



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

**Caracterización de factores de
transcripción estriatales para su uso en
la diferenciación de células madre.**

**Tesis presentada por Noelia Urbán Avellaneda
para optar al título de doctora por la Universidad de Barcelona**

I. Introducción

I. INTRODUCCIÓN

El cerebro es el órgano más complejo que podemos encontrar en un ser vivo. Y si hablamos del humano, la complejidad es tan asombrosa como difícil de entender. Nuestro cerebro nos hace curiosos por naturaleza, por lo que el reto de entender el funcionamiento de nuestros propios pensamientos es uno de los más estimulantes que se haya emprendido.

Pese a llevar muchos años buscando una respuesta, lo cierto es que cada paso hacia adelante plantea cientos de nuevas preguntas. Aunque hemos avanzado mucho en el conocimiento de la anatomía y conexiones de nuestro sistema nervioso, todavía no hemos esclarecido totalmente los mecanismos moleculares que están detrás de nuestras acciones. Cuanto más sabemos, más complejos se vuelven los modelos con los que intentamos entender el funcionamiento real de nuestro cerebro.

Uno de los campos que me resultan más estimulantes en la neurociencia es el estudio de cómo se desarrolla el cerebro. La formación del sistema nervioso, con su extraordinaria complejidad, a partir de una sola célula todavía ahora me parece algo increíble. En esta línea, la investigación con células madre puede tener la clave para entender los procesos que permiten la transformación de células indiferenciadas en otras tan distintas y especializadas como las neuronas o los eritrocitos. Estas células, capaces de crear un organismo entero a partir de ellas mismas, nos ofrecen un modelo de estudio perfecto para el desarrollo. Debemos tener en cuenta, sin embargo, que la mejor característica de las células madre, su mantenimiento indefinido en cultivo, puede ser también uno de sus mayores inconvenientes. El cultivo y diferenciación *in vitro* de estas células nos ayuda a entender ciertos aspectos del desarrollo, pero está muy lejos de parecerse a lo que ocurre *in vivo*, donde cada célula está rodeada de otras muchas que colaboran en su especificación final.

El increíble potencial de las células madre ha alimentado también muchas esperanzas de tener la cura para diversas enfermedades. Aunque estamos ya muy avanzados en el uso de terapias con células progenitoras en enfermedades del sistema hematopoyético, en el caso de las enfermedades neurodegenerativas se ha demostrado que estas esperanzas están muy lejos

de convertirse en realidad. Unir la enorme complejidad del uso de las células madre con la del sistema nervioso no ha dado todavía grandes frutos. Quizás debemos esperar a entender mejor ambos sistemas por separado antes de emprender arriesgados ensayos clínicos para curar el Alzheimer, el Parkinson o la corea de Huntington.

1. Desarrollo del telencéfalo

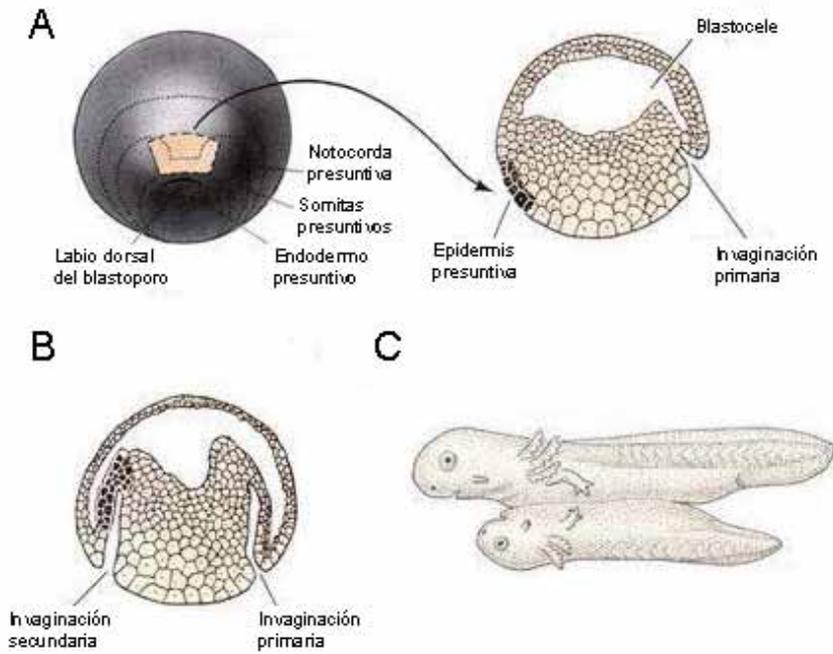
La presente tesis se centra en el estudio del origen de las neuronas de proyección estriatales, por lo que es fundamental conocer los mecanismos que llevan a la formación del estriado durante el desarrollo. Para entender plenamente el desarrollo estriatal, debemos empezar por explicar cómo el epitelio germinativo se transforma en neuroepitelio; cómo éste se regionaliza y da lugar a las principales divisiones del cerebro, entre las que se encuentra el telencéfalo, y cómo a su vez, se forman subdivisiones telencefálicas para generar finalmente lo que conocemos como estriado.

Este proceso de regionalización y especificación celular se da al mismo tiempo que funcionan los estrictos mecanismos de control de la proliferación y la diferenciación neural, por lo que la correcta integración de las múltiples señales que llegan a cada célula es fundamental en la formación del sistema nervioso.

En este primer apartado de la introducción se expondrán los mecanismos generales que consiguen esta integración y dan estructura y funcionalidad al sistema nervioso.

1.1 Inducción neural

Determinar el momento en que una célula embrionaria se convierte en neural ha sido uno de los objetivos de los neurobiólogos del desarrollo desde principios del siglo XX. Los famosos experimentos en *Xenopus* de Spemann y Mangold, mostraron ya en 1924 la existencia, en el estadio de gástrula temprana, de un grupo de células dorsales cercanas al blastoporo capaces de inducir la formación de un nuevo tubo neural cuando eran transplantadas a zonas ventrales de otros embriones (figura1). Durante muchos años tras este descubrimiento, se estuvo buscando el factor responsable de la inducción neural del llamado organizador de Spemann, pero no fue hasta la década de los 90 cuando se encontraron los primeros candidatos gracias a las librerías de cDNA y los nuevos métodos de purificación de proteínas. Entre 1993 y 1994, se identificaron tres proteínas secretadas, noggin, chordin y follistatin, como potentes inductores neurales (Hemmati-Brivanlou et al., 1994;

**Figura1**

Representación gráfica del experimento realizado por Speman y Mangold. **A:** En primer lugar se disecciona un trozo de tejido de la zona cercana al labio dorsal del blastoporo (el organizador) y se transplanta en la parte ventral de otro embrión.

B: la zona transplantada es capaz de inducir una invaginación secundaria que se convertirá en un nuevo tubo neural. **C:** como consecuencia, se forma un animal con dos ejes corporales completos

Lamb et al., 1993; Sasai et al., 1994; Smith et al., 1993). La convergencia de todos los factores identificados en la inhibición de la actividad de las proteínas morfogenéticas del hueso o BMPs (del inglés Bone Morphogenetic Proteins), llevó a formular la teoría de la adquisición del fenotipo neural por defecto. Así, se asumía que, en ausencia de señales externas, las células ectodérmicas se convertían en neuronas mientras que para la aparición del epitelio era necesaria la actuación de las BMPs.

En los últimos años, nuevos descubrimientos han hecho que se abra el debate sobre esta especificación por defecto. Diversos trabajos sugieren que la señalización de los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF, de Fibroblast Growth Factor, en inglés), con ayuda de la inhibición de la vía de Wnt promueve la inducción neural de forma independiente y anterior a su efecto supresor de la actividad de las BMPs (Delaune et al., 2005; Linker and Stern, 2004), e incluso podría reprimir la expresión de BMPs a nivel transcripcional (Londin et al., 2005).

Por otra parte, ahora empezamos a tener marcadores génicos expresados en el tejido neural que nos permitirán conocer los mecanismos celulares necesarios para la inducción neural y la represión de los otros fenotipos. Un gen altamente interesante en ese sentido es Sox2, ya que se ha observado su expresión en células ectodérmicas desde que adquieren el fenotipo de placa neural, y, además, su región reguladora contiene una zona

activadora con sitios de unión a componentes de las vías FGF y Wnt, (Takemoto et al., 2006). Sox2 pertenece a la subclase de factores de transcripción SoxB1, los cuales son necesarios para la expresión de marcadores neurales tempranos como nestina y n-caderina (Matsumata et al., 2005; Tanaka et al., 2004), por lo que parece un buen candidato como desencadenante del fenotipo neural.

Una vez finalizada la inducción de la capacidad neural, son muchos los factores que controlan la aparición de neuroblastos, los precursores neuronales proliferativos. Uno de los más importantes y conservados evolutivamente es el sistema Notch/Delta, que, en *Drosophila*, promueve la conversión de una célula del epitelio germinativo a neuroblasto a la vez que inhibe la conversión de las células vecinas (Campos-Ortega, 1993; Kunisch et al., 1994).

1.2 Especificación telencefálica

Dada la forma alargada del tubo neural, las principales subdivisiones dentro de éste se dan en su eje anteroposterior. Además, dentro de cada zona, la posición dorso-ventral determina el fenotipo final de las células. Aunque la determinación anteroposterior y dorsoventral se tratarán en este apartado por separado para hacer más sencilla su comprensión, no se debe olvidar que son dos fenómenos que se solapan en el tiempo y empiezan en momentos muy tempranos del desarrollo. Tampoco debemos dejar de tener en cuenta que la especificación del sistema nervioso se produce a la vez que la del embrión en su totalidad, por lo que muchas veces no es posible separar ni los efectos de ciertas moléculas a nivel neural de los efectos que tienen en otras estructuras cercanas, ni los que ejercen dichas estructuras sobre el neuroepitelio en formación.

