cigoto), capaces de formar células tanto del embrión como del tejido extraembrionario, a las **pluripotentes**, capaces de dar lugar a células de las tres capas germinales (p.ej. hepatocitos derivados del endodermo, neuronas derivadas del ectodermo y médula ósea derivada del mesodermo), a las **multipotentes**, capaces de formar células de un linaje restringido, o lo que es lo mismo, diferentes tipos de células específicas de un tejido (p.ej. células madre neurales (NSC del inglés *neural stem cells*) que dan lugar a neuronas, astrocitos y oligodendrocitos) y finalmente las células madre **unipotentes**, que son aquellas que únicamente son capaces de generar un tipo celular (p.ej. células madre epidérmicas que solo dan lugar a células epiteliales escamosas queratinizadas). Su potencialidad dependerá de su origen, es decir, del estadio de desarrollo y de la zona del organismo donde resida (McKay, 2000; Temple, 2001b) (figura 1).

Actualmente sabemos que existen células madre en todas las etapas del desarrollo de un organismo, desde el inicio hasta su muerte. El cuerpo humano está formado por 10 trillones de células, que se originan a partir de una sola célula, el óvulo fecundado. Esta célula va a experimentar varios ciclos de división hasta producir todas las células necesarias para formar los órganos y tejidos del organismo. Al mismo tiempo, estas células en división deben diferenciarse para formar células maduras funcionales que darán lugar a los 206 tipos celulares diferentes, que según sus características anatómicas y fisiológicas se pueden englobar en los principales tipos de tejidos del organismo.

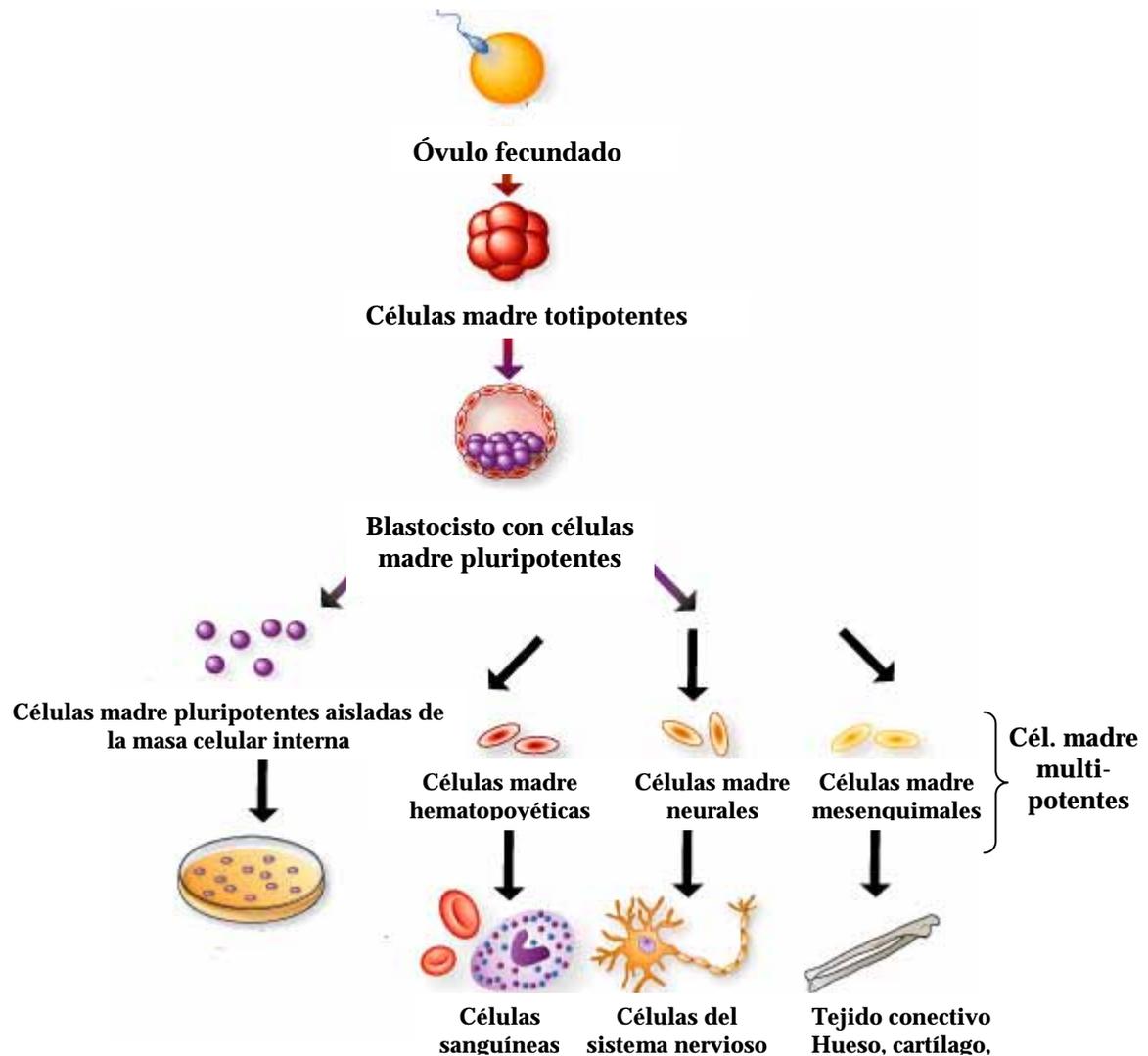


Figura 1. Diferentes tipos de células madre que podemos encontrar durante el proceso de desarrollo, desde un cigoto hasta la formación de tejidos maduros.

A medida que el desarrollo avanza, cada capa germinal adquiere sus propias células madre. Estas células se conocen como células madre somáticas o células multipotentes y están restringidas a dar lugar a la progenie de un tejido concreto, siendo menos potentes que las células madre más primitivas. Recientes estudios postulan que las células madre multipotentes presentan mayor plasticidad de la que se les atribuía previamente (Alison y col., 2004) sugiriendo que la restricción compartimental es debida a los efectos del micro ambiente del nicho en el que se encuentran (Spradling y col., 2001).

A lo largo de la vida, la reparación, reemplazo y regeneración compete a una comunidad de células que forman un organismo multicelular. Los diferentes tipos de células diferenciadas que forman los tejidos y órganos presentan una vida media limitada y requieren un constante reemplazo. Este reemplazo celular lo llevan a cabo células madre con una vida media larga pero que se dividen lentamente en cada tejido del organismo.

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 de células madre

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 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, 2001b).

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).

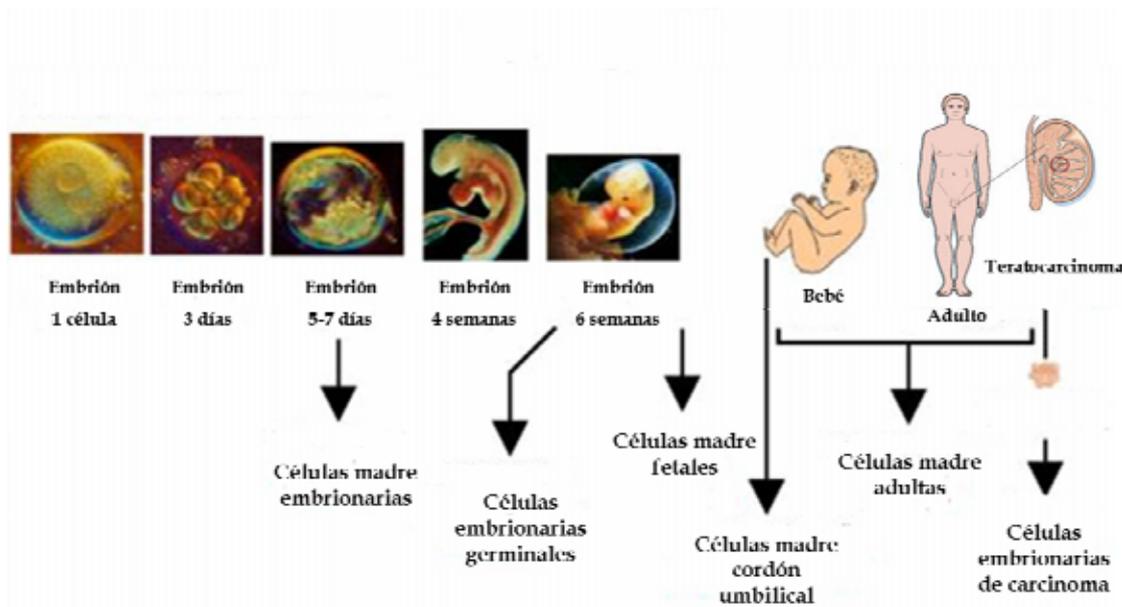


Figura 2. Tipos de células madre según su origen. Células madre con diferentes propiedades han sido extraídas de diferentes orígenes, cultivadas y analizadas por su potencial neurogénico.

1.2.1. Células madre embrionarias

Las células madre embrionarias (ESC, del inglés *Embryonic Stem Cells*) son líneas celulares pluripotentes establecidas a partir de un pequeño grupo de células de la masa celular interna del embrión pre-implantado en la etapa de desarrollo correspondiente al blastocisto (figura 2). Estas células se caracterizan por presentar, *in vitro*, una capacidad prácticamente ilimitada de auto-renovación y proliferación, así como de diferenciarse a todos los tipos celulares de un organismo (Evans y Kaufman, 1981; Wobus y col., 1984; Doetschman y col., 1985) incluidas las células germinales (Toyooka y col., 2003). Otras propiedades de las ESC indiferenciadas son: la expresión de antígenos específicos de superficie celular como SSEA-1 (Solter y Knowles, 1978), la expresión del factor de transcripción de dominio-POU, Oct3/4 (Pesce y col., 1999; Scholer y col., 1989)}, cuyos niveles de expresión van a determinar la pluripotencialidad de dichas células. Las ESC también se caracterizan por presentar una elevada actividad fosfatasa alcalina (Wobus y col., 1984) y una elevada actividad telomerasa (Prelle y col., 1999).

Las primeras líneas de ESC de ratón fueron establecidas en 1981 (Evans y Kaufman, 1981; Martin, 1981). Desde entonces y sobretodo a partir del aislamiento de las ESC humanas en 1998 (Thomson y col., 1998), este tipo de células han suscitado un gran interés como posible fuente de precursores o células diferenciadas para el desarrollo de terapias celulares, así como para estudios de desarrollo.

Una propiedad importante de estas células madre pluripotentes es su habilidad para dividirse simétricamente en cultivo y dar lugar a dos células hija que son copias exactas de la célula madre de la que derivan. Esta propiedad permite a las ESC ser expandidas en cultivo antes de inducir su diferenciación. Se conocen pocos factores que regulen o controlen la auto-renovación de estas células madre pluripotentes. Clásicamente, estas líneas celulares han sido aisladas y mantenidas en un estado indiferenciado sobre una capa de células alimentadoras ("feeder cells") de fibroblastos inactivados mitóticamente, sugiriendo que éstas les están aportando algún tipo de factor que suprime la diferenciación o bien promueve su auto-renovación. Uno de estos factores podría ser el factor inhibidor de leucemia (LIF del inglés *Leukemia inhibitory factor*), un miembro de una familia de citoquinas relacionadas con la interleucina-6 (Williams y col., 1988). En cultivos de ESC murinas, LIF puede reemplazar el requerimiento de la monocapa de células alimentadoras, mientras en ESC humanas no produce esta acción.

Se han descrito una gran variedad de protocolos que conducen la diferenciación de ESC de ratón hacia linajes particulares. Uno de los más utilizados consiste en el cultivo de estas células en forma de agregados en suspensión, lo cual lleva a la formación de los llamados cuerpos embrioides. La adición de diferentes tipos de factores tróficos y de crecimiento resultará en la diferenciación de las células hacia fenotipos determinados de las tres capas germinales: endodermo, ectodermo y mesodermo (figura 3). De esta manera, ha sido posible la derivación de poblaciones celulares hacia precursores neurales (Kim y col., 2002), cardíacos (Maltsev y col., 1993) o hepáticos (Jones y col., 2002). Sin embargo, para obtener poblaciones puras de células diferenciadas es

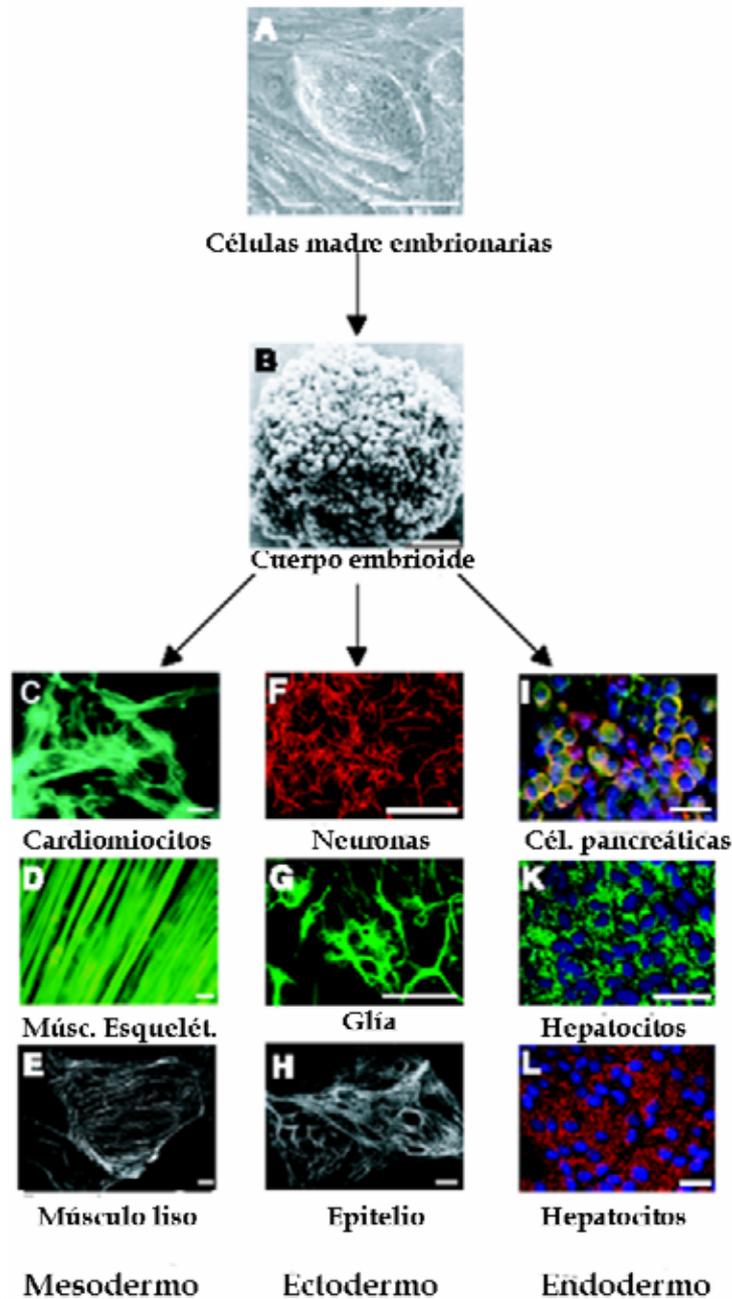


Figura 3. Diferenciación in vitro de ESC. Células madre indiferenciadas (A) forman in vitro agregados tridimensionales (cuerpos embrioides, B) que se diferenciarán a células de las tres capas germinales. Se muestran células diferenciadas marcadas con anticuerpos específicos de tejido (en paréntesis). C: cardiomiocitos (titin Z-band epitope). D: músculo esquelético (titin Z-band epitope) E: músculo liso (músculo liso α -actina). F: neuronal (β -III-tubulina). G: glial (GFAP, glial fibrillary acidic protein). H: células epiteliales (citoqueratina 8). I: células endocrinas pancreáticas [insulina (rojo), péptido C (verde), insulina y péptido C doble marcage (amarillo)]. K y L: hepatocitos (K, albúmina; L, α 1-antitripsina). Modificado de Wobus y Boheler, 2005.

necesario el uso posterior de métodos de selección del fenotipo requerido, que además nos va a permitir eliminar las posibles células pluripotenciales

presentes en el cultivo que pueden llevar a la formación de teratomas (importante hecho a tener en cuenta especialmente para la aplicación de dichas células en trasplantes). Estos métodos incluyen la selección por fluorescencia: FACS (del inglés *fluorescent activated cell sorting*), la selección inmunomagnética: MACS (del inglés *magnetic activated cell sorting*), selección mediante el uso de marcadores de superficie específicos de especie e incluso la utilización de promotores de genes específicos de un linaje o de un tipo celular acoplados a un gen de resistencia a un antibiótico.

La pluripotencialidad y capacidad proliferativa de las ESC permite disponer de una fuente inagotable de progenie diferenciada a cualquier tipo celular, y estas células diferenciadas pueden ser utilizadas para el trasplante celular, terapia genética y/o regeneración tisular.

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 estas 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 líneas de 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 embrionarias germinales 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). Éstas 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 células embrionarias germinales humanas de fetos abortados y han sido cultivadas *in vitro* (Shamblott y col., 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 y col., 1998).

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

1.2.3. Células embrionarias de carcinoma

La investigación con células madre se remonta a los años setenta, cuando células embrionarias de carcinoma, es decir, células derivadas de tumores gonadales denominados teratocarcinomas (Stevens, 1967b) fueron establecidas como líneas celulares (figura 2). Estas células madre pluripotentes, pueden mantenerse *in vitro* en un estado indiferenciado cultivándolas sobre una capa de células alimentadoras (Martin y Evans, 1974), y presentan la capacidad de diferenciarse a células de las tres capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo. Sin embargo no pueden generar células germinales (Kleinsmith y Pierce, 1964; Stevens, 1967a; Martin y Evans, 1974). Además estas células embrionarias de carcinoma han demostrado la habilidad de participar en el desarrollo embrionario, cuando se introducen en la masa celular interna de embriones para generar ratones quiméricos (Mintz y Illmensee, 1975).