La presencia de organizadores, como el de Spemann en el caso de la inducción neural, es un hecho que se repite a lo largo y ancho del cerebro en desarrollo y en diferentes momentos de éste. Entendemos organizador como un grupo de células (neurales o no), capaces de inducir la especificación de territorios vecinos mediante la formación de un gradiente de factores solubles o morfógenos. Este gradiente morfogenético es captado por las células que tienen a su alrededor como un código que les da información sobre la posición

espacial en que se encuentran. La integración de todas las señales recibidas, tiene como consecuencia la expresión de un determinado patrón de factores de transcripción, que define a su vez el tipo neural en que acaba por diferenciarse la célula.

1.2.1 Determinación Anteroposterior

Las diferencias en la capacidad proliferativa entre las células de distintas regiones anteroposteriores del tubo neural, provocan la aparición de vesículas y segmentos neurales diferenciados durante el desarrollo. La mayor parte del tubo neural de los vertebrados se convertirá en la médula espinal, mientras que la porción más rostral se subdivide en tres vesículas primarias: el prosencéfalo, el mesencéfalo y el rombencéfalo. El prosencéfalo se subdividirá a su vez en prosencéfalo secundario y diencéfalo (figura 2).

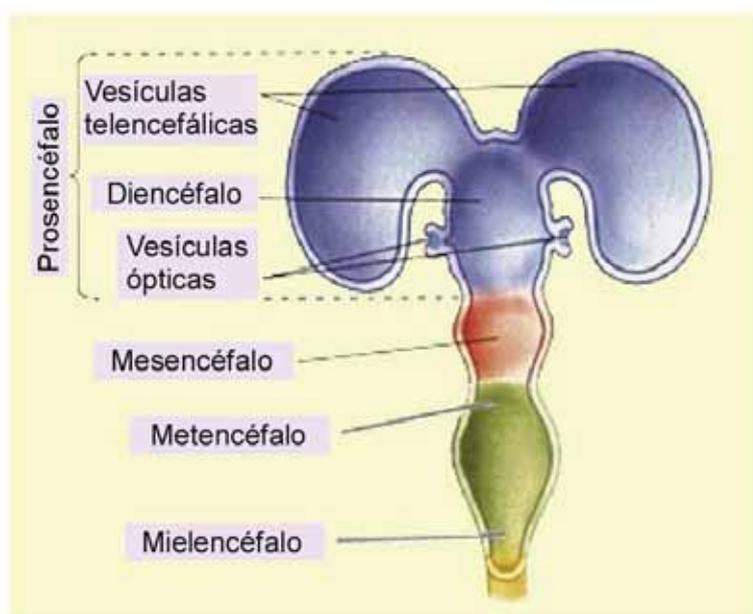


Figura 2: Principales subdivisiones del sistema nervioso. Imagen modificada de la página "The Brain from Top to Bottom" (<http://thebrain.mcgill.ca>).

La teoría más aceptada sobre la determinación antero-posterior del sistema nervioso es la de la adquisición del fenotipo rostral por defecto. Según esta hipótesis, las células neurales recién inducidas son rostrales, es decir, telencefálicas, en ausencia de señales. Así, para obtener un

fenotipo más caudal sería necesaria su modificación o "transformación". Entre los principales factores transformadores que se han descrito hasta el momento, encontramos moléculas tan diversas como el ácido retinoico (RA), wnt/ β -catenina, BMPs o FGF (Altmann and Brivanlou, 2001; Yamada, 1994).

Un ejemplo clásico de regionalización anteroposterior en el cerebro, lo encontramos en la segmentación del rombencéfalo. Siguiendo un modelo homólogo a lo que ocurre con la formación de los segmentos corporales en

Drosophila, esta zona del tubo neural se subdivide en regiones o rombómeros definidos tanto a nivel morfológico como de expresión de los genes de la familia Hox, entre otros. Esta familia de factores de transcripción de tipo homeodominio, consta de trece genes que se encuentran ordenados a nivel cromosómico en el mismo orden en que se expresan a lo largo del eje anteroposterior del embrión. La combinación de genes Hox que expresa un rombómero define, por ejemplo, los músculos que acabarán innervando sus motoneuronas. El control de la expresión de estos genes lo lleva a cabo principalmente uno de los factores transformantes, el RA (Durston et al., 1989). Así, niveles altos de RA inhiben los genes Hox más rostrales y promueven la expresión de los caudales (Simeone et al., 1991). La concentración de esta molécula es 10 veces mayor en la zona posterior del embrión que en la anterior, por lo que es una de las moléculas caudalizantes más importantes de las etapas tempranas del desarrollo.

En el caso del límite entre el mesencéfalo y el rombencéfalo, encontramos otros dos genes homeodominio: *Otx2* y *Gbx2*. Desde el primer momento de la formación de la placa neural, es visible su expresión complementaria, expresándose *Otx2* rostralmente (mesencéfalo y prosencéfalo) y *Gbx2* caudalmente (rombencéfalo) (Millet et al., 1996). La co-represión de ambos factores mantiene sus dominios de expresión separados, estrategia que se repite con otros genes en diferentes zonas del sistema nervioso.

Esta zona del neuroepitelio, perteneciente al rombencéfalo, recibe el nombre de organizador ístmico (IsO). Creando un gradiente de señales morfogenéticas (FGF8, Wnt1 y *Engrailed*), el IsO proporciona información posicional a las células de los territorios adyacentes y promueve la diferenciación hacia un fenotipo mesencefálico de las células situadas rostralmente (*Otx2* positivas) y hacia un fenotipo rombencefálico (cerebelo y otras estructuras del rombencéfalo anterior) de las situadas caudalmente (*Gbx2* positivas). La presencia de FGF8 exógeno en partes más rostrales del cerebro provoca la caudalización de las células en fenotipos que recuerdan a células mesencefálicas y cerebelares (Crossley et al., 1996; Echevarria et al., 2003; Martinez et al., 1999). Así pues, en este caso la molécula responsable de la acción morfogenética del IsO parece ser FGF8.

En el telencéfalo, la naturaleza de los organizadores está todavía sometida a un intenso debate. El mayor grado de divergencia de esta estructura entre las diferentes especies, hace muy difíciles las extrapolaciones, incluso entre vertebrados. Además, debido a su crecimiento irregular, mayor en la parte dorsal que en la ventral, no es fácil establecer divisiones que puedan darnos una idea de la localización de los centros organizadores. El modelo de regionalización telencefálica más aceptado en la actualidad es el llamado modelo prosomérico, descrito en 1993 por Puelles y Rubenstein (Puelles and Rubenstein, 2003; Puelles and Rubenstein, 1993). Dicho modelo se basa en la expresión restringida de determinados genes para establecer los límites entre las regiones (figura 3). Dichos límites no son, ni mucho menos, transversales al eje principal de la estructura, lo que nos da una idea de la compleja combinación de señales que están actuando durante su desarrollo.

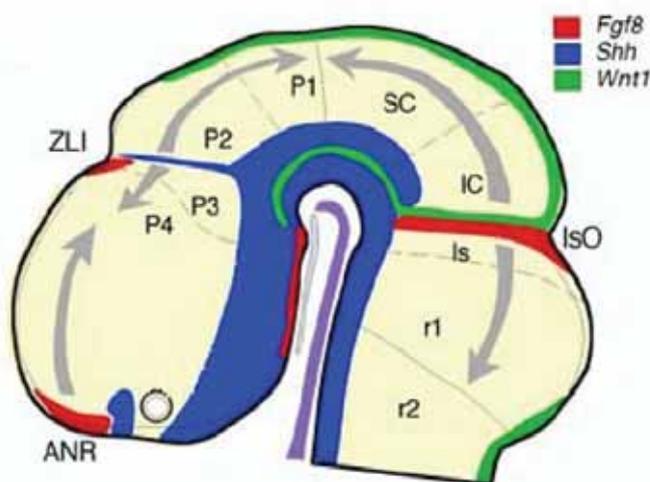


Figura 3

Esquematación de la segmentación del sistema nervioso a E8.5. Las estructuras telencefálicas anteriores derivan del cuarto prosómero, que forma un sinuoso límite con el tercero. Se muestran también los principales organizadores, así como las zonas de expresión de distintas proteínas morfogenéticas.

ANR = Anterior Neural Ridge

IC = Colículo Inferior

SC = Colículo Superior

Is = Istmo

IsO = Organizador ístmico

P1, P2, P3, P4 = prosómeros 1, 2, 3, 4

r1, r2 = rombómeros 1, 2

ZLI = Zona *Limitans* Intratalámica

Modificado de (Echevarria et al., 2003).

El principal organizador prosencefálico propuesto hasta la fecha, es el endodermo visceral anterior o AVE (del inglés Anterior Visceral Endoderm). Este grupo de células con características extra-embriónicas, se encargaría de secretar moléculas que antagonizan los efectos caudalizantes de los factores transformadores, permitiendo así el mantenimiento del fenotipo rostral desde las primeras etapas de la especificación neural (Thomas and Beddington, 1996).

Algo más adelante, aparece otro organizador, esta vez en el propio tejido neural. El ANR (de Anterior Neural Ridge en inglés, también llamado ANB por Anterior Neural plate Border), promueve el fenotipo telencefálico dentro del

prosencefalo desde antes de que se forme el tubo neural. Entre los factores más importantes que secreta se han encontrado varios inhibidores de la vía de Wnt, como Axin (Heisenberg et al., 2001; Masai et al., 1997), o Tlc (Houart et al., 2002). Estos inhibidores son indispensables, por ejemplo, para que aparezca la expresión de dos factores de transcripción cruciales durante el desarrollo de la corteza: BF1 y Emx1 (Houart et al., 1998; Shimamura and Rubenstein, 1997).