Sin embargo, estas células muestran aberraciones cromosómicas (Papaioannou y col., 1975), pierden la capacidad de diferenciarse, y se diferencian solo bajo condiciones especiales *in vitro* (Nicolas y col., 1975) y mediante la adición de inductores químicos (McBurney y col., 1982). Estas propiedades junto con su origen tumoral animaron a los investigadores del momento a plantearse la búsqueda de otra fuente de células pluripotentes.

1.2.4. Células madre adultas y fetales

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 (figura 2). Normalmente son consideradas como multipotenciales: pueden dar lugar solamente a 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, 2001a)

Un ejemplo de este tipo de células multipotenciales son las NSC, que pueden aislarse del cerebro en desarrollo del feto o en el adulto (figura 2). Pueden ser expandidas en cultivo y son capaces de diferenciarse en los tres subtipos de células neurales: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Gage, 2000; Temple, 2001a).

1.2.4.1. Plasticidad de las células madre adultas.

Se ha demostrado la existencia de células madre adultas en muchos tejidos, aunque se encuentran en muy pocas cantidades: 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 dichos tejidos las células madre adultas son uno de los componentes esenciales de la homeostasis tisular ya que llevan a cabo continuos procesos de regeneración tisular así como de reemplazo de células senescentes o de restauración de la pérdida de funcionalidad debida a una enfermedad o trauma. Por ejemplo, las células madre hematopoyéticas de la médula ósea regeneran continuamente todas las células sanguíneas y del sistema inmunitario (Kondo y col., 2003), las células madre epiteliales producen a lo largo de toda la vida nuevas células de la piel y las células madre mesenquimales producen hueso, cartílago y células el tejido conectivo.

La identificación de células madre adultas que mantienen la plasticidad a lo largo del curso de la vida, ha transformado el campo de la biología de las

células madre. En los últimos años ha incrementado mucho el interés por este tipo celular, debido en parte a la controversia que rodea el uso potencial de las ESC para el tratamiento de enfermedades humanas. Muchos de los estudios realizados con células madre adultas, sugieren que estas presentan un potencial de diferenciación mayor del que se había imaginado. En ese caso, estas células podrían ser utilizadas como fuente de tejidos para uso clínico, así como para terapias autólogas, eliminando de esta manera el riesgo de rechazo al trasplante.

Las células madre adultas, sin embargo, son muy difíciles de aislar y obtener en grandes cantidades. Su capacidad de proliferación *in vitro* así como su potencial de diferenciación es mucho más reducido que el de las ESC o células embrionarias germinales (Temple, 2001a). Las células madre adultas se podrían definir como células multipotentes que se dividen de forma asimétrica dando lugar a la auto-renovación de la célula madre parental y a células hijas capaces de diferenciarse hacia un linaje específico. Sin embargo, trabajos recientes sugieren que las células madre adultas no están restringidas a un solo linaje, si no que bajo determinadas circunstancias son capaces de formar tipos celulares pertenecientes a otros tejidos maduros. Por ejemplo, células madre hematopoyéticas han sido diferenciadas a hepatocitos (Lagasse y col., 2000) o neuronas (Mezey y col., 2000; Brazelton y col., 2000) y NSC se han diferenciado a células hematopoyéticas (Bjornson y col., 1999). Incluso se ha descrito la obtención de células progenitoras multipotentes adultas a partir del cultivo *in vitro* de células madre mensesquimales. Estas células progenitoras multipotentes tienen capacidad de diferenciarse a células de las tres capas germinales (Reyes y col., 2001; Muguruma y col., 2003) es decir, que a partir de células madre pluripotentes hemos conseguido obtener células que presentan una potencialidad similar a la de las ESC. Esto nos sugiere que la plasticidad que presentan las células madre adultas representa un potencial revolucionario en la biología de las células madre con inmensas posibilidades.

Actualmente se desconoce el funcionamiento de esta plasticidad que puede ser atribuible tanto a células de la médula ósea como a otros tipos de células madre adultas, aunque se podría interpretar de varias maneras:

- existencia de un solo tipo celular de la médula ósea que da lugar a células madre circulantes que se instauran en multitud de tejidos, dando lugar a la regeneración del órgano en estado patológico.
- existencia de células madre adultas específicas de tejido que son capaces de cruzar los límites de su linaje de forma similar a las células madre de médula ósea, fenómeno conocido como transdiferenciación.
- fusión celular de células madre adultas con células somáticas que generan un híbrido celular que puede expresar un amplio rango de genes específicos de linaje, lo cual aparenta plasticidad (Terada y col., 2002; Wang y col., 2003).

A pesar de que la mayoría de estudios recientes sobre la plasticidad de las células madre genera tantas respuestas como preguntas, este debate abre nuevas oportunidades en la biología de las células madre con nuevas posibilidades terapéuticas.

1.2.4.2. Nichos de las células madre adultas.

Las células madre adultas se localizan en unos emplazamientos muy restringidos dentro del tejido en el que se encuentran, denominados nichos. Los nichos están compuestos por células especializadas que se encuentran dispuestas de una forma única alrededor de células madre y en ellos se generan una serie de señales ambientales que mantienen y regulan el comportamiento de las células madre.

En mamíferos se han descrito y caracterizado nichos correspondientes a células madre de la médula ósea, piel y folículo piloso, intestino y sistema nervioso, entre otros. Todos ellos presentan una serie de características comunes que se pueden resumir en tres:

- Están compuestos por un grupo de células que presentan una localización específica dentro del tejido en cuestión y esas células son las

que intervienen en el mantenimiento de las células madre así como en su anclaje físico. La estructura general del nicho puede variar y diferentes tipos celulares son los responsables de crear el micro ambiente correspondiente a dicho nicho. Por ejemplo, osteoblastos positivos para N-caderina forman el nicho de las células madre hematopoyéticas en la médula ósea (Calvi y col., 2003; Zhang y col., 2003a), mientras que células endoteliales son las que forman el nicho de las NSC (Doetsch, 2003; Ramirez-Castillejo y col., 2006).

- En el nicho se generan factores extrínsecos que, correctamente secretados, controlan la auto-renovación y la determinación hacia un linaje concreto de las células madre que en él se encuentran. Se han descrito muchas moléculas de señalización que podrían estar interviniendo en la regulación del comportamiento de las células madre como: Sonic hedgehog (Shh), Wnts , proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs, del inglés *bone morphogenetic proteins*), factor de crecimiento fibroblástico (FGF, del inglés *fibroblast growth factor*) , Notch, Ang-1, LIF, etc.. (Ivanova y col., 2002; Ramalho-Santos y col., 2002; Reya y col., 2003; Duncan y col., 2005)
- En los nichos las células madre se dividen de forma asimétrica generando una célula hija que se va a quedar en el nicho y que presenta propiedades de célula madre (auto-renovación) y otra célula hija que va a abandonar el nicho para proliferar y diferenciarse dando lugar a una célula madura funcional (Smith, 2005; Urbanek y col., 2006)

En estos nichos se va a producir la regulación ambiental de los programas genéticos intrínsecos de las células madre que controlan su comportamiento y que mantienen un delicado balance entre la auto-renovación y la diferenciación de éstas, lo que va a hacer que la función homeostática que desarrollan las células madre en los tejidos en los que se encuentran se mantenga durante toda la vida del organismo.

1.2.4.3. Neurogénesis en el cerebro adulto

La complejidad del circuito neural del cerebro se ha considerado durante mucho tiempo incompatible con la adición de nuevas neuronas. Es más, la lógica ha dominado siempre el pensamiento de que la adición de nuevas neuronas a un sistema totalmente integrado y funcional alteraría los circuitos existentes. Por eso, durante mucho tiempo se ha pensado que en el cerebro de un mamífero adulto no podían nacer nuevas neuronas, únicamente podían morir. Sin embargo, estudios recientes han establecido que en el cerebro adulto se mantienen discretas regiones donde se produce el nacimiento de nuevas neuronas. Estas zonas germinales parecen ser restos latentes del programa de desarrollo que inicia la formación del cerebro y se mantienen durante toda la vida del organismo.

En el cerebro adulto de roedores las NSC están concentradas principalmente en dos zonas: la zona subventricular de la pared del ventrículo lateral y la zona subgranular del giro dentado del hipocampo (figura 4). Las células nacidas en la zona subventricular migran anteriormente a través de la ruta migratoria rostral recorriendo una larga distancia hasta llegar al bulbo olfativo, donde se diferencian a interneuronas (Doetsch y col., 1997; Alvarez-Buylla y col., 2002). Por otro lado, las neuronas del giro dentado nacen localmente en las capas de la zona subgranular y recorren una pequeña distancia para integrarse en el giro dentado (Gage, 2000). De estas dos regiones se pueden aislar células, que se pueden expandir *in vitro* y se diferencian a los tres linajes neurales (Vescovi y col., 1993; Morshead y col., 1994; Gritti y col., 1996; Palmer y col., 1997).

La búsqueda de la identidad de estas NSC multipotentes con capacidad de auto-renovación ha sido objeto de estudio durante mucho tiempo y ha generado resultados contradictorios, debido, en parte, a la dificultad de identificar una célula que parece ser quiescente y que no presenta marcadores específicos.

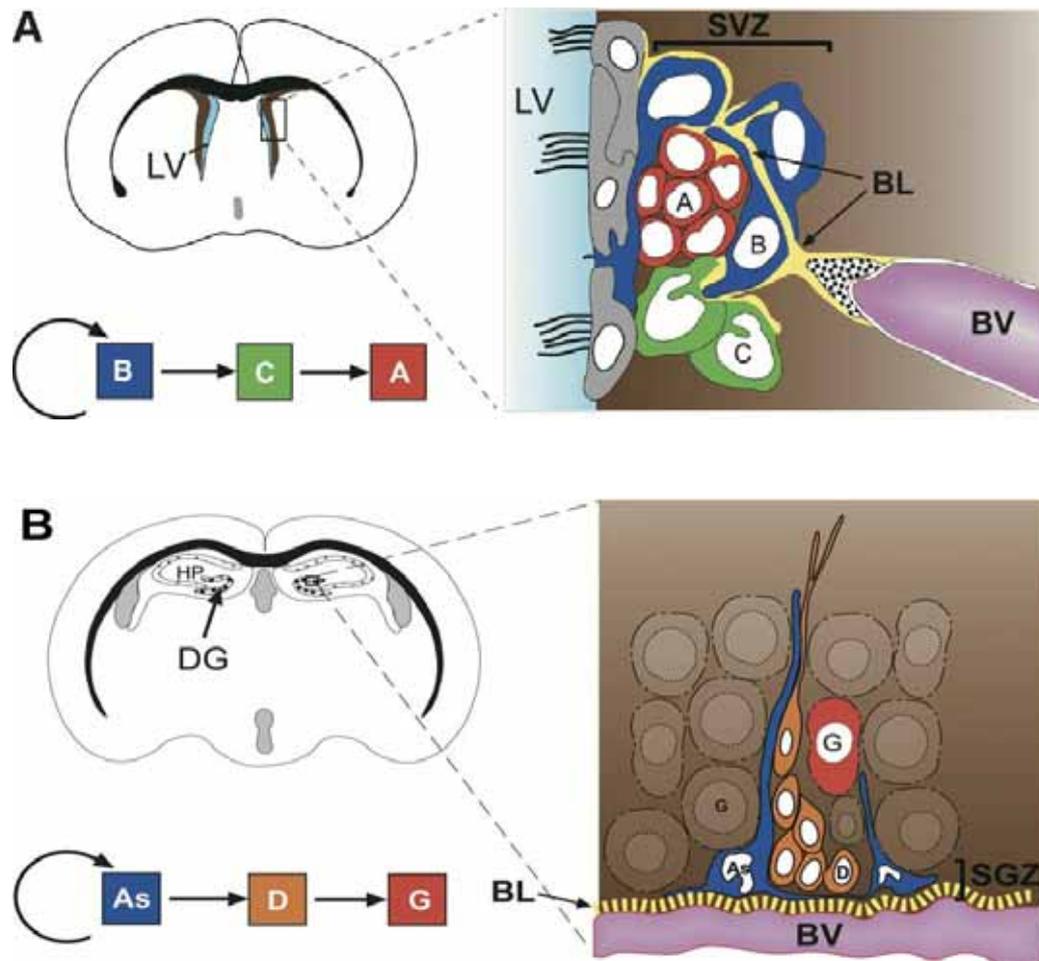


Figura 4. Zonas neurogénicas en el cerebro de ratón adulto. (A) La zona subventricular (SVZ) adyacente a los ventrículos laterales (LV) contiene NSC GFAP-positivas (células B, en azul) que mantienen el contacto con la lámina basal (BL) de los vasos sanguíneos (BV). Estas células generan unas células 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 olfativo. (B) La zona subgranular (SGZ) del Giro Dentado (DG) del Hipocampo (HP) acoge otra población de NSC (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).

Estudios de microscopía electrónica han permitido una reconstitución detallada de la citoarquitectura de la zona subventricular (Doetsch y col., 1997) demostrando la identidad de las NSC y también un mapa interactivo célula a célula de la zona. En estudios posteriores se describió que células GFAP positivas de la zona subventricular ocasionalmente entran en contacto con la superficie ventricular (Doetsch y col., 1999; Conover y col., 2000), lo cual es vital

para establecer la célula neurogénica GFAP positiva de la zona subventricular como una célula multipotente. Apoyando esta corriente surgen varios trabajos describiendo que las NSC presentan características estructurales y moleculares similares a las de los astrocitos (figura 4) (Doetsch y col., 1999; Seri y col., 2001; Imura y col., 2003). Así mismo, estudios en pájaros adultos y sobre el desarrollo de la corteza de mamíferos han demostrado que células con características de glia radial funcionan también como precursores primarios de nuevas neuronas (Parnavelas y Nadarajah, 2001). Es decir, que las células madre neurogénicas parece ser que presentan características de las células clásicamente consideradas de un linaje astrogial, lo cual ha cambiado por completo los conceptos tradicionales sobre el desarrollo del cerebro, así como de la identidad de las células madre.

En el nicho de la zona subventricular se encuentran cuatro tipos celulares que constituyen dicha región (Doetsch y col., 1997) (figura 4a). Una monocapa de células endoteliales ciliadas se encuentra rodeando la pared del ventrículo lateral. Estas células son las responsables de producir factores de señalización (noggin, BMPs, Shh, Notch, etc...) que regularán el comportamiento de las NSC. Adyacentes al ventrículo y en ocasiones en contacto con él se encuentran las células B que son las células madre de la zona subventricular positivas para el marcador astrocitario GFAP y que también se encuentran en contacto con la lámina basal de los vasos sanguíneos. Estas células tienen una gran capacidad de auto-renovación y dan lugar a las células de tipo C, que son células de rápida amplificación (*transit amplifying cells*) que darán lugar a las células A, neuroblastos que migran hacia el bulbo olfativo donde se diferenciarán a interneuronas (Doetsch y col., 1997).

En el nicho de la zona subgranular del hipocampo también podemos encontrar diferentes tipos de células que lo constituyen (figura 4b). En contacto con la lámina basal de los vasos sanguíneos encontramos células GFAP positivas que son las células madre de la zona subgranular y que van a dar lugar a los progenitores neuronales (células D) que maduran para convertirse en neuronas granulares (células G) (Seri y col., 2004).

En estos micro ambientes neurogénicos se generan una serie de señales que están implicadas en la regulación de la biología de las NSC. Las vías de señalización implicadas en estos procesos son aquellas que intervienen durante el desarrollo embrionario, que incluyen Notch, Eph/ephrins, Shh y BMPs y que son retenidas en los nichos adultos para regular aspectos importantes de la proliferación y diferenciación de las NSC (Lim y col., 2000; Stump y col., 2002; Conover y Allen, 2002; Lai y col., 2003). Sin embargo, los tipos celulares específicos de la zona subventricular y zona subgranular donde se dan esas cascadas de señalización, las condiciones fisiológicas que producen la señalización en cada vía, y la relación entre ellas que produce la respuesta apropiada son cuestiones centrales todavía por resolver.

La existencia de la neurogénesis no cambia del todo nuestra concepción del cerebro, pero sí el fenómeno del reemplazo neuronal (Nottebohm, 2002), el cual abre nuevas posibilidades para la reparación del cerebro frente a lesiones o enfermedades neurodegenerativas.

2. TERAPIA CELULAR PARA ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS

El sistema nervioso, a diferencia de otros tejidos, presenta una capacidad limitada de reparación; las células nerviosas maduras no se regeneran y las NSC, a pesar de su existencia incluso en el cerebro adulto, presentan una capacidad restringida de generar nuevas neuronas funcionales en respuesta a un daño. Por esta razón, existe un gran interés en la posibilidad de poder reparar el sistema nervioso mediante el trasplante de nuevas células que puedan reemplazar aquellas que se han perdido durante una enfermedad o traumatismo.

Dada la complejidad de los circuitos cerebrales y de su función, este planteamiento parece ser remoto. Sin embargo, existen evidencias de estudios realizados en animales que muestran que el reemplazo neuronal y la reconstitución parcial de los circuitos neuronales es posible. Estos resultados despiertan la posibilidad de nuevas terapias para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas humanas incurables.

En la mayoría de los casos los efectos terapéuticos de las neuronas o precursores neurales implantados dependen de la integración estructural y funcional en el cerebro. Las neuronas sobreviven y se integran correctamente después del trasplante sólo cuando son inmaduras, es decir, en un estado del desarrollo en el que estén diferenciadas pero no hayan establecido conexiones axonales. Su habilidad para reestablecer conectividades recíprocas con el cerebro receptor también depende de la edad del individuo; es máxima durante el periodo fetal y va disminuyendo gradualmente durante el desarrollo postnatal. A pesar de esto, se ha descrito el establecimiento de conexiones funcionales de neuronas trasplantadas en un cerebro adulto. Además, esta capacidad de establecer conexiones se ve incrementada cuando el circuito del cerebro receptor está dañado, sugiriendo que los mecanismos que regulan la diferenciación neuronal y la conectividad durante el desarrollo deben reactivarse cuando se producen lesiones o cambios degenerativos (Sotelo y varado-Mallart, 1991; Snyder y col., 1997). Por ejemplo, las células que han perdido sus aferencias liberan una serie de factores que estimulan el crecimiento axonal, promoviendo así su reinervación por parte de las células trasplantadas (Bjorklund, 1994).

Sin embargo, la recuperación del circuito neuronal no es siempre un prerrequisito de la recuperación funcional. Las células trasplantadas pueden liberar neurotransmisores (como dopamina, acetilcolina o ácido γ -aminobutírico (GABA del inglés *gamma aminobutiric acid*)) de manera tónica no regulada, o pueden producir factores neurotróficos o neuroprotectores que retrasen la degeneración o promuevan la regeneración. Además, el trasplante de células gliales se puede utilizar para modificar la respuesta al daño y para asistir en la reparación estructural (Raisman, 1997), o promover la remielinización en enfermedades desmielinizantes (Duncan y col., 1997).

Diferentes aproximaciones de terapia celular pueden aplicarse para mejorar déficits funcionales en el cerebro adulto. Estas aproximaciones se pueden clasificar básicamente en dos grupos: terapias de sustitución celular o

terapias de estimulación de la propia capacidad regenerativa del cerebro mediante la inducción de la neurogénesis.

2.1. Auto-reparación a partir de células madre endógenas

La proliferación, supervivencia y muerte de las NSC o progenitores neuronales endógenos están altamente regulados (Alvarez-Buylla y col., 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 y col., 1997; Van Praag y col., 2000; Nottebohm, 2002; Lie y col., 2004). El stress, por el contrario, reduce la neurogénesis (Duman y col., 1999), probablemente por la acción negativa de los glucocorticoides (Cameron y McKay, 1999).

Como ya hemos dicho anteriormente, el sistema nervioso central adulto presenta una capacidad de reparación muy limitada. Esto es debido probablemente a la falta de señales apropiadas que activen un número adecuado de NSC endógenas y que instruyan adecuadamente la diferenciación de éstas para su participación en la reparación del daño (Peterson, 2002). 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, del inglés *epidermic growth factor*) (Craig y col., 1996; Teramoto y col., 2003), el FGF-2 (Kuhn y col., 1997; Wagner y col., 1999b; Yoshimura y col., 2001; Jin y col., 2002), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés *brain derived neurotrophic factor*) (Zigova y col., 1998; Benraiss y col., 2001; Gustafsson y col., 2003; Chmielnicki y col., 2004), el factor de crecimiento parecido a la insulina-1 (IGF-1, del inglés *insulin like growth factor-1*) (Aberg y col., 2000), el factor de crecimiento transformado- α (TGF- α , del inglés *transforming growth factor- α*) (Fallon y col., 2000), la eritropoyetina (Shingo y col., 2001), inhibidores de caspasas (Ekdahl y col., 2002), anti-inflamatorios (Ekdahl y col., 2003; Monje y

col., 2003) y anti-depresivos (para revisión ver Elder y col., 2006). 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 y col., 2004). Se ha postulado que los incrementos de neurogénesis observados tras el ejercicio o el aprendizaje pueden estar mediados, de hecho, por el aumento de estos factores tróficos (Goldman, 1998; Van Praag y col., 1999).

La neurogénesis aumenta también como consecuencia del daño o degeneración neuronal (figura 5). Se sabe que ciertas lesiones, como la isquemia global o parcial (Peterson, 2002; Parent y col., 2002; Jin y col., 2003) o enfermedades neurodegenerativas como es el caso de la enfermedad de Huntington (Curtis y col., 2003) estimulan la proliferación de precursores de la zona subventricular, que migran a la zona dañada y adquieren un fenotipo neuronal correcto (Arvidsson y col., 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 y col., 2002), lo que demuestra que el cerebro adulto realmente conserva la capacidad de regenerarse.

También en regiones no neurogénicas, como el la corteza cerebral, 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 y col., 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

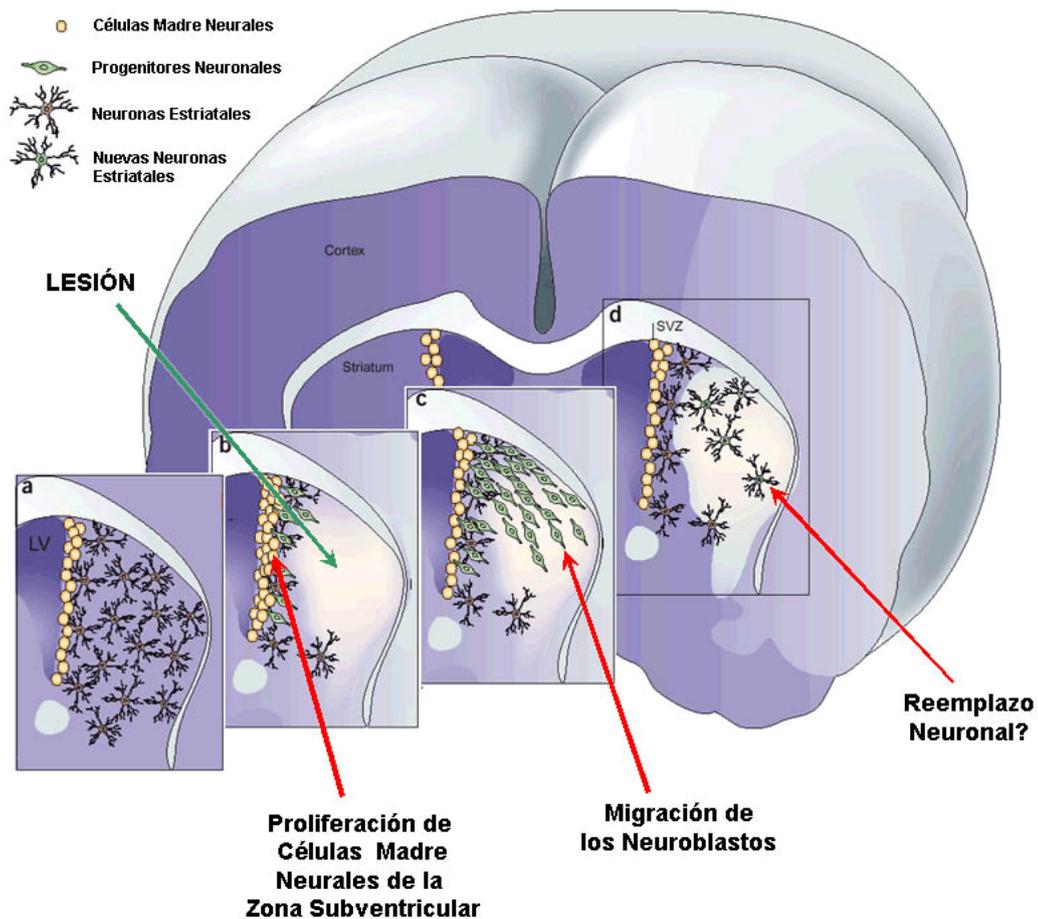


Figura 5. Auto-reparación neuronal a partir de células madre endógenas. (a-b) Una lesión que elimine la mayor parte de las neuronas estriales puede inducir la proliferación de las células madre de la zona subventricular (SVZ) adyacente al ventrículo lateral (LV). (c) Estas nuevas células pueden generar neuroblastos que migrarán hacia la región lesionada. (d) Algunas de estas células se diferencian a nuevas neuronas con características estriales. Modificado de Lindvall y col., 2004.

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 sustitución

La terapia de sustitución celular lleva muchos años practicándose con éxito para el tratamiento de leucemias, linfomas y diferentes alteraciones sanguíneas.

El impacto del potencial clínico del reemplazamiento celular en enfermedades neurodegenerativas se mostró con el trasplante de células mesencefálicas fetales en pacientes con la enfermedad de Parkinson, que supuso una mejora sintomática durante un largo periodo de tiempo a varios de los pacientes tratados (Bjorklund y Lindvall, 2000). Sin embargo la gran variabilidad en la efectividad de dichos trasplantes derivada en muchos casos de la heterogeneidad de las células trasplantadas, junto con los problemas éticos derivados del uso de células fetales hizo que se dejaran de practicar.

Actualmente, la búsqueda de una fuente de células de fácil manipulación y obtención que permita disponer de grandes cantidades de células de un fenotipo concreto en momentos determinados para el trasplante en pacientes ha hecho que la investigación con células madre sea uno de los campos de mayor actividad en el mundo científico, y en concreto la investigación con ESC, debido sobretodo, a la gran potencialidad que representa para el tratamiento de muchas enfermedades que hasta el momento no disponen de terapia. A la hora de diseñar una terapia celular se han de considerar una serie de parámetros (figura 6):

1. Enfermedad a tratar

- **Patogénesis:** el éxito del reemplazo celular requiere que las células trasplantadas no sean afectadas por la enfermedad. Por ejemplo, si la degeneración es debida a una toxicidad persistente en el tejido, como es el caso de la mayoría de enfermedades desmielinizantes, esto afectará a las células trasplantadas.
- **Localización:** la terapia celular es más accesible cuando la enfermedad afecta a poblaciones discretas localizadas en una región concreta del cerebro. El reemplazo de células que se encuentran

distribuidas por amplias zonas requerirá múltiples trasplantes y/o la migración de las células trasplantadas, lo cual no es siempre posible.

- Progresión de la enfermedad: en diversas condiciones patológicas la degeneración afecta a diferentes poblaciones neuronales de una manera progresiva, frecuentemente a través de vías de conexión. El conocimiento de la progresión de la enfermedad será necesario para determinar el momento en el que el trasplante de células va a ser más efectivo.

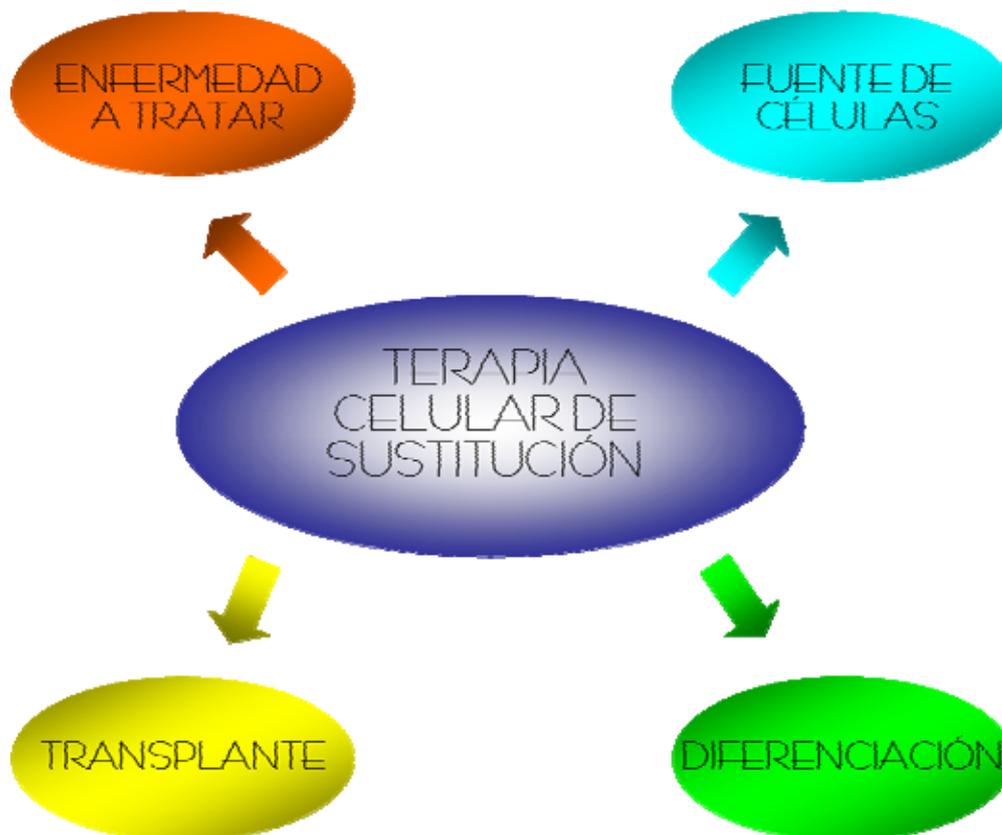


Figura 6. Elementos a considerar en una terapia de sustitución celular. En primer lugar la enfermedad a tratar, las diferentes fuentes de donde se pueden obtener células madre, los mecanismos de diferenciación hacia el tipo celular adecuado y por último el trasplante en un sujeto adulto.

2. **Fuente de células madre** que se va a emplear, obtención y aislamiento. Las células madre deben disponer de unas características y un potencial intrínseco que junto con las propiedades específicas del ambiente del tejido receptor aseguren un trasplante exitoso que incluya la

supervivencia, la adquisición o el mantenimiento de un fenotipo específico y la integración en el tejido receptor.

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. **Trasplante** 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.

2.2.1. Obtención y manipulación de células madre

Existen varias fuentes de células madre que presentan diferentes propiedades en cuanto a su potencial de diferenciación, proliferación y auto-renovación (ver capítulo 1.2). Los principales tipos de células que se han estudiado por su posible aplicación en terapias de sustitución de enfermedades neurodegenerativas son:

- ✓ ESC
- ✓ NSC tanto de tejido fetal como de origen adulto
- ✓ Células madre adultas no neurales
- ✓ Líneas de células inmortalizadas

Las **ESC** presentan tres características que las hace especialmente atractivas a la hora de ser la fuente de células para una terapia de sustitución: pueden mantenerse en cultivo casi indefinidamente sin sufrir alteraciones cromosómicas (gran potencial de proliferación y auto-renovación); pueden ser manipuladas genéticamente lo cual va a permitir, por ejemplo, la reparación de la pérdida de funcionalidad de genes; y por último se han establecido un gran número de protocolos de diferenciación que permiten la generación de

prácticamente cualquier tipo celular (pluripotencialidad), ya sea mediante el uso de condiciones de cultivo especiales o mediante la manipulación genética. Hasta el momento ESC han sido extraídas de blastocistos de ratón, mono y hombre (Thomson y col., 1995; Thomson y col., 1996; Thomson y col., 1998; Reubinoff y col., 2000). Los inconvenientes que suscita el uso de estas células pluripotentes para terapias de sustitución celular, a pesar de su gran potencial son: la posibilidad de generación de tumores tras el trasplante si no se ha podido controlar correctamente su diferenciación; problemas de rechazo inmunitario tras el trasplante y por último, aunque no menos importante, problemas éticos derivados del uso de embriones humanos para la obtención de células madre.

Las **NSC** pueden ser aisladas de diversas regiones del sistema nervioso central tanto de fetos como de adultos. Para aislar las NSCs de un cultivo primario heterogéneo es necesario cultivarlas en unas condiciones que, por un lado provocan la muerte de las células más maduras mientras que por otro favorecen la supervivencia y proliferación de las NSC (Bottai y col., 2003). Las condiciones de selección se basan en el cultivo de NSC en suspensión en presencia de factores de crecimiento como EGF y/o FGF-2 que hacen que proliferen y formen pequeños agregados clonales en 2 o 3 días. Estos agregados se expanden y forman grandes colonias llamadas neuroesferas. Éstas se pueden pasar, disociar y volver a cultivar dando lugar a neuroesferas secundarias y así sucesivamente. De esta manera, podemos incrementar bastante el número de NSC. El potencial de diferenciación de las NSC es menor que el de las ESC, pero se ha descrito que las neuroesferas presentan la capacidad de generar diferentes poblaciones de células neurales, tanto *in vitro* como *in vivo* (Gage y col., 1995). En cultivo, los tres tipos de células neurales, neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, han sido obtenidos a partir de neuroesferas y las proporciones relativas de cada uno de ellos se puede alterar mediante la modificación del medio de cultivo en el que crecen (Doetsch y col., 1999; Johansson y col., 1999; Gage, 2000). Uno de los inconvenientes que presentan las

NSC es que se encuentran en un número muy bajo y en ocasiones su aislamiento y purificación pueden ser complicados. Así mismo, su capacidad de producir neuroesferas *in vitro* declina progresivamente con la edad de embrión, y del mismo modo, a medida que avanza la edad del adulto (Temple, 2001a). Esto indica que no todas las NSC son iguales, sino que van a presentar diferentes propiedades en función de la región y del momento temporal en el que sean aisladas, lo que se tendrá que tener en cuenta a la hora de reproducir resultados.

Otro inconveniente de las NSC es que no se pueden mantener en cultivo indefinidamente ya que a medida que van experimentando sucesivos pases su capacidad de auto-renovación va disminuyendo. Y al igual que las ESC, la utilización de tejido fetal para el aislamiento de NSC también conlleva problemas éticos.

Una fuente emergente de células para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central son **las células madre adultas no neurales**. Por ejemplo, se ha descrito que células madre de la médula ósea entran en el sistema nervioso central y se diferencian a poblaciones neuronales, aunque la frecuencia de su integración no está clara (Wagers y col., 2002; Mezey y col., 2003). De forma similar, se ha descrito que células madre mesenquimales derivadas del mesodermo son capaces de generar astrocitos y neuronas *in vivo* (Rivera y col., 2006) e *in vitro* (Sanchez-Ramos y col., 2000; Mareschi y col., 2006; Krampera y col., 2007). Existen numerosas ventajas a la hora de usar células madre mesenquimales sobretodo por ser una fuente relativamente accesible de células madre de la que se dispone extensa experiencia clínica y también por tratarse de auto-trasplantes que van a evitar tanto los problemas de rechazo como problemas éticos.