En el momento en que se cierra el tubo neural (alrededor de E9 en ratones), el telencéfalo sufre una serie de dramáticos movimientos morfogénicos junto a un alto grado de proliferación, que tienen como consecuencia la formación de las dos vesículas telencefálicas, en las que ya es evidente la regionalización dorsoventral.

1.2.2 Determinación Dorsoventral

La posición en que se encuentra la placa neural al involucionar determina sus principales fuentes de señalización en el eje dorsoventral (figura 4). En la parte superior, el tejido ectodérmico secreta BMPs y Wnts, que además de mantener su fenotipo epitelial, llegan al neuroectodermo subyacente como señales dorsalizantes. El momento y la concentración en que llegan las señales es muy importante, ya que algunas de estas moléculas pueden actuar también como caudalizantes y/o represoras del fenotipo neural.

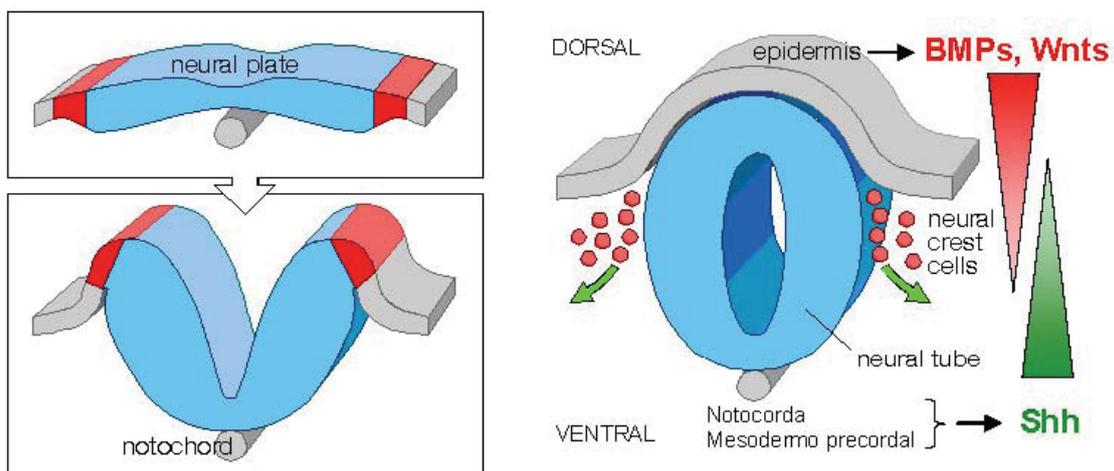


Figura 4

Representación de la involución de la placa neural durante el desarrollo del sistema nervioso. Una vez cerrado el tubo neural, las principales proteínas morfogénicas que llegan al mismo son las BMPs secretadas por la epidermis en la parte dorsal y el Shh procedente de la notocorda o el mesodermo precordial en la parte ventral. Modificado de una ilustración del Dr. Brian E. Stavelev. www.mun.ca

Justo por debajo del tubo neural, se sitúa el tejido mesodérmico de la notocorda, y bajo la parte más anterior, donde ésta no está presente, el mesodermo precordial, ambos con capacidad de secretar Sonic Hedgehog (Shh), posiblemente el factor ventralizante más importante y mejor caracterizado que conocemos hasta la fecha.

En el propio prosencéfalo se empiezan a observar pronto diferencias entre la parte dorsal y la ventral (figura 5). El telencéfalo dorsal o palio queda marcado por la expresión de Pax6, mientras que el telencéfalo ventral o subpalio expresa Nkx2.1 (Corbin et al., 2003). Un poco más adelante en el desarrollo, la proliferación celular en el subpalio provoca la aparición de las llamadas eminencias ganglionares. En la parte anterior se distingue una medioventral, la MGE (del inglés Medial Ganglionic Eminence), seguida de una ventrolateral llamada LGE (del inglés Lateral Ganglionic Eminence). En la parte posterior las dos eminencias se fusionan para dar una sola eminencia llamada CGE (del inglés Caudal Ganglionic Eminence).

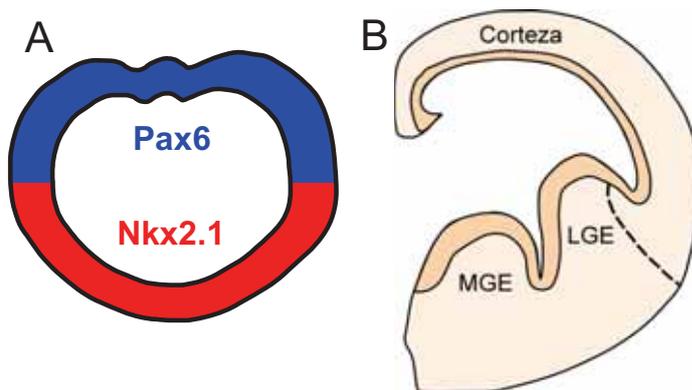


Figura 5

A: Desde las primeras etapas del desarrollo, en la parte anterior del tubo neural es evidente la división entre la parte dorsal (positiva para Pax6) y la ventral (positiva para Nkx2.1) en el tubo neural anterior.

B: La proliferación en el subpalio provoca la aparición de eminencias ganglionares en el mismo. La línea punteada señala la división entre palio y subpalio.

1.2.2.1 Sonic Hedgehog

La acción ventralizante de Shh es muy temprana, desde el estadio de gástrula (Gunhaga et al., 2000). Con la aparición del tubo neural, la principal fuente de este morfógeno es la notocorda, y en las partes anteriores el tejido mesencefálico precordial (Altaba et al., 2003; Briscoe et al., 2001). Además, la señalización de Shh en estas zonas, es capaz de inducir la creación de zonas secretoras de dicha molécula en el propio neuroepitelio. Así, tanto la placa del suelo (floorplate) en la médula espinal como el prosencéfalo basal (la MGE) en el telencéfalo, son capaces de sintetizar Shh (Echelard et al., 1993; Shimamura et al., 1995). Pese a deberse a la misma molécula, cada vez está más claro

que los mecanismos mediante los que actúa Shh son muy diferentes en la médula espinal y el telencéfalo.

En la médula, la ventralización del tejido neural depende de la dosis y duración de la señalización de Shh (Gunhaga et al., 2000). Esto quiere decir que cuanto más alta y duradera sea la concentración de Shh que llega a una célula, más ventral será su fenotipo final (Stamatakis et al., 2005).

En el telencéfalo, en cambio, la dependencia no es tanto de la concentración, sino del momento del desarrollo. De hecho, en experimentos con explantes telencefálicos, la dosis de Shh utilizada no parece influir en el fenotipo adoptado por las células. El efecto en este caso depende casi exclusivamente de la edad embrionaria del explante. En etapas tempranas de la formación del tubo neural Shh promueve la aparición de células con especificación de MGE, marcada por la expresión del gen homeodominio Nkx2.1. Si la inducción se produce a partir de E11.5, por contra, Shh ya no es capaz de incrementar la expresión de Nkx2.1 pero sí de otros genes que se encuentran en la LGE como Dlx, GAD-67 o Ikaros (Kohtz et al., 1998). Esto quiere decir que la capacidad de las células telencefálicas para responder a las señales de Shh varía durante el desarrollo.

La vía de señalización de Shh es una intrincada red de factores de transcripción y receptores celulares que se inhiben unos a otros. Aunque la complejidad del sistema es extraordinaria, de forma simplificada, funciona de la siguiente manera: Shh se une al receptor de membrana patched y esta unión para la represión de patched sobre smoothened, otro receptor de membrana. Una vez desinhibido, smoothened activa los factores de transcripción de la familia Gli, que entran al núcleo y estimulan la expresión de otros genes, entre los que se encuentra el propio patched.

En los últimos años se ha producido un avance extraordinario en la comprensión de los efectos de Shh a nivel celular y molecular gracias a mutantes para los distintos genes de su cascada de señalización. Sorprendentemente, en el animal deficiente tanto para Gli3 como para Shh (Shh^{-/-} Gli3^{-/-}) la especificación ventral está visiblemente recuperada respecto a los dos mutantes simples tanto en la médula espinal (Litingtung and Chiang, 2000; Persson et al., 2002), como, y especialmente, en el telencéfalo (Aoto et al., 2002; Rallu et al., 2002). Las proteínas GLI se comportan como activadores

génicos en su forma completa, pero al ser fragmentadas dan lugar a una molécula más pequeña que posee capacidad represora. Mientras que GLI1 y 2 tienen funciones esencialmente activadoras, en el caso de GLI3 es mucho más importante su función como represor transcripcional. En ausencia de actividad de Shh, GLI3 es degradado y actúa inhibiendo la aparición de genes ventrales. Los resultados obtenidos en el animal $Shh^{-/-} Gli3^{-/-}$, parecen indicar que la principal función de Shh en la determinación dorsoventral es evitar la represión génica causada por la forma corta de GLI3. Además el hecho de que en ausencia de ambos factores el desarrollo se produzca con relativa normalidad, quiere decir que existen otras moléculas capaces de llevar a cabo la regionalización dorsoventral del tubo neural. Entre estas otras señales, las más importantes hasta el momento son el antagonismo de las BMPs, la acción de nodal y, en especial la de FGF.