Además las células madre mesenquimales parece ser que sobreviven una vez implantadas en el cerebro y migran ampliamente. Algunas de ellas se diferencian a células astrogliales pero el tratamiento *in vitro* específico utilizando medios de cultivo condicionados que favorezcan el enriquecimiento,

instrucción o selección del linaje neural permitirá la obtención de neuronas a partir de células madre mesenquimales (Clarke y col., 2000; Lu y col., 2004; Black y Woodbury, 2001; Yang y col., 2006). Existen evidencias del efecto beneficioso de estas células en el tratamiento de alteraciones del sistema nervioso central como es el caso del estudio en el que se implantan células madre de médula ósea adulta en sitios de degeneración (Akiyama y col., 2002; Cabanes y col., 2007) o el estudio en el que células madre derivadas de la médula ósea parece que incrementan la reparación en enfermedades desmielinizantes (Nandoe y col., 2006). Sin embargo, todos esos efectos beneficiosos pueden ser debidos a diversos factores que incluyen, que las células implantadas actúen como barrera protectora para las neuronas dañadas, o que aporten soporte trófico que incremente la plasticidad cerebral o la resistencia frente a la enfermedad. Así pues, debido a la falta de conocimientos respecto al mecanismo por el cual se producen esos efectos beneficiosos el uso de estas células para el tratamiento de daño cerebral debe ser objeto de profundo estudio.

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 y col., 1988; Frederiksen y col., 1988). 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* (Martinez-Serrano y Bjorklund, 1997; Akerud y col., 2001).

2.2.2. Diferenciación de células madre

El principal reto a la hora de desarrollar una terapia efectiva de sustitución celular es el de dirigir la diferenciación de las células madre para que reemplacen específicamente aquellas que se han perdido o dañado en la enfermedad a tratar. Es necesario, por lo tanto, establecer procedimientos que conduzcan eficazmente a las células madre hacia los tipos específicos de neuronas o células gliales que se precisen en cada caso.

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 (Arenas, 2002; Lindvall y col., 2004). Para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica sería de gran utilidad la generación de neuronas de tipo colinérgico (Arber y col., 1999; Jessell, 2000; Wichterle y col., 2002; Lim y col., 2006). Las neuronas secretoras de GABA, por otro lado, podrían ser utilizadas para el tratamiento de la enfermedad de Huntington u otras patologías (ver capítulo 3.6).

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 y col., 1999; Liu y col., 2000), a partir de NSC (Carpenter y col., 1999; Zhang y col., 2000), y a partir de células madre de la médula ósea (Deng y col., 2001; Kohyama y col., 2001).

2.2.2.1. Diferenciación espontánea hacia fenotipos neurales

Para dirigir la diferenciación de las células madre *in vitro* se han descrito diferentes métodos. Uno de los más utilizados para llevar a cabo la diferenciación de ESC hacia un tipo celular definido es el cultivo en suspensión que da lugar a la formación de unos agregados celulares denominados cuerpos embrioides (Doetschman y col., 1985; Keller, 1995; Wobus y Boheler, 2005) en los que la diferenciación celular sucede espontáneamente (Coucouvanis y Martin, 1999; Park y col., 2004; Rathjen y Rathjen, 2001; Vallier y col., 2004). Cada cuerpo embrioide desarrolla múltiples tipos celulares que al adherirlos sobre una placa, van a salir y van a continuar su diferenciación. Pero la diferenciación neural que se consigue es muy baja (Itskovitz-Eldor y col., 2000). También las NSC se diferencian espontáneamente cuando se les retiran los factores mitógenos o durante la formación de neuroesferas (Gage, 2000; Tropepe y col., 1999). Sin embargo, en ambos casos vamos a conseguir una población heterogénea de células diferenciadas, muy lejos de lo que se pretende que 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 pueden seguir diferentes metodologías desde la diferenciación espontánea en medios específicos que van a seleccionar una población concreta, a la adición de factores solubles al medio o la manipulación genética que dirijan la diferenciación hacia el fenotipo deseado (figura 7). A continuación se describen varios de ellos.

2.2.2.2. Utilización de factores que inducen la diferenciación neuronal

Una de las estrategias más utilizadas a la hora de diferenciar células madre hacia un fenotipo neuronal es la utilización de factores solubles o genéticos que nos van a dirigir la diferenciación de una forma mucho más controlada. Para ello se intenta imitar el patrón de estímulos que una célula recibe durante su desarrollo natural, por acción de su entorno inmediato. *In vivo*, BMP-4 participa en la diferenciación neural siguiendo el modelo por defecto (Jessell, 2000; Panchision y McKay, 2002; Linker y Stern, 2004), en el que

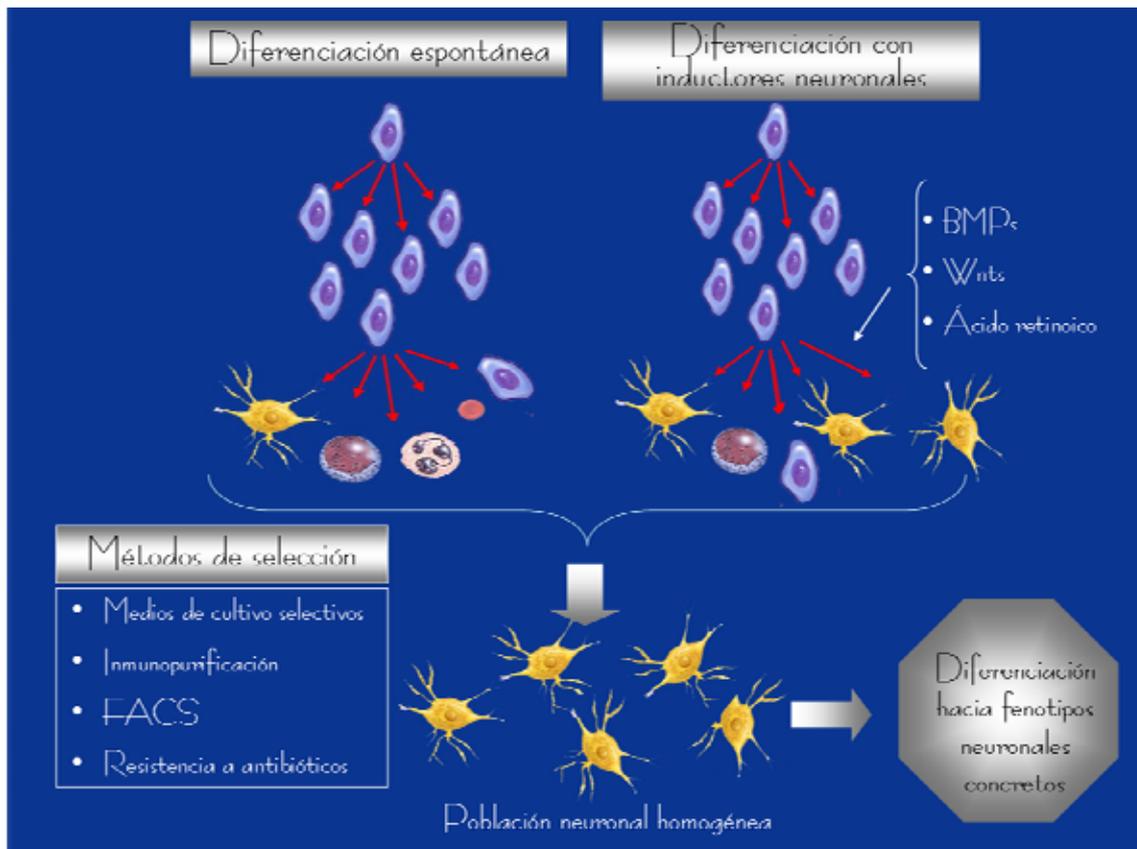


Figura 7. Estrategias de diferenciación de células madre en cultivo hacia fenotipos neuronales específicos. Las células madre se mantienen en cultivo en estado indiferenciado y proliferante mediante la presencia de factores mitogénicos o que promueven la auto-renovación. Con la eliminación de estos factores se puede inducir la diferenciación de varias maneras, o bien espontáneamente, lo cual da lugar normalmente a una población heterogénea, o bien mediante el uso de factores neurogénicos como BMPs, Wnts y ácido retinoico. En este caso la población estará enriquecida en neuronas pero es posible que el cultivo presente un pequeño porcentaje de células madre no diferenciadas o células diferenciadas a otros fenotipos. La utilización de métodos de selección como el FACS, uso de medios de cultivo selectivos, inmunopurificación, etc., permite conseguir una población neuronal homogénea sobre la que se pueden aplicar factores solubles extrínsecos o genéticos que nos dirijan la diferenciación hacia un fenotipo neuronal concreto, como por ejemplo el GABAérgico, Dopaminérgico o Colinérgico.

este factor es crucial para la decisión entre un destino epidérmico o neural (Moreau y Leclerc, 2004), ya que induce por acción directa la diferenciación epidérmica, mientras que cualquier elemento que lo inhiba conducirá a la determinación del neuroectodermo. Así pues, la expresión constitutiva de Noggin (Lim y col., 2000) o Chordin (Gratsch y O'Shea, 2002) en ESC o el cultivo de éstas en presencia de estos dos antagonistas de BMP-4 en el medio de cultivo supone el crecimiento rápido de poblaciones que expresan neurofilamento, con un elevado porcentaje de neuronas (Gratsch y O'Shea, 2002). Diversos estudios también han demostrado que la expresión de SFRP-2 o

Dickkopf-1, antagonistas de la vía de Wnts estimula la diferenciación neural de las ESC (Aubert y col., 2002; Kielman y col., 2002; Verani y col., 2007). El mecanismo podría suponer la inhibición de las BMPs, ya que la activación de dicha vía aumenta la expresión de BMP-4 y BMP-7, inhibidores específicos de la diferenciación neural (Otero y col., 2004). La expresión constitutiva de otros factores como la neurogenina (Sun y col., 2001; Quan y col., 2004) o la isoforma C de Shh (Conti y col., 2001) también inducen la diferenciación neuronal.

El ácido retinoico es otro factor que juega un papel importante durante el desarrollo embrionario y tardío, particularmente en el proceso de diferenciación neural (Maden, 2000; McCaffery y Drager, 2000). La formación de linajes neurales a partir de células pluripotentes en respuesta a ácido retinoico fue demostrado inicialmente utilizando células embrionarias de carcinoma (Jones-Villeneuve y col., 1982; Jones-Villeneuve y col., 1983) y subsecuentemente en ESC cultivadas formando cuerpos embrioides en presencia de diferentes concentraciones de ácido retinoico (Bain y col., 1995; Fraichard y col., 1995; Strubing y col., 1995). Se ha descrito que la formación de precursores neurales incrementa entre cinco y diez veces en presencia de ácido retinoico (Bain y col., 1995; Okada y col., 2004) y un 50-70% de las células exhiben propiedades de células neurales o gliales, incluyendo la expresión de NeuN, Tuj-1 y GFAP tras la disociación y cultivo en medio de cultivo sin suero (Fraichard y col., 1995; Okada y col., 2004; Strubing y col., 1995; Wichterle y col., 2002).

La inducción neural de las ESC se ha conseguido también mediante métodos alternativos como el co-cultivo de éstas con la línea celular estromal PA6 que resulta en una diferenciación neural directa y efectiva con un 92% de colonias que expresan el marcador neural N-CAM (Kawasaki y col., 2000; Kitajima y col., 2005). También se ha descrito la diferenciación de ESC hacia linajes neurales mediante el cultivo de agregados en presencia de un medio condicionado de la línea celular del carcinoma hepatocelular humano (Rathjen y Rathjen, 2002) o medio condicionado de cultivos gliales (Wagner y col., 1999a; Song y col., 2002; Hall y col., 2003; Bentz y col., 2006).

2.2.2.3. Utilización de factores que inducen fenotipos neuronales Dopaminérgicos, Colinérgicos y GABAérgicos

A la hora de aplicar una terapia celular para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, en la mayoría de los casos el objetivo va a ser la sustitución de la población celular concreta que ha degenerado o muerto, así pues, la diferenciación de las células madre hacia fenotipos neuronales específicos va a ser de vital importancia. Diferentes factores se han utilizado para guiar la diferenciación de células madre hacia neuronas Dopaminérgicas con el fin de aplicar una terapia en la enfermedad de Parkinson o hacia neuronas GABAérgicas para la aplicación de una terapia de sustitución en la enfermedad de Huntington.

En el caso de la diferenciación hacia un fenotipo Dopaminérgico, que es uno de los más estudiados, se han seguido diversas estrategias (Arenas, 2002; Lindvall y col., 2004; Iacovitti y col., 2007) . Factores tales como FGF-2, FGF-8, Shh, ácido ascórbico, monofosfato de adenosina cíclico (AMPc, del inglés *adenosine monophosphate cyclic*) o BDNF se han utilizado para la diferenciación dopaminérgica de ESC tratando de simular el proceso de desarrollo natural de éstas neuronas *in vivo* (Lee y col., 2000a; Barberi y col., 2003). También se ha conseguido dirigir el proceso de diferenciación dopaminérgica de las ESC así como de las NSC mediante manipulaciones genéticas, especialmente mediante la sobre-expresión de Nurr-1, un gen esencial para la formación de las neuronas dopaminérgicas en el desarrollo del mesencéfalo ventral (Wagner y col., 1999a; Kim y col., 2002; Kim y col., 2006) o también mediante la introducción del gen Bcl-x_L (Liste y col., 2004; Shim y col., 2004) o mediante la introducción del gen Pitx-3 (Chung y col., 2005; Messmer y col., 2007). Factores solubles de la familia de las Wnts secretados por astrocitos participan también en la diferenciación de las células dopaminérgicas (Castelo-Branco y col., 2003; Castelo-Branco y Arenas, 2006). Otra aproximación a la diferenciación dopaminérgica de precursores del mesencéfalo ventral incluye la eliminación de mitógenos (Studer y col., 1998) o adición de factores solubles como el suero bovino fetal en combinación con interleucinas (IL-1,IL-11), LIF, factor neurotrófico derivado de

una línea celular glial (GDNF, del inglés glial derived neurotrophic factor) (Carvey y col., 2001; Storch y col., 2001), una mezcla de FGF-8, GDNF y Forskolin (Wang y col., 2004) o el ácido ascórbico (Yan y col., 2001).

En la diferenciación de células madre hacia motoneuronas colinérgicas se ha utilizado el tratamiento combinado con ácido retinoico y Shh (Wichterle y col., 2002) o bien la selección de progenitores neurales que expresan E-NCAM, seguido de su expansión y posterior diferenciación con ácido retinoico, BMP-2 BMP-4 (Mujtaba y col., 1999) entre otros.

Existen pocos trabajos en los que se intente manipular algún tipo de célula madre, ya sea genéticamente o mediante la adición de factores solubles, para la generación de neuronas GABAérgicas. Una de las aproximaciones que se han utilizado para la diferenciación de ESC se basa en el cultivo de las éstas sobre una capa de células mesenquimales de soporte, donde se añaden diversos factores de forma secuencial, entre ellos el FGF-2, FGF-8 y Shh, seguida de la exposición final a BDNF y neurotrofina-4 (NT-4) (Barberi y col., 2003). En nuestro laboratorio se ha desarrollado un protocolo de generación de neuronas GABAérgicas maduras y funcionales a partir de NSC mediante el tratamiento con suero fetal bovino y B27 seguido de un tratamiento secuencial con ácido retinoico, cloruro potásico y BDNF (Bosch y col., 2004). También se han generado neuronas GABAérgicas a partir de NSC del bulbo olfativo (Vergano-Vera y col., 2006).

2.2.2.4. Métodos de selección para la obtención de una población homogénea

En la mayoría de protocolos de diferenciación descritos hasta el momento se suele dar una diferenciación que a pesar de ser dirigida se generan una mezcla de tipos celulares. Esto hace necesario la aplicación de métodos de selección que nos permitan aislar las células de interés y así disponer de una población homogénea. En algunos casos esto se ha conseguido mediante la utilización de unas condiciones de cultivo específicas, es decir, utilizando un medio de cultivo químicamente definido que incrementa la supervivencia y

proliferación de progenitores neurales (Okabe y col., 1996; Tropepe y col., 2001; Ying y Smith, 2003).

Una segunda estrategia es la purificación de precursores de un linaje concreto o células diferenciadas a un fenotipo específico basada en la expresión restringida de marcadores genéticos. La inmunopurificación se puede aplicar cuando marcadores de superficie celular y anticuerpos están disponibles. Otra manera de aislar un tipo particular de células es mediante transgenes que confieran resistencia a antibióticos. En esta aproximación, un gen de selección se sitúa bajo el control transcripcional de un promotor que se expresa sólo en las células de interés, como es el caso de la resistencia al antibiótico geneticina que situado bajo el control transcripcional de Sox-2 nos permite aislar precursores neurales proliferantes pero no células neurales post-mitóticas o progenitores de otros linajes embrionarios (Avilion y col., 2003). Otra alternativa de selección supone la expresión de la proteína fluorescente verde (EGFP, del inglés *enhanced green fluorescent protein*) bajo el control de un promotor neural específico, que nos va a permitir la purificación de una población específica de células diferenciadas mediante FACS. La utilidad de esta aproximación fue demostrada recientemente con una línea celular de ESC que contiene EGFP knock-in en el locus de Sox-1 (Aubert y col., 2003), lo que permitió seleccionar efectivamente una población homogénea de progenitores neurales.

Tras la aplicación de métodos de selección que nos permitan disponer de una población de un linaje concreto es posible que se de una contaminación con alguna célula madre embrionaria indiferenciada residual, que una vez trasplantada podría dar lugar a la formación de teratomas (Evans y Kaufman, 1981; Thomson y col., 1998). Así pues, con el fin de evitar dichas contaminaciones es posible la aplicación de técnicas que nos permitan eliminar ESC indiferenciadas de la población a trasplantar (Billon y col., 2002). Es decir, que la combinación de técnicas de selección positivas y negativas, nos permitirá disponer de poblaciones homogéneas libres de ESC indiferenciadas para utilizar en terapia celular.

2.2.3. Trasplante e integración funcional

El último paso de una terapia de sustitución celular es el trasplante 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 (Brundin y col., 2000; Arenas, 2002; Harrower y col., 2006). 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 trasplante pueden ser aún más complicados (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 trasplante 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 (Bosch y col., 2004). 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

giales, 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

La enfermedad de Huntington es una enfermedad neurodegenerativa asociada a una pérdida celular progresiva y atrofia predominantemente del núcleo estriado, que es el núcleo integrador de la información que llega a los ganglios basales (Leegwater-Kim y Cha, 2004).

3.2. Los ganglios basales

Los ganglios basales son un conjunto de núcleos subcorticales altamente interconectados entre sí que juegan un papel fundamental en funciones motoras, cognitivas y límbicas. Anatómicamente están constituidos por el núcleo estriado (núcleo caudado y putamen), el *globus pallidus* que contiene un segmento interno y uno externo y el núcleo *accumbens*. Funcionalmente existen otros dos núcleos asociados: el núcleo subtalámico y la sustancia negra que se divide en *pars compacta* y *pars reticulata* (Parent y Hazrati, 1995; Bolam y col., 2000).

Este complejo conjunto de núcleos que integran los ganglios basales han sido objeto de estudio durante muchos años, principalmente debido a su clara implicación en enfermedades neurodegenerativas asociadas a actividades motoras anormales como es el caso de la enfermedad de Parkinson o la corea de Huntington entre otras.

La entrada más importante de información a los ganglios basales proviene de la corteza cerebral (figura 8) y es el núcleo estriado el que recibe principalmente dichas aferencias, a pesar de que también existen proyecciones de la corteza cerebral hacia el núcleo subtalámico. Así pues, el núcleo estriado siendo el mayor componente de los ganglios basales es el responsable de procesar e integrar toda la información que recibe, no sólo de la corteza, sino de otras estructuras como el tálamo, la sustancia negra *pars compacta* y otros

núcleos del tronco encefálico como el *locus coeruleus* y el rafe. Una vez procesada la información, envía eferencias hacia el segmento interno del *globus pallidus* y la sustancia negra *pars reticulata*, bien directamente (vía directa; vía



Figura 8. Circuitos de los ganglios basales. *GPI*, *Globus pallidus interno*; *GPe*, *Globus pallidus externo*; *SNc*, *sustancia negra pars compacta*; *SNr*, *sustancia negra pars reticulata*; *STN*, *núcleo subtalámico*.

estriatonigral), bien a través del segmento externo del *globus pallidus* y del núcleo subtalámico (vía indirecta; vía estriatopallidal). Las proyecciones de los ganglios basales se dirigen otra vez al tálamo y después hacia la corteza cerebral cerrando así el circuito conocido como córtico-estriato-tálamo-cortical (Gerfen, 1992; Parent y Hazrati, 1995; Bolam y col., 2000) (figura 8).

3.2.1. El núcleo estriado

El núcleo estriado en humanos y primates está compuesto por los núcleos caudado y putamen, los cuales son histológicamente idénticos y se encuentran separados por la cápsula interna, las fibras mielinizadas de la cual dan a este complejo nuclear una apariencia estriada en roedores.

3.2.1.1. Histología del núcleo estriado

A nivel histológico el núcleo estriado está compuesto por:

- ✓ **Neuronas de proyección:** representan un 90-95% de la población estriatal. Se caracterizan por tener un soma celular de tamaño mediano (unas 10-15 μm de diámetro), y por que presentan una gran cantidad de espinas dendríticas y un largo axón que establece conexiones fuera del núcleo. Estas características morfológicas hacen que estas neuronas también reciban el nombre de neuronas medianas espinosas. La mayoría de estas neuronas utilizan como neurotransmisor principal GABA (Ribak y col., 1979; Oertel y Mugnaini, 1984), aunque de manera simultánea también expresan la proteína quelante de calcio calbindina, y uno o más neuropéptidos (Gerfen, 1992). Las dianas comunes de estas neuronas de proyección, alcanzadas bien por la vía directa (vía estriatonigral) bien por la vía indirecta (vía estriatopallidal) son el *globus pallidus* y la sustancia negra. Se pueden definir dos tipos de poblaciones de neuronas de proyección en función de la estructura a la que proyectan, del tipo de neuropéptidos que expresan así como del tipo de receptores de dopamina que presentan. De esta manera tenemos las neuronas **estriatopalidales** que proyectan al segmento externo del *globus pallidus* y expresan encefalina y el receptor D2 de la dopamina, y las neuronas **estriatonigrales** que proyectan a la sustancia negra *pars reticulata* o al segmento interno del *globus pallidus* y expresan sustancia P, dinorfina y el receptor D1 de la dopamina principalmente (Gerfen, 1988; Le y col., 1990; Gerfen y col., 1990). Estas dos poblaciones de neuronas de proyección son morfológicamente indistinguibles y no se encuentran segregadas topográficamente en el núcleo estriado adulto, pero sus diferentes dianas y neuropéptidos sugieren un nivel de segregación funcional.
- ✓ **Interneuronas:** representan sólo el 5-10% de la población del núcleo estriado, pero ejercen un papel muy importante en el control de la excitabilidad de las neuronas estriatales de proyección. Existen diferentes

tipos de interneuronas que pueden clasificarse en: a) colinérgicas, las cuales se caracterizan por su enorme soma (20-50 μm de diámetro), y por utilizar acetilcolina como neurotransmisor (Bolam y col., 1984); b) GABAérgicas de tamaño algo mayor que el de las neuronas de proyección que expresan la proteína quelante de calcio parvalbúmina (Gerfen y col., 1985); c) GABAérgicas de tamaño mediano que contienen calretinina (Jacobowitz y Winsky, 1991; Resibois y Rogers, 1992) y d) las interneuronas que coexpresan somatostatina, neuropéptido Y y óxido nítrico sintasa (NOS, del inglés *nitric oxid synthase*) (Vincent y col., 1983; Morello y col., 1997).

3.2.1.2. Organización del núcleo estriado

La aparición de nuevas técnicas neuroquímicas y el estudio de las conexiones que establece el núcleo estriado mediante la utilización de trazadores axonales han roto con la idea de que el núcleo estriado es una estructura homogénea compuesta por un único tipo de células que no presenta ningún tipo de organización estructural, y nos han permitido establecer que el núcleo estriado dispone de una compleja organización en mosaico que está vinculada a sus conexiones neuroanatómicas y que determina dos compartimentos: los estriosomas que están constituidos por agrupaciones de células que forman agregados y la matriz que se encuentra envolviendo dichos agregados (Graybiel, 1983).

Estos dos compartimentos se pueden definir en base a la expresión diferencial de marcadores neuroquímicos:

- **Los estriosomas** se caracterizan por su elevada expresión de receptores μ -opiáceos (Pert y col., 1976), sustancia P (Chesselet y Robbins, 1989), dinorfina (Haber y Watson, 1985), neurotensina, por ser ricos en fibras inmunoreactivas para tirosina hidroxilasa y por presentar un marcaje muy débil para acetilcolinesterasa (Graybiel y Ragsdale, 1978).
- **La matriz** que es la región complementaria a los estriosomas, se caracteriza por presentar un elevado marcaje para calbindina,

acetilcolinesterasa (Graybiel y Ragsdale, 1978) y por ser rica en fibras inmunoreactivas para la somatostatina (Gerfen y col., 1985).

La localización inmunohistoquímica de otros marcadores neuroquímicos como encefalina, sustancia P o dinorfina muestra unos patrones de distribución que en algunas regiones coincide con la organización de estriosomas y matriz, pero en otras regiones no (Graybiel y col., 1981). Es decir, que se pueden encontrar neuronas expresando dichos péptidos en ambos compartimentos (Gerfen, 1988).

Los estriosomas y la matriz también se pueden definir en base a la organización de sus aferencias y eferencias (figura 9):

- **Eferencias:** las neuronas de proyección segregadas en los dos compartimentos del núcleo estriado van a proyectar distintas zonas de la sustancia negra. Las neuronas de los estriosomas contactan con las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra *pars compacta* mientras que las neuronas de la matriz contactan con las neuronas GABAérgicas de la sustancia negra *pars reticulata*. (Gerfen, 1984; Gerfen y col., 1985; Gerfen, 1985).
- **Aferencias:** las proyecciones que llegan al núcleo estriado a partir de las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral, de la sustancia negra y del área retrorubral también están compartimentalizadas (Gerfen, 1992). Los terminales que llegan a la matriz provienen de las neuronas dopaminérgicas situadas de una manera continua en el área tegmental ventral, en el lado dorsal de la sustancia negra *pars compacta* y en el área retrorubral. En cambio los terminales dirigidos a los estriosomas provienen de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra *pars compacta* y de las neuronas dopaminérgicas que se agrupan en islotes en la sustancia negra *pars reticulata*. Las neuronas que proyectan a la matriz expresan calbindina mientras que las que proyectan a los

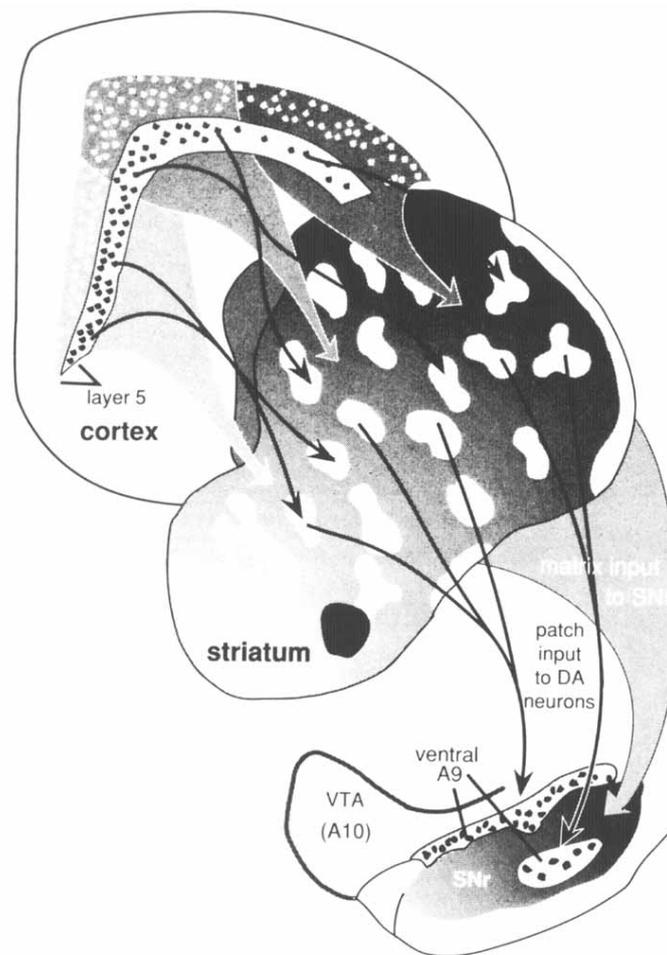


Figura 9. Resumen de la organización compartimental en estriosomas y matriz de las vías corticoestriatales y estriatonigrales. Las neuronas corticoestriatales de la parte profunda de la capa V de la corteza cerebral proyectan a los estriosomas, mientras que las neuronas de la parte superficial de esa misma capa V proyectan a la matriz del núcleo estriado. Las neuronas de los estriosomas proyectan a las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra pars compacta (SNc). Las neuronas de la matriz proyectan a las neuronas GABAérgicas de la sustancia nigra pars reticulata (SNr). Tomado de (Gerfen, 1992).

estriosomas no (Gerfen, 1992). Las conexiones cortico-estriatales también muestran patrones diferentes, siendo las neuronas corticales de la parte profunda de la capa V y capa VI las que proyectan preferentemente al compartimento estriosomal, mientras que las proyecciones de la parte superficial de la capa V y de la capa supragranular van principalmente al compartimento de la matriz (Gerfen, 1989).

3.3. Fisiopatología de la enfermedad de Huntington

El inicio de la enfermedad se suele producir sobre los 30-40 años de edad aunque también se han descrito casos juveniles y seniles; esta patología corticoestriatal produce una tríada de síntomas cognitivos, motores y psiquiátricos que da lugar a una incapacidad progresiva que desencadena la muerte en 15-20 años. Es una enfermedad genética autosómica dominante producida por la mutación en la expansión de poliglutaminas en un gen del cromosoma 4. 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 irremediamente los síntomas de la enfermedad (McMurray, 2001). De hecho, hay una correlación inversa entre el número de tripletes CAG y la edad de aparición de la enfermedad (Persichetti y col., 1995): a mayor número de tripletes, antes aparecen y más severos son los síntomas de la enfermedad.

La enfermedad de Huntington se caracteriza neuropatológicamente por la desaparición de neuronas del núcleo estriado (núcleos Caudado y Putamen). En concreto se produce la muerte específica de las neuronas GABAérgicas de proyección (Ferrante y col., 1985), mientras que las interneuronas prácticamente no se encuentran afectadas (Ferrante y col., 1985; Vonsattel y col., 1985; Ferrante y col., 1987). Además, las diferentes subpoblaciones de neuronas de proyección mueren de una manera progresiva característica. Las neuronas estriatales que envían sus proyecciones al segmento externo del *globus pallidus* y expresan encefalina son las que se afectan inicialmente y lo hacen de una forma más severa que las neuronas que proyectan a la substancia nigra *pars reticulata* y el segmento interno del *globus pallidus* y expresan substancia P y dinorfina (Reiner y col., 1988; Albin y col., 1992; Richfield y col., 1995). También se produce una degeneración de las neuronas corticales, aunque ésta es menos severa. En este caso la degeneración también sigue un patrón característico ya que sólo las neuronas de proyección de las capas V y VI y en menor grado las de la capa III se encuentran afectadas (Cudkowicz y Kowall, 1990; Hedreen y col., 1991; Sotrel

y col., 1991; Wagster y col., 1994; Macdonald y Halliday, 2002). Otra característica de la patología de la enfermedad de Huntington es la presencia de cuerpos de inclusión en las neuronas. Se desconocen los mecanismos por los cuales la huntingtina mutada produce estos agregados insolubles pero existe una correlación entre el número de repeticiones del trinucleótido CAG y la densidad de agregados (Vonsattel y col., 1985; Myers y col., 1988; Becher y col., 1998).

3.4. Mecanismos moleculares implicados en la enfermedad de Huntington

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 y col., 1999).

Para entender la actividad patológica de la huntingtina mutada, deben primero conocerse las funciones de la proteína normal. A pesar de que se desconoce la el papel fisiológico concreto de la huntingtina ha sido implicada en varias funciones (figura 10). Por su localización citoplasmática y su asociación a Golgi, retículo endoplasmático, vesículas sinápticas, microtúbulos y mitocondria (DiFiglia y col., 1995; Sharp y col., 1995; Trottier y col., 1995; Gutekunst y col., 1998) se ha sugerido que se trata de una proteína de ensamblaje implicada en el transporte intracelular, transporte vesicular, anclaje a citoesqueleto, transporte axonal y señalización postsináptica (Gusella y MacDonald, 1998). También se le han descrito propiedades antiapoptóticas (Rigamonti y col., 2000; Gervais y col., 2002). A nivel del núcleo interacciona con proteínas implicadas en la transcripción genética (Petersen y col., 1999; Reddy y col., 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 y col., 1995; Nasir y col., 1995).

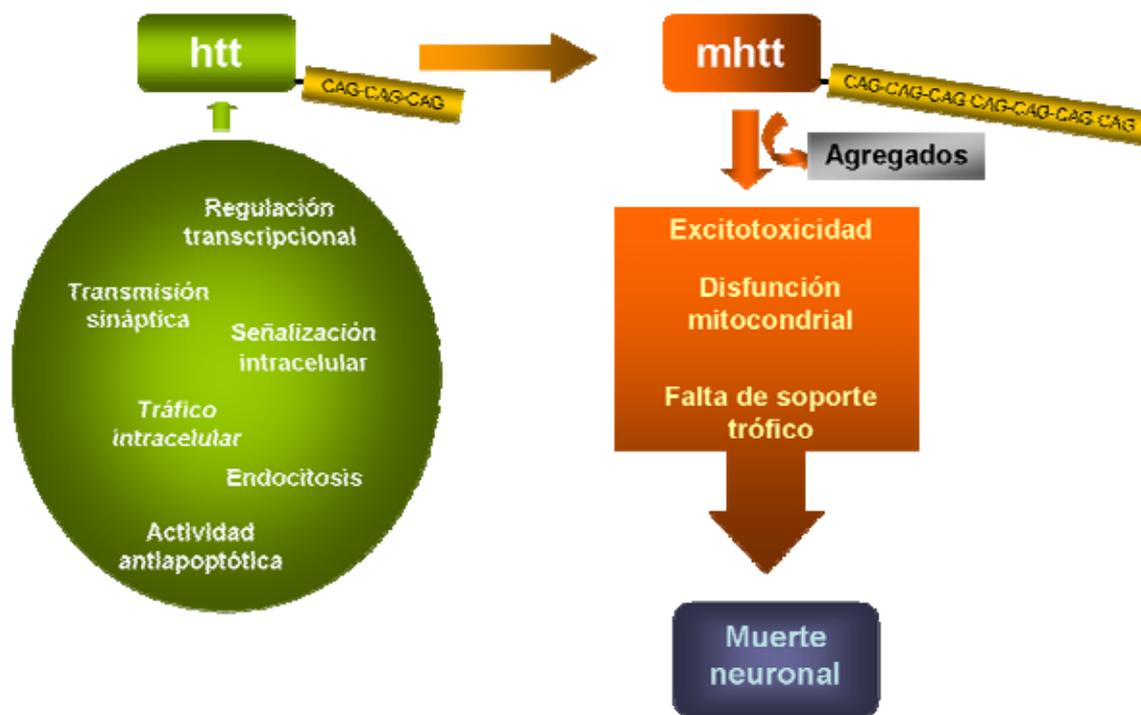


Figura 10. Diagrama esquemático sobre las funciones fisiológicas de la huntingtina (*htt*) y los mecanismos implicados en la muerte neuronal en presencia de huntingtina mutada (*mhtt*).