1.2.2.2 FGF

Desde el ANR, además de inhibidores de los factores transformadores caudales (ver apartado 2.2.1), se secreta FGF8, que es capaz de inducir la especificación telencefálica (Shimamura and Rubenstein, 1997). Aunque Shh mantiene su expresión (Ohkubo et al., 2002), en los últimos años se ha demostrado que el FGF es capaz de conferir fenotipo ventral de forma independiente a Shh (Gutin et al., 2006; Kuschel et al., 2003), por lo que los FGFs se perfilan como los mejores candidatos para ser los responsables del fenotipo de los dobles mutantes $Shh^{-/-} Gli3^{-/-}$. GLI3 inhibe la expresión de FGF, así que en el mutante de $Shh^{-/-}$, no hay expresión de este morfógeno. Al eliminar también GLI3, en el doble mutante $Shh^{-/-} Gli3^{-/-}$, FGF sí puede expresarse, y podría encargarse de la recuperación ventral que se observa en estos animales. La presencia de FGFs no es necesaria solamente para la especificación de las zonas telencefálicas ventrales, sino que también tiene un papel primordial en zonas anteriores. Estas moléculas se expresan en un gradiente rostro-ventral a dorso-caudal, por lo que en su ausencia, además de la falta de desarrollo de las estructuras más ventrales, como la MGE y la LGE, se ve afectada también la regionalización de la corteza cerebral y el bulbo olfativo (Fukuchi-Shimogori and Grove, 2001; Hebert et al., 2003). Así, en los mutantes hipomórficos de FGF8 se observa una expansión de factores de

transcripción posteriores como *Emx2* o *COUPTF-I*, a expensas de otros más anteriores (Garel et al., 2003). Todas estas evidencias indican que FGF actúa como molécula organizadora telencefálica, de forma parecida a lo que ocurre en el *IsO*. Además de su papel como morfógeno, es de sobra conocido que FGF actúa como un potente factor de crecimiento, estimulando la proliferación de los precursores neurales y se utiliza para el cultivo *in vitro* de estos precursores.

1.2.2.3 Otros morfógenos ventralizantes

Las BMPs son secretadas por el ectodermo dorsal no neural, y son responsables, entre otras cosas, del mantenimiento de la expresión de *Gli3* (Meyer and Roelink, 2003), por lo que la inhibición de BMPs podría ser necesaria para dar carácter ventral al telencéfalo. Esta idea se ve reforzada por el hecho de que en la parte ventral del tubo neural se sintetizan inhibidores de BMPs como *Noggin*, *Chordin* y *Follistatin* (revisado en (Wilson and Maden, 2005; Wilson and Houart, 2004)). Más adelante, las BMPs se convierten en factores esenciales para la especificación de estructuras de la línea media dorsal telencefálica, como el hipocampo (Furuta et al., 1997; Panchision et al., 2001). En cualquier caso, el hecho de que los mutantes de BMPs tengan afectados también el mesodermo y la secreción de *FGF8* ha hecho que no se haya llegado todavía a elucidar su papel (Anderson et al., 2000; Spoelgen et al., 2005).

Nodal puede tener también un papel importante, pero dado que es necesario para la gastrulación y la formación del mesodermo, es muy difícil estudiar si afecta específicamente a la determinación neural. Trabajos en *Zebrafish* con proteínas de su vía de señalización demuestran que este factor es necesario para la expresión de *Shh*, por lo que se sitúa en un paso anterior de la ventralización (Hatta et al., 1991; Sampath et al., 1998). Aunque se ha demostrado que *nodal* es capaz de actuar de forma independiente a *Shh* en médula e hipocampo (Mathieu et al., 2002), todavía no se ha estudiado a fondo el caso de estructuras telencefálicas más anteriores.

1.2.2.4 Factores intrínsecos

Las interacciones de todos estos gradientes morfogenéticos, tanto anteroposteriores como dorsoventrales, se traducen en patrones específicos de transcripción génica. Los principales efectores de estas señales son genes homeodominio, como los de la familia Hox que actúan en la regionalización de los rombómeros (ver apartado 1.2.1 de la introducción). El tipo de factores de transcripción que se inducen en respuesta a las distintas señales suele ser similar en todas las regiones del sistema nervioso. También son parecidos los mecanismos moleculares mediante los que interactúan dichos genes. Lo que diferencia las distintas regiones es, por una parte, la expresión de determinados genes de la familia y no de otros (por ejemplo, Pax6 en telencéfalo y Pax2 en las vesículas óticas (Gotz et al., 1998; Nornes et al., 1990)) y la combinación de ellos en una misma célula. Las relaciones entre todos estos genes son tan sofisticadas o más de lo que lo son las relaciones entre los morfógenos que hemos visto.

En el caso de la especificación dorsoventral en el telencéfalo, la parte dorsal queda marcada por la expresión de Pax6 y la ventral por la expresión de Nkx2.1. Sin embargo, algo más adelante en el desarrollo y coincidiendo con la subdivisión del subpallio en LGE y MGE, aparece otro gen homeodominio, Gsh2, en medio de ambos (Corbin et al., 2003) (figura 6). El límite final entre palio y subpallio acaba siendo entre Gsh2 y Pax6, que son capaces de reprimirse mutuamente (Toresson et al., 2000b; Yun et al., 2001). Es más, de forma parecida a lo que ocurre con el ratón *Shh^{-/-} Gli3^{-/-}*, el doble nulo para Pax6 y Gsh2 presenta un fenotipo mucho más leve que el de los ratones que carecen de estos genes por separado (Toresson et al., 2000b).

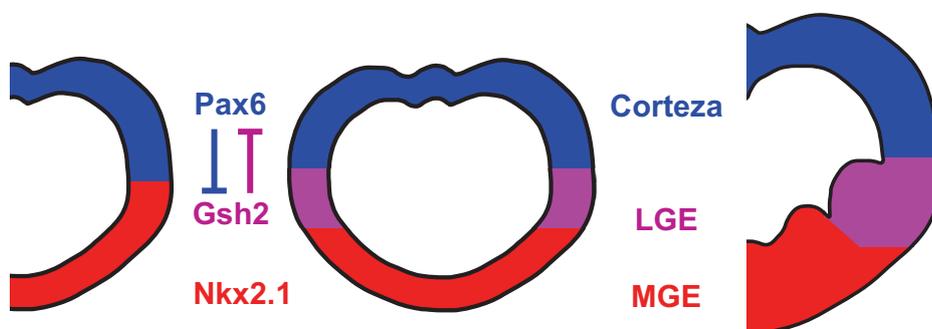


Figura 6

La aparición de Gsh2 entre palio y subpallio es anterior a la formación de las eminencias ganglionares. Gsh2, a diferencia de Nkx2.1, mantiene la organización dorsoventral mediante la mútua represión con Pax6.

Esto nos recuerda una vez más que la evolución no ha dejado la tarea de regionalizar el sistema nervioso a un solo gen, sino que hay gran variedad de ellos haciendo las mismas funciones al mismo tiempo. Así, podemos entender que sea más grave la descompensación de dos de estos factores que se regulan mutuamente que la eliminación de ambos.

Aunque disponemos de varios ejemplos como los aquí mencionados (Shh induce Nkx2.1 y FGF induce BF1), todavía nos queda mucho por saber sobre cómo se integra la información de las señales morfogenéticas con la aparición de los genes marcadores de zona, y cómo estos a su vez generan nuevas señales morfogenéticas.

1.3 Control de la proliferación

El cambio de estado de un neuroblasto indiferenciado proliferante a una célula postmitótica con fenotipo definido es uno de los procesos más importantes en la formación del sistema nervioso. Esta transición está estrechamente regulada para dar el número apropiado de neuronas, astrocitos y oligodendrocitos que formarán el sistema nervioso adulto. Los mecanismos implicados en esta regulación empiezan a conocerse ahora con detalle, e incluyen procesos tan diversos como la acción de la vía de Notch, los factores de transcripción bHLH, las moléculas controladoras del ciclo celular y los cambios epigenéticos producidos por activadores y represores transcripcionales de alto rango, entre otros muchos.

1.3.1 Control del ciclo celular

El ciclo celular consta de 4 fases: G1, S, G2 (colectivamente conocidas como interfase) y M. Las células que han dejado de dividirse, ya sea temporal o definitivamente, se considera que se encuentran en un estado de quiescencia o fase G0.

Durante la fase M se produce la mitosis, es decir, el reparto del DNA entre las dos células hijas, y la citocinesis, que consiste en la división de membrana y citoplasma, produciendo dos células independientes. El tiempo que transcurre entre el fin de la mitosis y el comienzo de la síntesis de DNA (correspondiente a la fase S), se denomina G1 (G de gap o growth). Por último, la fase G2 es el tiempo que transcurre entre la replicación y la mitosis. Durante

las fases G1 y G2, la célula es bioquímicamente muy activa y transcribe gran variedad de genes necesarios para la supervivencia y el correcto funcionamiento del ciclo celular. Las células entran en quiescencia o G0 a partir de G1, ya sea de forma temporal o definitiva, como ocurre en la mayoría de neuronas.

La regulación del ciclo celular incluye varios puntos de control y verificación de que no se ha producido daño genético. Los mecanismos moleculares que controlan el ciclo celular se deben a la interacción de dos clases principales de moléculas reguladoras, las ciclinas y las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs). Ciclinas y CDKs forman un complejo funcional en que las ciclinas son elementos reguladores y las CDKs las unidades catalíticas. Sólo los heterodímeros son funcionales, y, por norma general, las proteínas por separado no tienen ningún efecto sobre el ciclo celular. Al unirse a ciclinas, las CDKs fosforilan una serie de dianas que provocan el paso regulado de una fase a otra del ciclo celular. Las diferentes combinaciones de ciclinas y CDKs determinan los sustratos que serán fosforilados. Mientras que las CDKs se expresan de forma ubicua en todas las células, las ciclinas se expresan de forma diferencial en diferentes células y momentos del desarrollo, y son capaces de responder a señales extracelulares.