La patología de la enfermedad de Huntington no está claro si es debida a la acción tóxica de la huntingtina mutada, es decir, a una ganancia de función, o bien a una pérdida de la función natural de la proteína (Cattaneo y col., 2001). No obstante, existen varias hipótesis sobre los mecanismos implicados en la degeneración y la selectividad (figura 10). La excitotoxicidad que resulta de la sobreestimulación de receptores glutamatérgicos ionotrópicos estriatales por parte del glutamato que llega de la corteza cerebral, ha sido postulada como una de las principales causas de la muerte neuronal en la enfermedad de Huntington, sobretudo tras observar que la inyección intraestriatal de ácido quinolínico (un agonista de los receptores glutamatérgicos tipo N-metil-D-aspartato (NMDA)) reproduce bastante bien la neuropatología de la enfermedad de Huntington tanto en ratas (Beal y col., 1986; Beal y col., 1989) como en primates (Ferrante y col., 1993).

Otra hipótesis apunta a la disfunción del metabolismo energético como posible causa de la enfermedad de Huntington. Las neuronas estriatales son especialmente sensibles a las toxinas de acción mitocondrial (Brouillet y col., 1999) y en pacientes de la enfermedad de Huntington 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 pacientes de la enfermedad de Huntington (Ferrer y col., 2000; Zuccato y col., 2001) por acción de la huntingtina mutada. La huntingtina mutada también parece ser responsable de alteraciones del transporte axonal (Gauthier y col., 2004) con lo que el aporte de BDNF de la corteza al núcleo estriado podría quedar reducido. Recientemente se ha descrito que la huntingtina mutada también podría estar alterando la secreción regulada de BDNF (del y col., 2006). Es decir, que en la enfermedad de Huntington se produce una reducción del aporte de BDNF de la corteza cerebral al núcleo estriado debido a una reducción en la expresión de este factor neurotrófico producida por la huntingtina mutada acompañada de una menor secreción por la vía regulada así como un menor transporte axonal. Y esta reducción en los niveles de BDNF, asimismo, empeora los síntomas de la enfermedad como se ha observado en modelos de la enfermedad de Huntington en los que se produce una neurodegeneración estriatal más severa (Canals y col., 2004).

Probablemente las causas de la enfermedad de Huntington 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 (Cha, 2000; Alberch y col., 2004).

3.5. Terapia de neuroprotección para la enfermedad de Huntington

Terapias efectivas en enfermedades neurodegenerativas son aquellas que previenen o inhiben los procesos patológicos tempranos que se dan antes de la muerte neuronal. Así pues, el principio de la terapia de neuroprotección se basa en que diferentes tipos de neuronas pueden ser protegidos contra el daño o

pérdida debido a un trauma o enfermedad, interfiriendo en los procesos involucrados en la muerte celular. Esto puede ser conseguido a diferentes niveles, ya sea bloqueando la excitotoxicidad, alteraciones del metabolismo energético, el estrés oxidativo o los procesos apoptóticos o bien promoviendo la supervivencia, diferenciación y crecimiento utilizando diferentes moléculas entre las que se encuentran los factores tróficos, que guían y regulan el desarrollo neuronal (Alberch y col., 2004; Handley y col., 2006). En particular, una gran variedad de factores de crecimiento, que incluyen la neurotrofina BDNF, las neurotrofinas NT-3 y NT-4/5, interleucinas, FGF, GDNF y el factor neurotrófico ciliar (CNTF, del inglés *ciliary neurotrophic factor*) han demostrado promover la supervivencia de neuronas estriatales (Ventimiglia y col., 1995; Gavalda y col., 2004). De la misma manera, muchos de estos factores también son efectivos en la protección de neuronas estriatales frente a un estímulo excitotóxico o isquémico *in vivo* (Alexi y col., 1997; Alberch y col., 2002).

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 sobre-expresión de estos factores ha demostrado su eficacia en los modelos excitotóxicos de la enfermedad de Huntington. La administración por esta vía del factor de crecimiento nervioso (NGF, del inglés *nerve growth factor*) (Schumacher y col., 1991; Frim y col., 1993), BDNF, NT-3 y NT-4/5 (Perez-Navarro y col., 1999a; Perez-Navarro y col., 2000b; Gratacos y col., 2001), y también de GDNF y neurturina (NTRN) (Perez-Navarro y col., 1999b; Perez-Navarro y col., 2000a; Perez-Navarro y col., 2000b; Marco y col., 2002a)

consiguen revertir el daño neuronal causado por la inyección de las excitotoxinas. 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.

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 enfermedad de Huntington. En los modelos excitotóxicos en rata, el CNTF es capaz de revertir déficits motores y cognitivos (Emerich y col., 1996; Emerich y col., 1997a; Emerich y col., 1997b). Los ensayos en modelos de primates no-humanos, tanto por inyección de excitotoxinas como por la administración de 3-nitropropiónico (3-NP), también han confirmado la eficacia de esta estrategia (Emerich y col., 1996; Emerich y col., 1997a; Emerich y col., 1997b; Kordower y col., 1999; Mittoux y col., 2000). Estos resultados positivos impulsaron el inicio de un ensayo clínico en fase I en pacientes de enfermedad de Huntington, que ha demostrado la seguridad y tolerabilidad de esta aproximación aunque la supervivencia de la células modificadas genéticamente es variable y debería ser mejorada (Bloch y col., 2004; Bachoud-Levi y col., 2000a).

Las propiedades inherentes de las NSC o líneas de progenitores neuronales las hacen ideales 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. Los primeros ensayos con estas células han consistido en el trasplante de líneas de NSC modificadas genéticamente para la secreción de NGF (Martinez-Serrano y col., 1996; Kordower y col., 1997), de BDNF (Martinez-Serrano y Bjorklund, 1996) o de GDNF (Pineda y col., 2007) en modelos excitotóxicos de la enfermedad de Huntington, donde demuestran su potencial neuroprotector sobre las neuronas estriatales. Debido a su implicación en la propia patogénesis de esta enfermedad, 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 enfermedad de Huntington (Alberch y col., 2004).

3.6. Terapia de sustitución celular para la enfermedad de Huntington

La muerte selectiva de una población neuronal estriatal que se da en la enfermedad de Huntington, junto con su naturaleza genética y la lenta progresión con la que cursa hacen que esta enfermedad sea una buena candidata para ser tratada mediante terapia celular. Debido a que las neuronas que se pierden en la enfermedad de Huntington forman parte de un complejo circuito cortico-estriato-palidal, el correcto funcionamiento del trasplante neuronal no solo va a depender de la repoblación del núcleo estriado con neuronas GABAérgicas de proyección sino también de la reconstrucción parcial del circuito que conecta la corteza con el núcleo estriado y éste con el *globus pallidus* (Bjorklund y Lindvall, 2000) (figura 11).

En los estudios realizados hasta el momento en modelos animales de la enfermedad de Huntington, 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 y col., 1983). Desde entonces se ha demostrado que los trasplantes de estas células muestran una buena integración y diferenciación (Isacson y col., 1985; Rosser y col., 2002), son capaces de establecer conexiones aferentes de la corteza o la sustancia negra y de enviar conexiones eferentes hacia el *globus pallidus* (Pundt y col., 1996b; Nakao y col., 1999; Dunnett y col., 2000). También son capaces de restablecer la sensibilidad a la dopamina (Chen y col., 2002) y revertir los déficits de comportamiento tanto locomotor como de aprendizaje de los modelos de la enfermedad de Huntington (Isacson y col., 1986; Dunnett, 1995; Pundt y col., 1996a; Brasted y col., 1999). Este grado de reconstrucción del circuito y de recuperación funcional se da también en los trasplantes fetales realizados en modelos de primates de la enfermedad de Huntington (Kendall y col., 1998; Palfi y col., 1998).

Estos esperanzadores resultados en modelos animales permitieron iniciar con cierto optimismo los ensayos clínicos en pacientes de la enfermedad de Huntington (Hantraye y col., 1992; Philpott y col., 1997; Rosser y col., 2002). Los

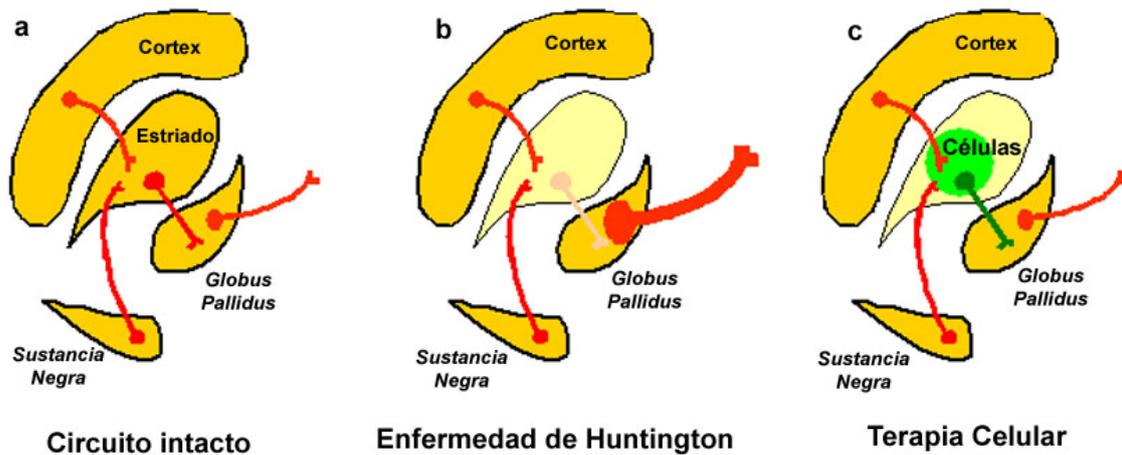


Figura 11. Reconstrucción del circuito cortico-estriato-palidal mediante terapia celular en la enfermedad de Huntington. (a) El núcleo estriado juega un papel central en los circuitos de los ganglios basales que controlan el movimiento. (b) En la enfermedad de Huntington tiene lugar una degeneración 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. Modificado de Bjorklund y Lindvall, 2000.

trasplantes de tejido estriatal fetal humano en pacientes de la enfermedad de Huntington sobreviven sin mostrar signos patológicos de la enfermedad. Contienen neuronas de proyección e interneuronas y reciben aferencias del propio cerebro del paciente (Freeman y col., 2000). Los beneficios terapéuticos sin embargo están aún en fase de evaluación. Bachoud-Levi y colaboradores observaron mejoras de comportamiento motor y cognitivo en la mayoría de los pacientes dos años después de los trasplantes (Bachoud-Levi y col., 2000b). Las mejoras observadas estaban asociadas a aumentos del metabolismo cortical y estriatal, lo que sugiere que los trasplantes reestablecen la funcionalidad del circuito cortico-estriatal (Gaura y col., 2004). Sin embargo la evaluación de los mismos pacientes seis años después del trasplante muestra una empeoramiento de la sintomatología (Bachoud-Levi y col., 2006). Otro estudio realizado por Hauser y colaboradores no ha detectado hasta el momento claras mejoras en

los pacientes que han sido transplantados (Hauser y col., 2002), si bien en este caso todos los pacientes eran de avanzada edad y con un grado de patología más severo (Peschanski y col., 2004). El uso de tejido fetal para terapia celular conlleva una serie de problemas entre los que encontramos la baja disponibilidad de tejido fetal, la compleja manipulación e imposibilidad de expansión, así como una gran heterogeneidad de las células que se trasplantan en cada caso, lo cual da lugar a una baja reproducibilidad de los resultados. Todos estos inconvenientes acompañados de los problemas éticos derivados del uso de tejido fetal hace necesaria la búsqueda de una fuente de células alternativa. Las ESC o NSC correctamente diferenciadas hacia un fenotipo GABAérgico podrían ser buenas candidatas para el uso en la terapia celular de la enfermedad de Huntington. Sin embargo, va a ser necesario disponer de un conocimiento profundo de los mecanismos que regulan el desarrollo de las neuronas GABAérgicas de proyección encefalinérgicas del núcleo estriado, que son las que degeneran principalmente en la enfermedad de Huntington. Este conocimiento nos va a permitir guiar de forma controlada la diferenciación de las células madre hacia ese fenotipo con el fin de conseguir una población homogénea y funcional. Esta población GABAérgica podrá ser utilizada para realizar una terapia celular sustitutiva que reemplace las neuronas degeneradas y así regenerar las conexiones con el resto de estructuras de los ganglios basales que, en última instancia, nos va a producir una recuperación de la funcionalidad motora y cognitiva.

4. DESARROLLO DEL NÚCLEO ESTRIADO

Durante los estadios iniciales del desarrollo neural las células se dividen rápidamente de una manera no uniforme a lo largo del tubo neural, dando lugar a nivel rostral a la formación de tres vesículas cerebrales: el prosencéfalo, el mesencéfalo y el rombencéfalo. En una fase posterior del desarrollo, dos de las tres vesículas embrionarias primarias se subdividen y de esta manera el prosencéfalo da lugar al telencéfalo y el diencéfalo, y el rombencéfalo da lugar

al metencéfalo y mielencéfalo. Estas subdivisiones, junto con la médula espinal, conforman las seis regiones principales del sistema nervioso central maduro.

4.1. El telencéfalo

El telencéfalo deriva de la porción anterior del sistema nervioso central y es una de las estructuras más complejas y divergentes de dicho sistema. En él se generan una gran diversidad de tipos neuronales y gliales que migran por diferentes vías para ocupar sus posiciones finales en la corteza cerebral y ganglios basales maduros. Clásicamente el telencéfalo embrionario se ha dividido en: palio dorsal a partir del cual se genera la corteza cerebral e hipocampo y subpalio ventral que consiste en dos dominios de progenitores distintos, la eminencia ganglionar lateral (LGE, del inglés *lateral ganglionic eminence*) y la eminencia ganglionar medial (MGE, del inglés *medial ganglionic eminence*), que van a generar el núcleo estriado y el *globus pallidus*, respectivamente (Campbell, 2003) (figura 12).

4.2. Origen del núcleo estriado

El núcleo estriado se desarrolla a partir de las eminencias ganglionares localizadas en la base de la vesícula telencefálica (Olsson y col., 1998). Estas eminencias se encuentran en contacto con el ventrículo lateral y en función de su localización rostro-caudal se pueden distinguir: la LGE que presenta una localización rostrolateral y la MGE que presenta una localización caudomedial (figura 12). Las partes caudales de ambas eminencias se fusionan dando lugar a la eminencia ganglionar caudal. Estas tres estructuras embrionarias transitorias comprenden diferentes poblaciones de progenitores durante el desarrollo del telencéfalo ventral. La LGE es la principal fuente de neuronas estriatales (Deacon y col., 1994; Campbell y col., 1995) y contiene progenitores tanto de las neuronas GABAérgicas de proyección como de la población de interneuronas estriatales que colocalizan con GABA y somatostatina. En la LGE dorsal también se encuentran progenitores de las interneuronas destinadas al bulbo olfativo (Deacon y col., 1994; Wichterle y col., 2001; Stenman y col., 2003a). La

MGE contiene progenitores de interneuronas destinadas al núcleo estriado

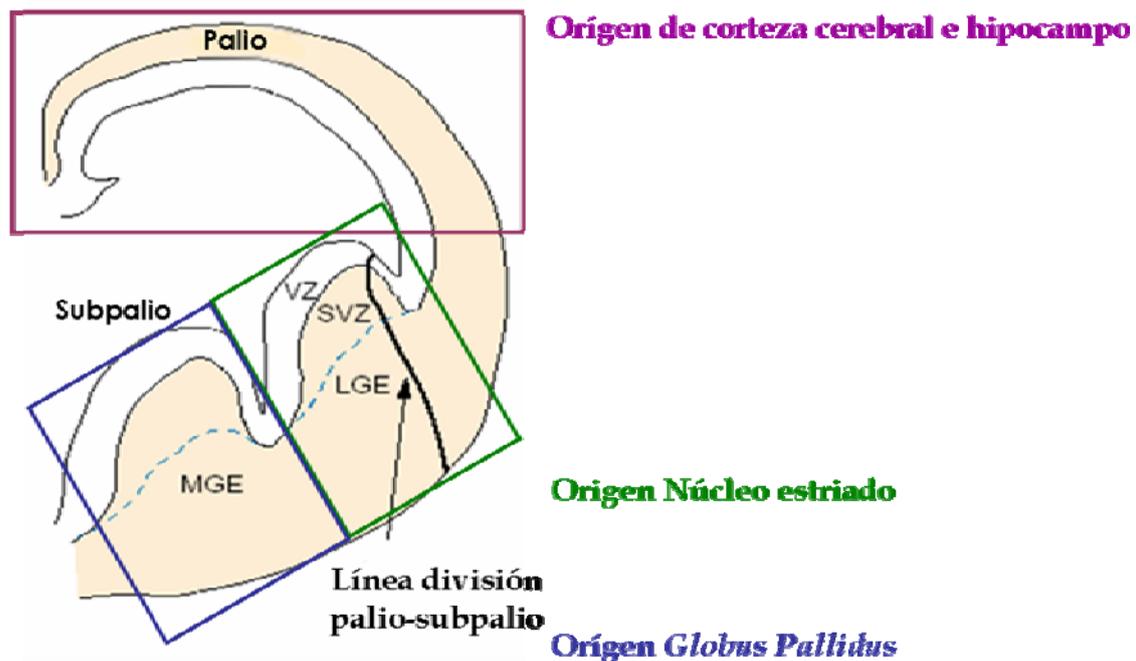


Figura 12. Representación de una sección coronal de telencéfalo de ratón en el día embrionario 12,5 (E12,5). En ella se muestran los diferentes dominios de progenitores que corresponden al palio dorsal y subpalio ventral formado por las LGE y MGE. Cuadros de colores marcan aproximadamente los tres dominios que darán lugar a la formación de corteza cerebral e hipocampo, núcleo estriado y globus pallidus respectivamente. En esta representación también se muestra la zona ventricular (VZ) y subventricular (SVZ) de las eminencias así como la línea de división entre el palio y el subpalio.