Las proteínas inhibitoras del ciclo celular forman parte principalmente de dos familias, las cip/kip y la INK4/ARF. Dada su función de prevenir la progresión del ciclo celular, se conocen también como genes supresores de tumores. La familia cip/kip incluye los genes p21, p27 y p57. Se encargan de detener el ciclo en G1 mediante su unión e inactivación a los complejos ciclina-CDKs. p21 es activada por p53 (la cual, a su vez se induce en respuesta a daños en el DNA). p27 se activa por TGF β (Transforming Growth Factor β), un inhibidor del crecimiento celular. La familia INK4a/ARF incluye p16INK4a, que se une a CDK4 y detiene el ciclo en G1, y p14arf que evita la degradación de p53.

Todavía no está del todo clara la relación entre salida de ciclo celular y especificación de fenotipo. En el ratón deficiente para p27, por ejemplo, el cerebro es más grande pero no se observan grandes alteraciones de regionalización (Fero et al., 1996; Nakayama et al., 1996). Las señales a que está expuesta la célula en la última división determina su fenotipo, ya que las

NSCs cambian su competencia a lo largo del tiempo durante el desarrollo (McConnell, 1995; Qian et al., 2000; Temple, 2001). Por ejemplo en el caso de las neuronas la corteza, su identidad laminar viene determinada por el momento en que realizan su última ronda de replicación. El trasplante de precursores de la VZ temprana, destinados a capas internas de la corteza, en la VZ a una edad posterior reveló que éstos se convertían en neuronas de las capas internas únicamente si el cambio de ambiente se había producido en su última división. En cambio, si una vez transplantados volvían a dividirse, eran capaces de formar neuronas de las capas más externas, en consonancia con el resto de células presentes en la VZ en ese momento (Bohner et al., 1997; McConnell and Kaznowski, 1991).

Otras veces, en cambio, la determinación se da mucho antes que la salida definitiva del ciclo celular. Las células provenientes de un mismo precursor oligodendroglial se diferencian de forma sincrónica *in vitro*, sugiriendo que existe una especie de reloj interno que controla su diferenciación (Temple and Raff, 1986). La naturaleza molecular de este reloj biológico se ha asociado con p27, ya que diversos estudios han demostrado que los niveles de esta proteína van incrementando en los precursores en cada ronda de replicación a medida que se diferencian (Durand et al., 1997; Tikoo et al., 1997).

1.3.2 Vía de Notch

La vía de Notch está altamente conservada desde los animales más simples a los mamíferos, y ha sido implicada en multitud de procesos como el desarrollo embrionario, la formación de estructuras diferenciadas (patterning), o la homeostasis celular (Artavanis-Tsakonas et al., 1999).

Notch es un receptor de membrana que consta de 4 miembros en vertebrados, de los cuales el 1 y el 3 se expresan de forma especialmente intensa en el sistema nervioso. Sus ligandos clásicos son las proteínas de membrana llamadas DSL (Delta, Serrate, Lag2), de las que forman parte la familia Delta, con tres miembros y la Jagged-Serrate, con dos. Así pues, los receptores de la familia Notch son activados por el contacto célula-célula (revisado en (Louvi and Artavanis-Tsakonas, 2006)).

La unión entre ligando y receptor provoca que las presenilinas liberen una parte del dominio intracelular del receptor, el llamado Notch-ICD

(ICD, de IntraCellular Domain en inglés). Esta molécula tiene capacidad para entrar al núcleo, donde regula la actividad transcripcional uniéndose a un complejo proteico, del que forman parte, entre otras muchas proteínas, un factor de transcripción del tipo CSL (CBF-1, Su(H), Lag1) y el coactivador mastermind (figura 7). Los factores tipo CSL se consideran los efectores de la vía canónica de Notch, y su miembro más representativo es RBPJ- κ (revisado en (Kovall, 2008)). Estos factores de transcripción están continuamente unidos al DNA, y pasan de comportarse como represores a activadores tras la unión de Notch-ICD, lo que permite al sistema Notch la rápida regulación de gran cantidad de genes en respuesta a su activación.

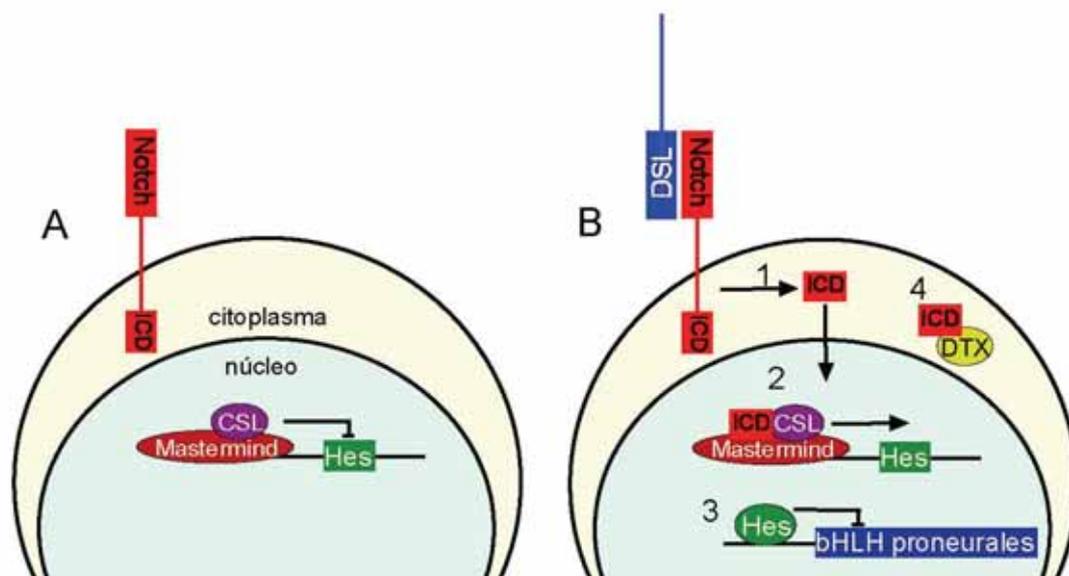


Figura 7

Representación esquemática del funcionamiento de la vía de Notch. **A:** sin activación del receptor, el complejo nuclear que se asocia Notch-ICD funciona como represor transcripcional. **B:** al activarse el receptor, se libera el Notch ICD (1), que entra al núcleo para asociarse al complejo multiproteico, que se transforma en activador de la transcripción en respuesta a dicha unión (2). El incremento de transcripción de los genes de la familia Hes resulta en la inhibición de los genes bHLH proneurales (Mash1, Ngn2, NeuroD) (3). Alternativamente, Notch-ICD puede unirse en el citosol a otros efectores, como los de la familia Deltex (DTX) (4).

Los ligandos de Notch se heredan de forma asimétrica en las células hijas resultantes de la mitosis de precursores neurales telencefálicos (Chenn and McConnell, 1995), contribuyendo así a la especificación de dos tipos neurales distintos a partir de un mismo precursor. Además, la señalización de Notch se da en células vecinas, lo que significa que un pequeño desequilibrio en la misma provocará la diferenciación de dos células, que en principio son exactamente iguales, a fenotipos diferentes (Tanigaki and Honjo, 2007). En el sistema nervioso, los precursores con alta actividad Notch, se mantienen en un

estado indiferenciado, mientras que los que activan Delta se diferencian a neuronas. Así pues, para la diferenciación neural es necesario que las células escapen de la vía de Notch. Los posibles desencadenantes de las diferencias en la expresión de Delta son todavía desconocidos.

Por otra parte, Deltex (DTX) es un factor de transcripción que ha sido implicado en una forma de señalización de la vía Notch independiente a CSL en *Drosophila* (Kishi et al., 2001; Matsuno et al., 1995; Romain et al., 2001; Xu and Artavanis-Tsakonas, 1990). En mamíferos existen 4 genes de esta familia, DTX1 a DTX4 (Kishi et al., 2001; Storck et al., 2005), que funcionan como homodímeros o heterodímeros para unirse directamente a Notch-ICD (Kishi et al., 2001; Takeyama et al., 2003; Yamamoto et al., 2001). Aunque en la mayor parte de casos funcionan como reguladores positivos de la activación de Notch, en ocasiones funcionan también como inhibidores de la vía (Matsuno et al., 1995; Sestan et al., 1999). Sin embargo, los mecanismos exactos mediante los que DTX contribuye a la señalización de Notch, sus dianas potenciales y su posible interacción con los factores de la vía clásica, como RBPJ-κ, son todavía desconocidos.

1.3.3 Factores de transcripción tipo bHLH

La activación de la vía de Notch promueve el mantenimiento de la proliferación, en parte debido a la activación directa de la expresión de los genes bHLH (del inglés basic Helix-Loop-Helix) inhibidores de la familia Hes (Jarriault et al., 1995; Ohtsuka et al., 1999). Estos genes, a su vez, inhiben los bHLH proneurales como Mash1 y NeuroD (Lee, 1997; Sasai et al., 1992), lo que concuerda con la observación de que en la VZ los precursores que expresan Mash1 son precisamente los que no tienen altos niveles de Notch-ICD y a la inversa, los precursores con la vía de Notch activada no son positivos para Mash1 (Tokunaga et al., 2004). Por eso, a los genes Hes, se les ha dado un papel fundamental en el mantenimiento de los precursores neurales (Nakamura et al., 2000; Ohtsuka et al., 2001; Tomita et al., 1996). La relación de la familia Hes con la proliferación neural se hace evidente en el animal deficiente para Hes1 y Hes5, ya que los precursores neurales cultivados en forma de neuroesferas (ver apartado 3.2.2) derivadas del mismo no se expanden adecuadamente ni suplementado el medio con FGF o EGF (del

inglés Epidermal Growth Factor) (Ohtsuka et al., 1999). Diversos trabajos describen que Hes1 reprime, además de la de Mash1, la expresión de p21, controlando así tanto la diferenciación neural como el ciclo celular (Castella et al., 2000; Kabos et al., 2002).

Además de mediar en la vía de Notch, en células neuroepiteliales la expresión de Hes es anterior e independiente a la aparición de los receptores Notch (Hatakeyama et al., 2004). En los animales deficientes para los genes Hes, las células neuroepiteliales se diferencian prematuramente a neuronas. Además, las estructuras cerebrales quedan severamente afectadas indicando que su papel no se basa exclusivamente en el control de la diferenciación, sino que también son necesarios para dar integridad estructural al sistema nervioso (Hatakeyama et al., 2004).

1.3.4 Remodelación de cromatina

Otro mecanismo altamente importante en el estado proliferativo de una célula es el nivel de condensación de su cromatina, y en particular, el patrón específico de genes que se encuentran accesibles. Las principales moléculas controladoras de estos procesos son las histona deacetilasas (HDACs), que forman complejos con otros factores que les dan especificidad. La familia de co-represores groucho/tle forma parte también de estos complejos, y resultan de especial importancia durante el desarrollo del sistema nervioso. Varios de sus miembros se expresan de forma dinámica durante la neurogénesis, y además son capaces de unirse a varias familias de factores de transcripción implicadas en proliferación o especificación de zonas.

Groucho es una proteína que se identificó en *Drosophila* como parte del complejo Enhancer of split, cuyos miembros están implicados en la regulación de la vía de Notch durante el desarrollo de diferentes tejidos (revisado en (Buscariet and Stifani, 2007; Gasperowicz and Otto, 2005)). Groucho actúa interaccionando directamente con los efectores de Notch, que en *Drosophila* reciben el nombre de Hairy/enhancer of split (Paroush et al., 1994), y en vertebrados corresponden a la familia Hes (de Hairy/Enhancer of Split). Los homólogos de Groucho en vertebrados son denominados TLE (de Transducin Like Enhancer of split), de los que hay seis genes distintos tanto en humanos como en ratones. La interacción entre los diferentes Tles y los bHLH

está conservada (Grbavec and Stifani, 1996). Los genes Hes contienen un dominio de interacción con groucho, por lo que reclutan HDACs a los promotores génicos a los que se unen, inactivando la cromatina y, por tanto, la transcripción de dichos genes (Grbavec and Stifani, 1996; Paroush et al., 1994).

Otro claro ejemplo de la importancia de las interacciones de la familia Groucho/Tle con diferentes factores de transcripción en el desarrollo lo encontramos en la división entre mesencéfalo y rombencéfalo, con los genes Otx2 y Gbx2. Los dos factores de transcripción son capaces de unirse físicamente a los corepresores Groucho/Tle, y se ha demostrado que esta unión es imprescindible para la represión de Otx2 por parte de Gbx2, aunque no al revés (Heimbucher et al., 2007).

De hecho, los efectos de estas proteínas son tan amplios que se ha llegado a postular que son capaces de controlar todo el desarrollo del sistema nervioso mediante la estrategia de la represión controlada de represores transcripcionales (Muhr et al., 2001).

Todos estos mecanismos de control de la proliferación no actúan de forma independiente, sino que forman parte de un sistema complejo de interacciones cuyo balance resulta en el mantenimiento o la salida del ciclo celular. Por ejemplo, la activación de Notch inhibe la diferenciación de los precursores neurales activando Hes, que a su vez se ha demostrado que es capaz de reprimir la expresión de p27. Esta represión se consigue mediante el reclutamiento por parte de Hes de HDACs al promotor de p27, lo que resulta en el silenciamiento del gen (Murata et al., 2005).

1.4 Control de la diferenciación neural

Mientras que en *Drosophila* tan sólo el 15% de las células neurales corresponden a la glía, en los humanos el porcentaje se eleva hasta el 90%. Este hecho nos da una idea de la importancia evolutiva y funcional que tienen las células gliales en el sistema nervioso.

Los diferentes tipos neurales se forman durante momentos específicos en el desarrollo que varían según la zona. El control estricto de su proliferación y diferenciación durante el desarrollo es vital para llegar a tener el

número adecuado de células de cada tipo neural. Como norma general, se produce primero la maduración de neuronas, seguida de la de astrocitos para acabar con la de los oligodendrocitos. La maduración de las neuronas se da básicamente durante las etapas embrionarias, mientras que la glía madura en etapas postnatales. Lo que no está tan claro es el momento en que se especifican los precursores que darán lugar a cada tipo neural. Los precursores gliales proliferan una vez especificados como tales, lo que significa que cambian el modo de división asimétrica de las células de las que provienen a la simétrica que permite su amplificación. La mayor parte de las neuronas, en cambio, abandonan rápidamente el ciclo celular y se diferencian terminalmente.

Numerosas evidencias acumuladas en los últimos años, sugieren que los precursores de oligodendrocitos están perfectamente definidos a etapas embrionarias tempranas. Aunque el estudio sobre los precursores de astrocitos no está todavía tan avanzado, lo más probable es que ocurra lo mismo en su caso. Conocer en qué momento un precursor queda especificado, es una tarea realmente complicada debido a que no tenemos marcadores para identificarlos y a que muchos de los genes que creíamos específicos de un tipo neural han resultado encontrarse ampliamente distribuidos entre ellos.

Aunque las células madre neurales pueden darnos mucha información sobre los factores extrínsecos e intrínsecos que controlan la formación de neuronas, oligodendrocitos y astrocitos, lo cierto es que uno de los mecanismos reguladores más importante de estos fenotipos es el contacto directo entre las células. Por eso, es de vital importancia desarrollar métodos para el estudio de la neurogénesis y gliogénesis *in vivo*.

Podemos distinguir varias zonas del epitelio neural en base a la proliferación y estado de diferenciación de sus células (Figura 8). En la zona más cercana al lumen ventricular, la llamada zona ventricular o VZ (del inglés Ventricular Zone), se encuentran los precursores más indiferenciados, las células madre neurales o células neuroepiteliales (Bhide, 1996; Takahashi et al., 1995). Estas células, que forman un epitelio pseudoestratificado, se caracterizan por tener una elevada capacidad de autorenovación (capacidad de formar células idénticas a ellas al dividirse) y proliferación. En momentos tempranos del desarrollo, cuando se acaba de formar el tubo neural, las células neuroepiteliales son el tipo celular principal del sistema nervioso. Hacia E11,

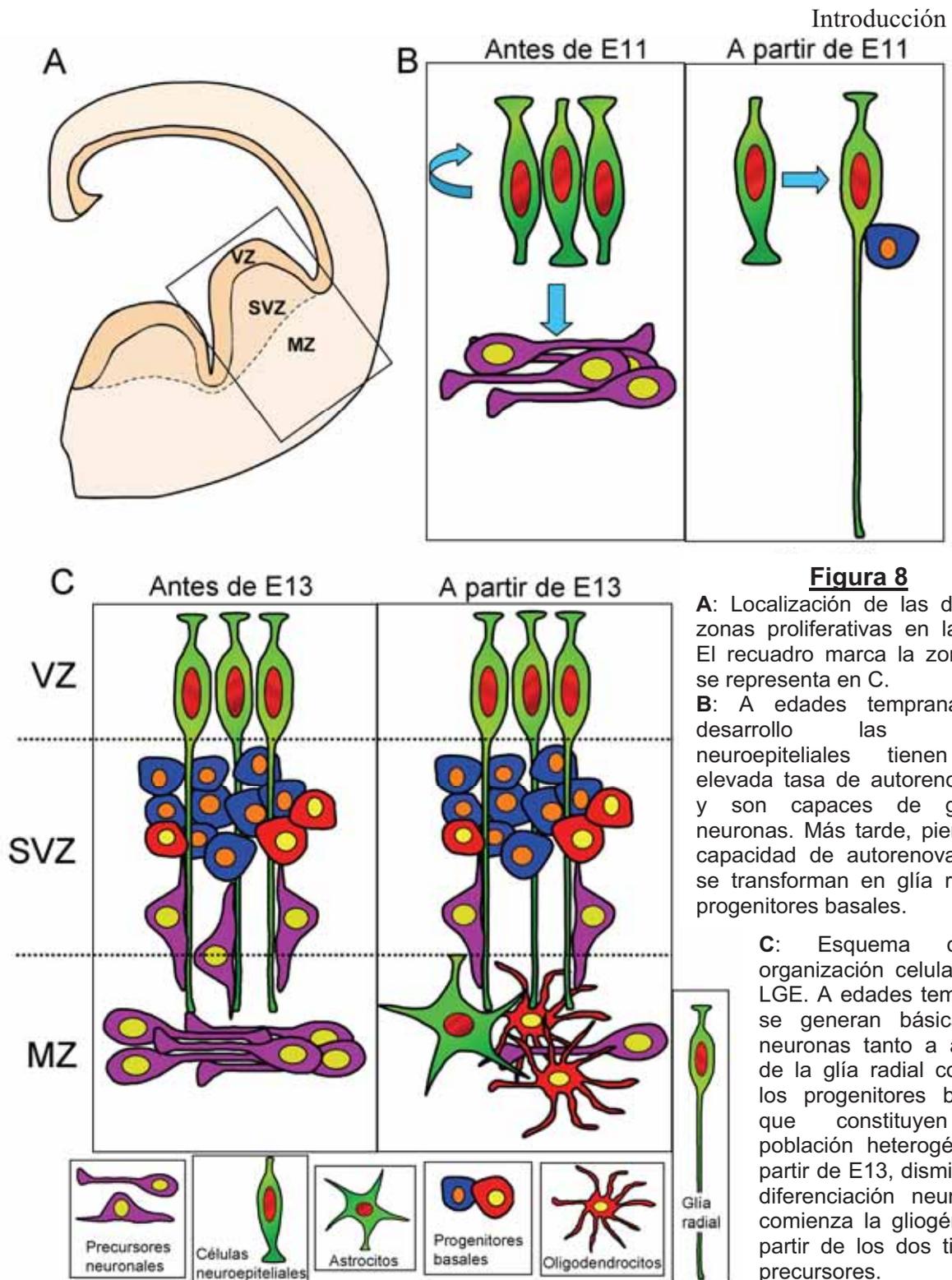


Figura 8

A: Localización de las distintas zonas proliferativas en la LGE. El recuadro marca la zona que se representa en C.