(colinérgicas y GABAérgicas), la corteza cerebral, así como el hipocampo y también presenta los progenitores que darán lugar al *globus pallidus* (Wichterle y col., 2001; Marin y Rubenstein, 2001). Por último, la eminencia ganglionar caudal da lugar a una gran diversidad de neuronas de diferentes regiones como la capa V de la corteza cerebral, el hipocampo, la amígdala y el núcleo estriado caudal entre otras (Nery y col., 2002).

El neuroepitelio de estas eminencias presenta dos zonas proliferativas (figura 12) que contribuyen a la generación de precursores neurales: la zona ventricular que está formada por un epitelio pseudoestratificado que se encuentra en contacto con el ventrículo lateral y la zona subventricular que se extiende desde la porción basal de la zona ventricular hasta una región profunda de la pared ventricular (Takahashi y col., 1995; Bhide, 1996). Los precursores neuronales de estas dos zonas germinales periventriculares, una vez determinados, migran fuera de su lugar de origen hacia posiciones

específicas que ocuparán en una estructura determinada del sistema nervioso adulto y experimentan su diferenciación final (Hamasaki y col., 2003).

4.3. Migración celular en el núcleo estriado

La migración celular juega un papel esencial en la formación de los tejidos durante el desarrollo. Así pues, la migración neuronal es uno de los procesos críticos durante las etapas tempranas de la histogénesis del núcleo estriado. Se han descrito dos formas mayoritarias de migración neuronal durante la formación del núcleo estriado: la **migración radial** y la **migración tangencial**, que suplen de neuronas de proyección e interneuronas al núcleo estriado, respectivamente (Hamasaki y col., 2003)(figura 13).

4.3.1. Migración radial de las neuronas de proyección estriatales

Estudios llevados a cabo por Ramón y Cajal en 1891 sobre el desarrollo de diferentes regiones del cerebro y la médula espinal describen el movimiento radial de células recién nacidas como fenómeno general durante la formación del sistema nervioso central de vertebrados (Ramón y Cajal, 1891). Rakic y colaboradores, casi 100 años más tarde mediante diferentes técnicas describieron que las neuronas post-mitóticas jóvenes encuentran el camino hacia su destino final, a través de los intrincados de axes celulares, siguiendo las largas fibras de la glía radial durante el desarrollo de la corteza cerebral y cerebelar (Rakic, 1971; Rakic, 1972). Estas células de glía radial se forman a partir del tubo neural durante el desarrollo temprano de la zona ventricular. Cada célula de glía radial tiene su soma en la zona ventricular y elabora un proceso que se expande por la pared del tubo neural hasta llegar a la superficie pial, donde se ancla a la membrana basal (Schmechel y Rakic, 1979; Gadisseux y col., 1989; Marin y Rubenstein, 2003). Una vez la producción neuronal cesa, la glía radial retrae sus anclajes de la superficie ventricular y pial y se diferencia a astrocitos, o neuronas (Levitt y col., 1981; Gaiano y col., 2000; Malatesta y col., 2000; Heins y col., 2002; Casper y McCarthy, 2006; Li y Grumet, 2007). Este tipo de migración es particularmente prominente durante la formación de

estructuras laminares como el neocortex (Rakic, 1971; Rakic, 1972; Kanatani y col., 2005) y el hipocampo (Gerfen, 1992; Super y col., 1998; Forster y col., 2002).

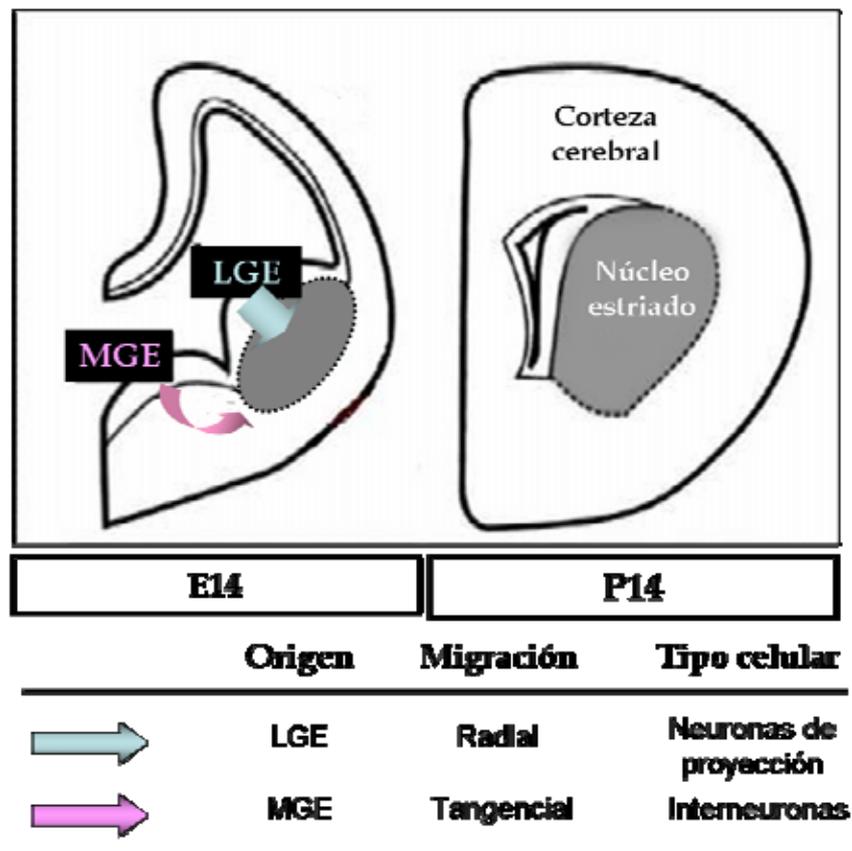


Figura 13. Tipos de migración neuronal durante el desarrollo del núcleo estriado. Representaciones esquemáticas de secciones cerebrales coronales en el día E14 y el día postnatal 4 (P4). La flecha azul muestra la migración radial de neuroblastos que se originan en la LGE y que van a generar neuronas de proyección. La flecha rosa indica la migración tangencial que siguen los precursores de las interneuronas que se originan en la MGE.

En el núcleo estriado se ha descrito que las fibras de la glía radial se originan en la zona ventricular de la LGE y proyectan al estriado con una orientación perpendicular a la de la superficie ventricular, sugiriendo que son ellas las que marcan la ruta de la migración de los precursores estriatales (Halliday y Cepko, 1992; De Carlos y col., 1996; Kakita y Goldman, 1999). Dado que los precursores neuronales de la LGE son la fuente primaria de neuronas de proyección estriatales (Anderson y col., 1997; Olsson y col., 1998) podemos establecer que las neuronas de proyección generadas en la zona proliferativa

periventricular de la LGE son suplidas al manto de núcleo estriado mediante procesos de migración radial (figura 13).

Entre los mecanismos que controlan la migración radial a nivel del núcleo estriado encontramos los factores de transcripción de la familia Dlx: Dlx-1 y Dlx-2. Estos factores se expresan siguiendo un patrón temporalmente restringido en las zonas ventricular y subventricular de la LGE y MGE, y son necesarios para que las neuronas de proyección de la matriz del núcleo estriado migren radialmente hacia sus posiciones finales. Estudios de pérdida de función de estos genes resultan en una acumulación anormal de precursores neuronales en la zona subventricular que producen alteraciones estructurales severas en el núcleo estriado (Anderson y col., 1997).

Otro de los mecanismos de regulación de la migración radial es llevado a cabo por moléculas guía que se encuentran en el ambiente y que son esenciales para el establecimiento de la organización estereotipada del sistema nervioso (Tessier-Lavigne y col., 1988; Tessier-Lavigne y Goodman, 1996). Hamasaki y colaboradores demostraron que *netrina-1* es una molécula guía que se expresa en la zona ventricular de la LGE durante el desarrollo del telencéfalo y que regula la migración radial de las neuronas de proyección estriatales de la matriz (Hamasaki y col., 2001).

4.3.2. Migración tangencial de las interneuronas estriatales

La migración tangencial ocurre en múltiples regiones del sistema nervioso central y contribuye a la dispersión tangencial de células clonalmente relacionadas. La migración tangencial comprende diferentes tipos de movimiento celular que divergen principalmente en el tipo de sustrato utilizado por las células en migración. En determinados casos, las neuronas que migran tangencialmente siguen axones en crecimiento para llegar a su destino final. Mientras que en otros casos, las neuronas no siguen sustratos celulares específicos sino que se dispersan de manera individual. Independientemente del tipo de migración, las células que se mueven tangencialmente no parecen respetar los límites regionales y migran a través de las diferentes subdivisiones

del telencéfalo e incluso atraviesan largas vías axonales (Heffron y Golden, 2000; Letinic y Rakic, 2001; Spassky y col., 2002; Chen y col., 2007).

La migración tangencial de precursores neuronales es indispensable para la formación del telencéfalo durante el desarrollo (para revisión: Corbin y col., 2001) y la MGE ha sido identificada como la mayor fuente de células que migran tangencialmente distribuyéndose por diferentes estructuras del telencéfalo como la corteza cerebral, hipocampo, *globus pallidus* y núcleo estriado (Meyer y col., 1998; Lavdas y col., 1999; Marin y Rubenstein, 2001; Anderson y col., 2001).

Las interneuronas estriatales forman circuitos neuronales locales en ambos compartimentos del núcleo estriado y a pesar de que representan menos de un 10% de las neuronas estriatales ejercen una importante influencia en la función del núcleo estriado (Gerfen, 1992; Kawaguchi y col., 1995). Existen cuatro tipos de interneuronas (ver capítulo 3.2.1.1.): colinérgicas, GABAérgicas que contienen parvalbúmina, GABAérgicas que contienen calretinina y GABAérgicas que contienen somatostatina, neuropeptido Y y NOS. Diversos estudios establecen que durante el estadio embrionario estas interneuronas migran tangencialmente desde su lugar de nacimiento a su destino final (Hamasaki y col., 2003). Marín y colaboradores describieron que una subpoblación de precursores que expresan la proteína homeodominio Nkx2.1 migran tangencialmente de la MGE al núcleo estriado en desarrollo donde las células subsecuentemente se diferencian en interneuronas colinérgicas, o positivas para calretinina o positivas para parvalbúmina (Marin y col., 2000). Trasplantes en el útero de células de la MGE muestran que dichas células pueblan el núcleo estriado por migración tangencial (Wichterle y col., 2001). Así pues, evidencias derivadas de estos y otros estudios sugieren que las interneuronas estriatales derivan principalmente de la MGE vía migración tangencial (figura 13).

4.4. Neurogénesis en el núcleo estriado

El núcleo estriado se puede dividir en dos compartimentos que presentan una organización en mosaico: los estriosomas y la matriz (Graybiel, 1990; Gerfen, 1992), los cuales difieren en cuanto a marcadores neuroquímicos, conexiones (ver capítulo 3.2.1.2.) y **periodo de neurogénesis**. Así pues, las neuronas de estos dos compartimentos aparecen principalmente durante dos estadios que no se superponen (van der y Fishell, 1987). Las neuronas estriosomales se generan durante la primera oleada de neurogénesis y formarán la región postmitótica de la LGE. La génesis de estas neuronas empiezan a partir de E13 en rata (van der y Fishell, 1987) y constituirán el 15-20% de las neuronas del núcleo estriado adulto (Lanca y col., 1986; Fishell y van der, 1991). A partir de E16 una segunda oleada masiva de nuevas neuronas generadas principalmente en la zona subventricular de la LGE migran al primordio estriatal y separan las neuronas de los estriosomas en agregados (van der y Fishell, 1987). Esta gran afluencia de células de la matriz continúa durante el resto del periodo embrionario hasta el nacimiento haciendo que estas células comprendan el 80-85% del núcleo estriado adulto (Johnston y col., 1990). En ratones esas oleadas son anteriores produciéndose entre E12-E13 la que dará lugar a los estriosomas y entre E13-E15 la que dará lugar a la matriz (Mason y col., 2005).

Las neuronas estriosomales inicialmente se encuentran dispersas uniformemente por el primordio estriatal presentando un gradiente caudo-rostral (Song y Harlan, 1994). A partir de E16-E19, dichas neuronas empiezan a formar agregados celulares positivos para sustancia P (Gerfen, 1992) y DARPP-32 (Ouimet y col., 1992) principalmente, a nivel ventrolateral. La autoadhesión selectiva de las neuronas de los estriosomas es uno de los mecanismos importantes que intervienen en la formación de los compartimentos estriatales (Krushel y col., 1989; Krushel y van der, 1993). A partir de este momento el compartimento estriosomal se continúa formando siguiendo un movimiento lateral a medial. En este movimiento intervienen las neuronas de la matriz, las cuales no tienden a agregarse y en estadios iniciales del desarrollo se

encuentran dispersas a nivel del primordio estriatal rostral. En estadios posteriores estas neuronas de la segunda oleada van a migrar y ocupar espacios ventrolaterales provocando el movimiento pasivo de las neuronas estriosomales que se encontraban allí hacia localizaciones dorsomediales (Song y Harlan, 1994). En este proceso de migración, las neuronas de la matriz inicialmente se entremezclan con las neuronas de los estriosomas (Krushel y col., 1995) y una vez las neuronas estriosomales se agregan, las neuronas de la segunda oleada de neurogénesis las rodean de manera que poco después del nacimiento las neuronas de la matriz y estriosomas están totalmente segregadas (Fishell y van der, 1991).

Los mecanismos exactos que regulan la formación de los compartimentos del núcleo estriado son hasta el momento desconocidos. Sin embargo, diversos estudios aportan evidencias sobre algunos factores que están implicados en procesos concretos de la compartimentalización estriatal. Entre ellos tenemos factores de transcripción como Ebf-1 que estaría implicado en la generación de las neuronas de los estriosomas (Garel y col., 1999) o Dlx-1/2 que intervienen en la generación y migración de las neuronas de la matriz estriatal (Anderson y col., 1997). Se ha descrito también la presencia de moléculas de adhesión celular como la cadherina-8 (Korematsu y col., 1998) que intervienen en la agregación y separación de las células de los estriosomas y de la matriz. Por otro lado, la llegada de las primeras proyecciones dopaminérgicas de la sustancia negra al núcleo estriado también se ha asociado con la génesis de las neuronas de los estriosomas y en la misma línea de evidencia se ha descrito que a E19 estas fibras se agrupan en islotes (Gerfen y col., 1987; Voorn y col., 1988) marcando claramente el compartimento de los estriosomas del núcleo estriado de la rata en desarrollo.

Durante el desarrollo del núcleo estriado uno de los marcadores de las neuronas del compartimento estriosomal es la sustancia P (Gerfen y Young, 1988), neuropéptido expresado por uno de los dos tipos de neuronas de proyección que forman el núcleo estriado (ver capítulo 3.2.1.1), mientras que como marcador de las neuronas de la matriz tenemos la encefalina (Correa y

col., 1981; Cuello y Paxinos, 1978), neuropéptido que expresa la otra población de neuronas de proyección. Esto nos podría llevar a pensar que las dos oleadas de neurogénesis coinciden con la generación de las dos subpoblaciones de neuronas de proyección estriatales, lo cual no es así, ya que en estadios más avanzados del desarrollo las neuronas sustancia P positivas no están restringidas al compartimento estriosomal, si no que también forman parte de la matriz. Es decir, que en la primera oleada se generan mayoritariamente neuronas sustancia P que forman los estriosomas, pero en la segunda oleada de neurogénesis que va a formar la matriz se van a generar ambos tipos de neuronas, encefalinérgicas y sustancia P. A pesar de presentar una neurogénesis separada en el tiempo, la aparición de marcadores de las dos poblaciones se produce aproximadamente en el mismo momento sobre E16 (Song y Harlan, 1994). Sin embargo, a nivel espacial la expresión de ambos neuropéptidos aparece inicialmente en polos opuestos. Así pues, la expresión de sustancia P aparece en primordio estriatal rostral mientras que la expresión de encefalina se encuentra a nivel caudal. Posteriormente la distribución de estos dos tipos de neuronas se homogeniza a lo largo del núcleo estriado (Harlan y col., 1989; Harlan y col., 1987), así como en los dos compartimentos estriatales: la matriz y los estriosomas (Penny y col., 1986; Gerfen y Young, 1988).

El desarrollo del núcleo estriado no termina a nivel embrionario, sino que la formación de conexiones, el establecimiento de circuitos y la maduración de las vías no se produce hasta las primeras etapas de la edad postnatal. La vía estriatonigral es la más temprana; los terminales dopaminérgicos llegan al núcleo estriado en edad embrionaria y forman agrupaciones alrededor de E19-E20 (Moon y Herkenham, 1984; Voorn y col., 1988). Uno o dos días después, los receptores de opiáceos también se agrupan, al igual que las células ricas en receptores D1 para la dopamina y en receptores muscarínicos para la acetilcolina (Moon y Herkenham, 1984; Murrin y Zeng, 1989). Aunque los terminales dopaminérgicos procedentes de la sustancia negra llegan al núcleo estriado durante el desarrollo embrionario, la principal inervación tiene lugar durante la primera semana postnatal (Voorn y col., 1988). El periodo de muerte

neuronal natural acaba a finales de la primera semana postnatal tanto para las células de la matriz como para las de los estriosomas (Fishell y van der, 1991), así las neuronas que se forman primero a E13, son mayoritariamente las primeras en formar proyecciones hacia la sustancia negra y las que sobrevivirán, preferentemente, al periodo de muerte natural. Las terminaciones axónicas primitivas de la vía corticoestriatal no se forman hasta P2, y su desarrollo sigue hasta P7; sin embargo, su maduración sigue durante las tres primeras semanas de vida, y la vía no se considera totalmente formada hasta el final del primer mes postnatal (Sharpe y Tepper, 1998).

4.5. Factores que intervienen en el desarrollo del núcleo estriado

La diferenciación de las células del sistema nervioso es la consecuencia de un complejo programa que dirige la expresión de genes específicos en el interior de cada célula. En dicho programa van a intervenir factores inductores proporcionados por otras células y factores genéticos que se activarán en respuesta a los factores inductores.

4.5.1. Factores que intervienen en la determinación dorso-ventral del telencéfalo

El estudio de los mecanismos que intervienen en la regionalización del telencéfalo ha sido objeto de numerosos trabajos en los últimos años. De manera similar a lo que sucede en otras regiones caudales del sistema nervioso central, se ha descrito la existencia de unos gradientes de moléculas morfogenéticas durante los estadios iniciales del desarrollo del telencéfalo, como FGF, BMPs, Wnts, Shh y ácido retinóico que participan en la determinación dorso ventral (para revisión: Takahashi y Liu, 2006). La regionalización del telencéfalo va acompañada de la expresión de factores de transcripción que interaccionan entre ellos manteniendo dichas identidades regionales y definiendo diferentes poblaciones de progenitores (Wilson y Rubenstein, 2000).

4.5.1.1. Factores implicados en la determinación telencefálica dorsal

La señalización de BMPs y Wnts, no sólo está implicada en etapas tempranas del desarrollo durante la formación del tubo neural, sino que también intervienen en la determinación dorsal del telencéfalo. Así pues, diferentes miembros de la familia de BMPs (BMP-2,4,5,6,7) y Wnts (Wnt-2b, 3a, 5a,7b,8b) se expresan en la línea dorsomedial del primordio cortical (Furuta y col., 1997; Grove y col., 1998). Estudios de pérdida de función muestran claramente el papel de las BMPs en la determinación dorsal (Hebert y col., 2002), ya que ratones que no expresan BMP-5 ni BMP-7 presentan una alteración del desarrollo dorsal del telencéfalo (Solloway y Robertson, 1999). De la misma manera, estudios de mutaciones con pérdida de función de Wnt-3a así como de *lef-1*, un factor de transcripción que media la señalización canónica de Wnts, resulta en una pérdida total o reducción del hipocampo (Galceran y col., 2000; Lee y col., 2000b). Los mecanismos de dorsalización de las BMPs y Wnts incluyen la represión de marcadores ventrales como *Nkx2.1* y *Dlx-2*, así como la inducción y el mantenimiento de marcadores dorsales como *Emx-1*, *Emx-2* y *Lhx-2* (Monuki y col., 2001; Theil y col., 2002). Se ha descrito que la señalización de BMPs desde la línea dorsomedial es funcionalmente redundante con la señalización de Wnts en la especificación de ciertos aspectos de la determinación telencefálica dorsal (Campbell, 2003).

A nivel de la división entre el palio y subpalio se encuentra un centro en el que se producen una serie de moléculas de señalización como FGF-7, moléculas de la familia de EGF, TGF- α , neuregulina 1 y neuregulina 3 y el factor secretado inhibidor de Wnts sFrp2 (Assimacopoulos y col., 2003) que parecen estar implicadas en la determinación cortical pero cuyos mecanismos exactos son desconocidos.

A parte de las moléculas morfogenéticas, análisis genéticos han permitido establecer que la expresión de genes restringida a determinadas regiones también participa en la especificación de la identidad del territorio telencefálico en el que se expresan. Así pues se han descrito genes proneurales

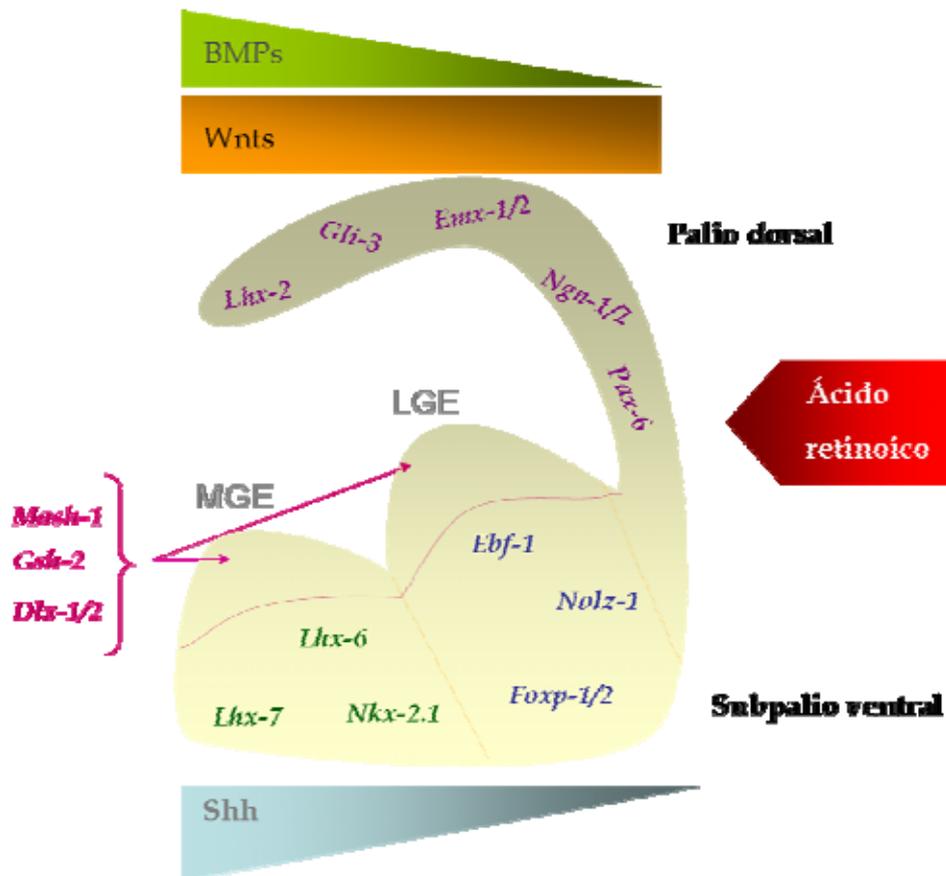


Figura 14. Factores que intervienen en la determinación dorso-ventral del telencéfalo. La representación muestra una sección coronal telencefálica a E12,5 donde se muestran dominios dorsales y ventrales. Las señales extracelulares que intervienen en la determinación inicial del neuroepitelio telencefálico incluyen Shh a nivel ventral, BMPs y Wnts a nivel dorsal y ácido retinoico a nivel intermedio. Subsecuentemente las identidades regionales se mantienen mediante las interacciones cruzadas entre factores de transcripción como Gli-3, Emx-1/2, Ngn-1/2 y Pax-6 a nivel del palio dorsal, Mash-1, Gsh-2 y Dlx1/2 que se expresan en la zona germinal de la LGE y la MGE y Ebf-1, Nolz-1 y Foxp-1/2 se encuentran específicamente en la LGE mientras que Lhx-6, Lhx-7 y Nkx-2.1 se encuentran específicamente en la MGE.

como Neurogenina-1 (Ngn-1) y Neurogenina-2 (Ngn-2) que promueven la dorsalización del telencéfalo mediante la represión de Mash-1, un gen proneural ventral (Fode y col., 2000), o Pax-6 que lo hace reprimiendo la expresión de otro factor de transcripción ventral Gsh-2 (Toresson y col., 2000; Stoykova y col., 2000; Corbin y col., 2000). Otros factores como Emx-1, Emx-2 y Gli-3 también parecen ser reguladores clave de la determinación dorsal durante el desarrollo telencefálico (Yoshida y col., 1997; Theil y col., 1999; Mallamaci y col., 2000; Tole y col., 2000), así como Tlx, Lhx-2, Foxg-1 y COUP-TF1 (Nr2f1) tal y como muestran estudios realizados con ratones mutantes que presentan alelos

nulos de estos genes (Pratt y col., 2002; Cecchi, 2002; Galceran y col., 2000; Fode y col., 2000; Monuki y col., 2001; Stenman y col., 2003b) (figura 14).

Es importante destacar que todas estas moléculas no actúan de manera independiente si no que interaccionan entre ellas definiendo la identidad posicional en el primordio cortical.

4.5.1.2. Factores implicados en la determinación telencefálica ventral

Shh es una molécula morfogenética muy potente que determina la ventralización del tubo neural durante el desarrollo (Echelard y col., 1993; Ericson y col., 1995a; Marti y Bovolenta, 2002; Stamatakis y col., 2005) y que además de intervenir en la determinación de la médula espinal y el tronco encefálico también presenta un papel fundamental en la determinación ventral del telencéfalo (Ericson y col., 1995b; Ericson y col., 1997; Fuccillo y col., 2004) (figura 14). Así lo demuestra un estudio en el que producen la mutación nula de Shh resultando en holoprosencefalia (Chiang y col., 1996; Nanni y col., 1999). La importancia de Shh en la ventralización del telencéfalo se conserva entre especies ya que estudios en ratones, peces y humanos han descrito que defectos en la señalización de Shh provoca la pérdida de estructuras telencefálicas ventrales (Chiang y col., 1996; Muenke y Beachy, 2000; Rallu y col., 2002a). Uno de los mecanismos por los que Shh promueve la identidad telencefálica ventral es mediante la inducción de factores de transcripción ventrales como Nkx2.1, Gsh-2 y Dlx-2 (Corbin y col., 2000; Pabst y col., 2000; Gulacsi y Anderson, 2006). Se ha descrito que la expresión de estos factores de transcripción en respuesta a Shh parece estar implicada en la subdivisión del telencéfalo ventral en la MGE y la LGE (Kohtz y col., 1998). Otro mecanismo de ventralización es la represión por parte de Shh de factores de transcripción dorsales como Gli-3 (Rallu y col., 2002b).

Otra vía de señalización que parece estar implicada en la determinación de estructuras telencefálicas ventrales es la de FGF. Embriones mutantes que no expresan FGF-8 presentan una reducción en la expresión del marcador ventral Nkx2.1 así como alteraciones en la línea media del telencéfalo ventral

(Shanmugalingam y col., 2000; Echevarria y col., 2005). Una de las dianas de señalización de FGF podría ser el factor de transcripción BF-1 tal y como han demostrado estudios *in vitro* (Shimamura y Rubenstein, 1997). Este factor de transcripción está implicado en la especificación regional así como en la regulación de la proliferación celular (Xuan y col., 1995; Dou y col., 1999; Huh y col., 1999; Hardcastle y Papalopulu, 2000).

Por último, el ácido retinoico es otro de los factores que podría estar especificando la determinación del telencéfalo (Figura 3). Se ha descrito que el ácido retinoico juega un papel importante en la determinación del cerebro posterior en desarrollo, la médula espinal y el sistema olfativo (LaMantia y col., 1993; Zhang y col., 2003b; Molotkova y col., 2005). Sin embargo, queda por determinar su papel exacto en la determinación del telencéfalo. Existen varios estudios que muestran evidencias sobre su posible implicación, como el trabajo de Ribes y colaboradores que muestran el papel del ácido retinoico en la regulación de la proliferación de las células neuroepiteliales durante estadios tempranos del desarrollo del telencéfalo (Ribes y col., 2006). Estudios recientes describen también al ácido retinoico como factor importante en la regionalización del telencéfalo lateral ya que induce la expresión de Meis-2, un factor de transcripción expresado por los progenitores neurales de la región intermedia del telencéfalo (Marklund y col., 2004).

Durante el desarrollo existe un gran número de factores de transcripción que se expresan altamente y preferentemente en la MGE y LGE del telencéfalo ventral. Estos reguladores trasccripcionales incluyen Nkx2.1, Lhx-6, Lhx-7, Dlx-1, Dlx-2, Dlx-5, Dlx-6, Notch-1, Notch-3, Mash-1, Gsh-1, Gsh-2, Brn-4, Isl-1, Ebf-1 (Olf1), Nolz-1, Foxp-1, Foxp-2 y Vax-1 (Porteus y col., 1991; varez-Bolado y col., 1995; Grigoriou y col., 1998; Casarosa y col., 1999; Stenman y col., 2003a; Hallonet y col., 1998; Sussel y col., 1999; Garel y col., 1999; Eisenstat y col., 1999; Toresson y col., 2000; Yun y col., 2003; Ferland y col., 2003; Chang y col., 2004; Mason y col., 2005).

En cuanto a la regulación temporal, la mayoría de estos genes se expresan en la MGE y LGE tan pronto como estas dos vesículas ventrales se

empiezan a formar, indicando su papel en la especificación del telencéfalo ventral.

En términos de regulación espacial varios factores de transcripción que incluyen Gsh-2, Notch-1, Mash-1 y miembros de la familia de Dlx, se expresan en la zona germinal de ambas eminencias, la LGE y la MGE. Lo cual nos sugiere que, como las dos eminencias se generan secuencialmente a partir del primordio ventral, en una primera etapa de neurogénesis se generarían unos prototipos de progenitores ventrales telencefálicos en ambas eminencias por mecanismos regulatorios comunes y a medida que progresa el desarrollo, diferentes tipos celulares se especificarían y producirían en estas dos estructuras. Es por ello de interés que Ebf-1, Nolz-1, Foxp-1 y Foxp-2 se expresan selectivamente en la LGE, mientras que Nkx2.1, Lhx-6 y Lhx-7/8 se expresan preferentemente en la MGE pudiendo ser estos los factores de transcripción específicos que van a regular la diversidad de tipos celulares en dicha región (Schuurmans y Guillemot, 2002; Takahashi y Liu, 2006).

4.5.2. Factores implicados en la especificación de subtipos neuronales estriatales

Se han descrito varios factores que podrían estar implicados en la especificación de subtipos neuronales concretos como es el caso de la proteína homeodominio Nkx2.1. Esta proteína se expresa en una subpoblación de precursores de la MGE que se ha descrito que migra al núcleo estriado en desarrollo donde las células subsecuentemente se diferencian en interneuronas colinérgicas, o positivas para calretinina o positivas para parvalbúmina (Marin y col., 2000). La familia de genes Dlx también participan en la generación de neuronas estriatales, pero en este caso en las neuronas de proyección. Esta familia está compuesta por seis miembros, de los cuales Dlx-1 y Dlx-2 se expresan en la zona ventricular y subventricular de las dos eminencias ganglionares (Eisenstat y col., 1999), mientras que Dlx-5 y Dlx-6 se expresan en la zona subventricular y manto de las dos eminencias. Esta familia de genes está implicada en la generación de neuronas tardías del núcleo estriado (Anderson y col., 1997) ya que ratones deficientes de Dlx-1/2 muestran una disrupción de la

zona subventricular acompañada de la alteración en la diferenciación de las neuronas que van a formar la matriz estriatal, pero en ningún caso afecta a la generación de neuronas tempranas. Además estos ratones deficientes de *Dlx-1/2* pierden la expresión de *Dlx-5* y *Dlx-6*, lo cual indica que la expresión de *Dlx-1* y *Dlx-2* precede a la de *Dlx-5* y *Dlx-6* (Eisenstat y col., 1999).

Otro factor implicado en la diferenciación de neuronas estriatales es *Ebf-1* (Garel y col., 1999). Este factor forma parte de la familia de genes *Ebf* y se expresa en el manto de la LGE y parcialmente en la MGE (Garel y col., 1997). El animal nulo de *Ebf-1* presenta alteraciones en la diferenciación a nivel de la transición entre la zona subventricular y el manto que conllevan la atrofia del núcleo estriado perinatal. Estudios recientes describen la implicación de *Ebf-1* en la generación de las neuronas estriatonigrales tal y como describe Lobo y colaboradores (Lobo y col., 2006).

Hay pocos genes que se expresen específicamente en la LGE. *Ikaros* o algún miembro de su familia podrían ser uno de ellos ya que se ha descrito que su expresión en el cerebro podría estar restringida a la LGE (Kohtz y col., 1998). *Ikaros* es un miembro de la familia de factores nucleares que forman “dedos de Zinc”, que incluye también *Ailos*, *Helios* y *EOS* (Rebollo y Schmitt, 2003). Estos factores de transcripción han sido bien caracterizado por su acción en el desarrollo de los linfocitos (Dobi y col., 1997; Rebollo y Schmitt, 2003; Liberg y col., 2003). Sin embargo, su papel en el desarrollo del telencéfalo aún no ha sido estudiado y únicamente está descrito que un factor de transcripción homólogo a *Ikaros* participa en el control de la expresión de encefalina (Dobi y col., 1997), que es uno de los neuropéptidos que co-expresan las neuronas de proyección estriatales GABAérgicas.

El ácido retinoico también parece estar implicado en la determinación de las neuronas estriatales (Liao y Liu, 2005). Diversos trabajos muestran que la maquinaria de señalización del ácido retinoico como enzimas de síntesis y degradación están enriquecidas en la LGE (Li y col., 2000; Ruberte y col., 1993; Zetterstrom y col., 1994). Así mismo, los niveles de ácido retinoico en la LGE son más elevados que en otras regiones del telencéfalo en desarrollo (Toresson

y col., 1999; Liao y col., 2005). Además, el ácido retinoico también está implicado en la regulación de la expresión genética de factores que intervienen en el desarrollo del núcleo estriado como Meis-2 (Oulad-Abdelghani y col., 1997) o Nolz-1 (Chang y col., 2004).

A pesar de los conocimientos existentes a cerca de los factores morfógenos y genéticos que intervienen en la determinación dorso-ventral del telencéfalo así como en el desarrollo del núcleo estriado, aún se desconocen los mecanismos que regulan la especificación de las diversas poblaciones de precursores que existen en las zonas germinales de las eminencias ganglionares, así como los procesos que gobiernan su determinación, migración, diferenciación terminal y establecimiento de conexiones. Es decir, que es necesario continuar investigando el desconocido campo del desarrollo del sistema nervioso para poder llegar algún día no muy lejano a desengranar todas las piezas que forman este complejo puzzle y así, ser capaces de poder restaurarlo cuando éste degenera.