B: A edades tempranas del desarrollo las células neuroepiteliales tienen una elevada tasa de autorenovación y son capaces de generar neuronas. Más tarde, pierden la capacidad de autorenovación y se transforman en glía radial y progenitores basales.

C: Esquema de la organización celular en la LGE. A edades tempranas se generan básicamente neuronas tanto a a partir de la glía radial como de los progenitores basales, que constituyen una población heterogénea. A partir de E13, disminuye la diferenciación neuronal y comienza la gliogénesis a partir de los dos tipos de precursores.

estas células dan lugar, por división asimétrica, a dos tipos de progenitores: la glía radial y los progenitores basales (Haubensak et al., 2004; Miyata et al., 2004; Noctor et al., 2004). La glía radial, como su nombre indica, tiene en común con las células neuroepiteliales que posee una prolongación radial y que está siempre en contacto con el lumen ventricular y la superficie pial. Los progenitores basales, por su parte, son células redondeadas, se liberan de la VZ y se sitúan por debajo de ésta, formando lo que llamamos la zona

subventricular (o SVZ del inglés SubVentricular Zone). Las diferencias dorsoventrales del telencéfalo se hacen evidentes también en relación a la proporción de estos dos tipos de precursores. Mientras que en la parte dorsal la cantidad de progenitores basales es pequeña, en la parte ventral son tan numerosos que la SVZ se convierte en una estructura claramente definida y estable, como se puede observar en las eminencias ganglionares (Haubst et al., 2004; Miyata et al., 2004).

La diferencia entre glía radial y progenitores basales es muy clara en cuanto a localización y morfología, pero no son muchas las características que las diferencian. De hecho, ambos tipos de células provienen de un mismo precursor, son capaces de autorenovarse, de diferenciarse a neuronas y glía, e incluso de dar lugar las unas a las otras (para revisión ver (Huttner and Kosodo, 2005)). Esto, unido a que no disponemos de marcadores fiables para estos tipos celulares transitorios hace que queden todavía muchos interrogantes sobre cómo se producen la neurogénesis y la gliogénesis en el telencéfalo.

La diferenciación y mantenimiento de los precursores depende de las combinaciones de factores de transcripción que expresen, especialmente de los bHLH, que tienen capacidad de inducir o reprimir genes de la vía de señalización de Notch y a su vez están estrechamente controlados por esta vía. Notch se ha relacionado repetidamente con la aparición y el mantenimiento de la glía radial (Anthony et al., 2005; Dang et al., 2006). Por ejemplo, mantener activada la vía de Notch mediante la infección retroviral de Notch-ICD en precursores neurales *in vivo*, provoca su conversión a glía radial (Gaiano et al., 2000). Estas mismas células, más tarde en el desarrollo, se acaban transformando en astrocitos periventriculares de la SVZ, identificados como células madre neurales adultas. Así, parece que el mantenimiento de la vía de Notch juega un papel fundamental en el mantenimiento de células con características de célula madre hasta la vida adulta (Chambers, 2004).

Estudios de seguimiento celular basados en construcciones con el sistema Cre-loxP, demuestran que mientras que la mayor parte de las neuronas de la corteza provienen de la glía radial, en el telencéfalo basal, la mayor parte los derivados de la glía radial desde E13 se convierten en oligodendrocitos (Malatesta et al., 2000; Malatesta et al., 2003). Esto abre la posibilidad de que en el caso de las zonas ventrales los progenitores de

neuronas y glía se encuentren separados desde muy temprano en el desarrollo. A su vez, los precursores basales de la zona ventral son primordialmente neurogénicos hasta que hacia E13 empiezan a expresar receptores de EGF. La distribución asimétrica de este receptor entre las células hijas determinará si se acaban diferenciando a neuronas o astrocitos (Sun et al., 2005). Así pues, se puede considerar que la SVZ pasa de ser una estructura primordialmente neurogénica en etapas tempranas del desarrollo a ser gliogénica en etapas embrionarias tardías y postnatales y esto se traduce en las diferencias temporales que existen entre la generación de los diferentes tipos neurales.

Al convertirse en células postmitóticas, ya sea a partir de una célula neuroepitelial, un progenitor basal o una célula de la glía radial, las neuronas recién generadas abandonan las zonas proliferativas y se dirigen hacia regiones más alejadas de los ventrículos, donde adquieren todas las características que definen su fenotipo final.

1.4.1 Neurogénesis

La aparición de células con marcadores neuronales se produce en diferentes momentos en las distintas zonas del sistema nervioso. En vertebrados, por ejemplo, las neuronas de la médula espinal se generan antes que las del telencéfalo, y también aparecen antes las neuronas en las partes ventrales que en las partes dorsales del sistema nervioso (revisado en (Hollyday, 2001)).

El fenotipo final de las neuronas generadas viene determinado por la coexpresión en las células de factores de transcripción específicos, que traducirán la información posicional recibida en forma de moléculas morfogenéticas, como hemos visto en los puntos anteriores. De las diferentes regiones especificadas durante el desarrollo en el telencéfalo, se derivan tipos diferentes de neuronas. Por ejemplo, en el palio se generan mayoritariamente neuronas de proyección excitatorias glutamatérgicas que poblarán las diferentes capas de la corteza cerebral. Del subpalio, en cambio, se derivan principalmente neuronas GABAérgicas inhibitorias, tanto las de proyección que formarán los ganglios basales como las interneuronas que se extenderán por el telencéfalo y llegarán a formar parte también de la corteza (Parras et al., 2002).

La interacción de Notch-ICD con los factores de transcripción tipo CSL se traduce en la activación de la síntesis de los genes bHLH inhibidores (Hes1 y Hes5), y la inhibición de los activadores (Mash1, Ngn2), que son necesarios para la diferenciación de los precursores neurales a neuronas (figura 9). Hes1 y Hes5 son capaces de inhibir la acción de Mash1 tanto a nivel transcripcional como a nivel proteico. En el primer caso lo hacen mediante su unión al promotor y la formación de un complejo del que forman parte, entre otras, HDACS y proteínas de la familia groucho-tle. En el segundo caso, Hes se une a E47, un factor de transcripción que dimeriza con Mash1 y es imprescindible para su actividad. La unión de Hes con E47 no es funcional, y evita la formación del dímero con Mash1 (revisado por (Kageyama et al., 2005)).

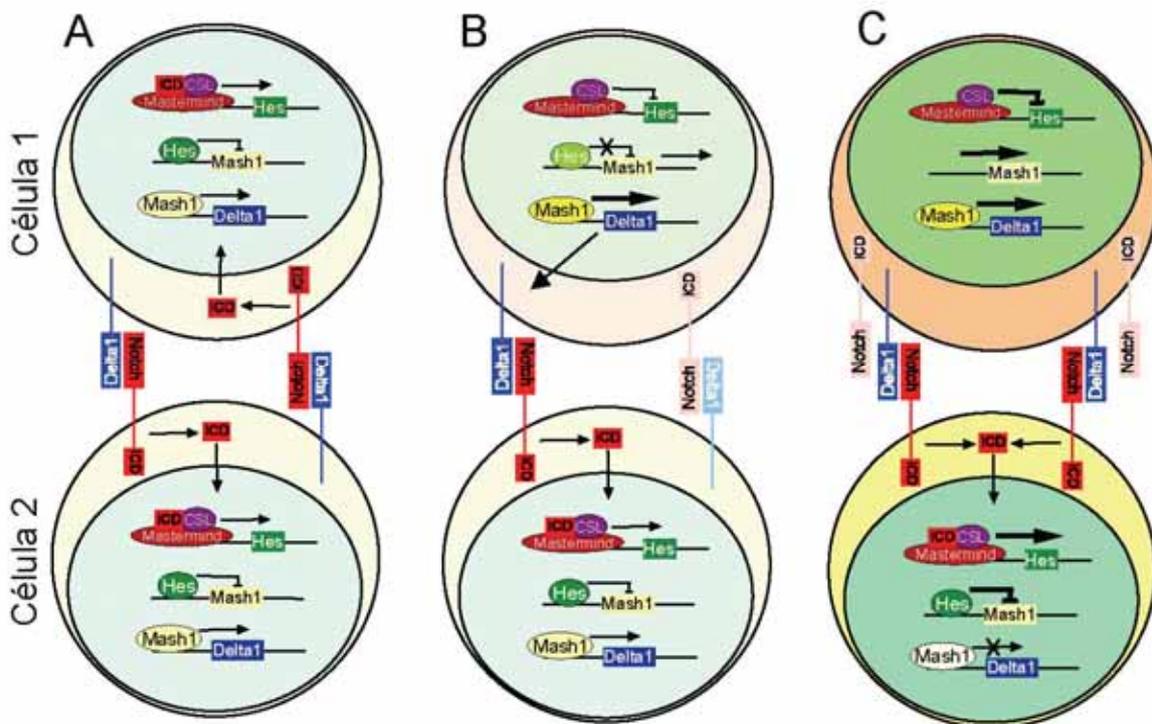


Figura 9

A: Situación en que dos células vecinas expresan los ligandos y receptores de Notch por igual.
B: Una leve disminución en la expresión de Delta1 por parte de la célula 2 produce una disminución de la activación de Notch en la célula 1 que se traduce en una inhibición de los genes Hes. La falta de Hes hace que se desreprima la expresión de Mash1, y el aumento de Mash1 induce en mayor medida la expresión de Delta1.
C: El incremento de Delta1 en la célula 1 se traduce en una mayor estimulación de los receptores Notch en la célula 2, lo que incrementa los niveles de Hes. Con niveles altos de Hes, Mash1 queda reprimido y, por tanto, también queda disminuida la expresión de Delta. Esto hace que se acentúe la pequeña diferencia generada y favorece la diferenciación de dos tipos celulares distintos a partir del mismo precursor. En este caso, la célula 1 escapa a la vía de Notch y se convertiría en una neurona. La célula 2, en cambio, tiene niveles altos de activación de Notch, por lo que se mantendría en estado indiferenciado.

La expresión de Mash1 es fundamental para la aparición de Delta1, y, por tanto, para que los precursores puedan abandonar la proliferación dependiente de Notch y diferenciarse (Casarosa et al., 1999). En las células que tienen altas concentraciones de Notch-ICD, la presencia de Hes impide la expresión de Mash1, sin el cual no se sobreexpresa Delta. Al expresar menos Delta, estas células con la vía de Notch activada no estimulan adecuadamente la vía de Notch en las células vecinas. Al disminuir la represión ejercida por Notch-ICD y disminuir también la concentración de Hes, se produce una des-represión de Mash1 en estas células adyacentes a las que tienen activada la vía de Notch. Al poder expresarse Mash1, este incrementa la expresión de Delta1. El incremento de Delta, provocará una activación todavía mayor de Notch en la primera célula, formando un bucle por el que unas células activan cada vez más la vía y otras escapan a ella (figura 9).

El estudio del knockout (KO) de Mash1 ha revelado que, además de los efectos celulares no autónomos debidos a la desregulación de la vía de Notch, este gen también promueve por sí mismo una serie de genes que inducen la diferenciación neuronal de los precursores. Resulta de especial interés su capacidad para promover la expresión de los genes de la familia Dlx, ya que estos son unos de los genes promotores del fenotipo neuronal mejor caracterizados (Anderson et al., 1997b; Eisenstat et al., 1999). Recientemente se ha demostrado que Mash1 puede unirse a la región intergénica de Dlx1 y Dlx2, y promover su transcripción (Poitras et al., 2007). Este hecho puede contrastar con el resultado obtenido de la caracterización del KO de Mash1, ya que en este animal se observa un incremento de la expresión de los genes Dlx (Yun et al., 2002). Esto se explica por un efecto no autónomo de la falta de Mash1. Al no haber Mash1, no se produce el incremento de Delta en los precursores en diferenciación y, por tanto no se activa correctamente la vía de Notch en los precursores proliferantes, lo que provoca su salida prematura del ciclo celular y la aparición de marcadores neurales tempranos como los genes Dlx (Casarosa et al., 1999; Yun et al., 2002), en detrimento de la glía, que requiere del mantenimiento de dichos precursores hasta edades más tardías.

Cabe destacar que la regulación de los genes Dlx, los siguientes en la cadena de diferenciación neural en el subpalo, es altamente complicada. En su región reguladora se han encontrado elementos de unión a distintos factores

de transcripción presentes durante la formación de la LGE, como el propio Mash1, Meis2, Nkx2.5, Dlx y otros factores no identificados (Poitras et al., 2007). Esto quiere decir que su expresión puede regularse de multitud de formas distintas y hace que no resulte extraño su incremento en los KOs de Mash, ya que cualquiera de los otros genes podría compensar su ausencia. Además, Dlx1/2 puede unirse tanto a su propia región reguladora, como a la de Dlx5/6. Esto significa que una vez iniciada su expresión, Dlx1/2 es capaz de controlar sus propios niveles e induce la expresión de Dlx5/6, que se han implicado en etapas de la diferenciación neural un poco más tardías (Poitras et al., 2007; Zerucha et al., 2000). A todas estas funciones de Dlx, se suma también su implicación en la especificación de distintos tipos neuronales (Anderson et al., 1999; Cobos et al., 2005; Ghanem et al., 2007) y su necesidad para la migración celular (Anderson et al., 1997a; Cobos et al., 2007; He et al., 2001; Le et al., 2007).

La inhibición de los tipos gliales en el momento de la especificación neuronal es también muy importante para la correcta formación del cerebro. La expresión de Ngn1 en neuronas, por ejemplo, inhibe la diferenciación de astrocitos evitando la activación de la principal vía promotora de la astrogliogénesis, la JAK/STAT (Sun et al., 2001).

Al mismo tiempo, la especificación neural no es importante sólo para la aparición de las neuronas, sino que contribuye a la aparición de los fenotipos gliales. Además del mantenimiento de una reserva de precursores mediante la vía de Notch, las neuronas tienen otras formas de influir en la diferenciación glial. Por ejemplo, se ha descrito que secretan citoquinas que promueven la aparición de la glía (Barnabe-Heider and Miller, 2003)

1.4.2 Oligodendrogénesis

Al igual que las neuronas, los oligodendrocitos aparecen en diferentes momentos en distintas zonas del cerebro. Las oleadas de aparición se dan tanto en etapas embrionarias como postnatales, y las células generadas en las diferentes oleadas, sorprendentemente, parecen poder sustituirse unas a otras. Especialmente destacable resulta el hecho de que la primera oleada de oligodendrocitos telencefálicos, que se da en la MGE hacia E12.5, parece ser totalmente eliminada en etapas posteriores y sustituida por oligodendrocitos

producidos en la LGE a E14.5 o en la corteza en edades postnatales tempranas (Kessar et al., 2006; Pringle and Richardson, 1993) (figura 10).

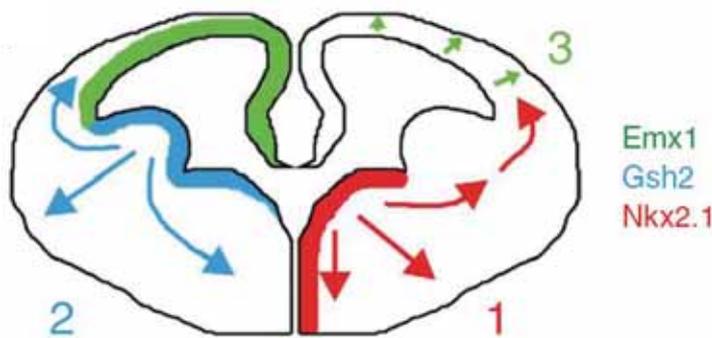


Figura 10

Origen de las principales oleadas de oligodendrogénesis en el telencéfalo. La primera oleada se genera en la MGE (1), la segunda en la LGE (2), y la tercera en la corteza (3). Tomado de (Kessar et al., 2006)

Aunque los oligodendrocitos están distribuidos por todo el sistema nervioso, la mayor parte los precursores del linaje oligodendroglial son especificados en zonas ventrales del neuroepitelio gracias a la señalización de Shh (revisado por: (Miller, 2002; Richardson et al., 2000; Spassky et al., 2000)). Pese a que la idea del origen ventral estuvo vigente durante mucho tiempo, en la actualidad sabemos que se produce oligodendrogénesis también en las zonas dorsales, de forma independiente a la vía de Shh, en muchos casos en respuesta a FGF (Cai et al., 2005; Chandran et al., 2004; Fogarty et al., 2005; Vallstedt et al., 2005). El PDGF (del inglés Platelet Derived Growth Factor) se ha implicado en la proliferación y supervivencia de los oligodendrocitos (Barres and Raff, 1994; Fruttiger et al., 1999), pero todavía no está claro si tiene un papel en su especificación durante el desarrollo. En cambio, sí parece tener un efecto promotor de oligodendrogénesis a costa de la diferenciación de neuronas en precursores extraídos de la SVZ adulta (Jackson et al., 2006).

Como hemos visto, el mantenimiento de precursores indiferenciados es de vital importancia para la aparición de la glía, y este es posible gracias a la vía de Notch. En los mutantes de Delta1, no se forman oligodendrocitos, ya que los precursores se diferencian prematuramente a neuronas (Park and Appel, 2003). Así pues, Notch parece ser un factor necesario pero de forma permisiva más que inductora para la aparición de estas células gliales (Wang et al., 1998).

La aparición de oligodendrocitos está regulada y depende de la expresión de los genes tipo bHLH Olig, ya que en los mutantes de estas proteínas, no se encuentran precursores oligodendrogliales (Lu et al., 2002;

el incremento de Dlx1/2 inhibiría la transcripción de Olig2, contribuyendo a la separación de los dos tipos neurales (figura 11)

En la generación de oligodendrocitos, además, se ha descrito que intervienen ciertos ligandos específicos de Notch que promueven su aparición activando vías distintas a la clásica de CSL. Por ejemplo, las proteínas de membrana NB3 y F3/contactina son expresadas por neuronas, y activan, mediante la vía de Notch, el factor DTX1 en los oligodendrocitos que tienen a su alrededor, lo que estimula su diferenciación (Cui et al., 2004; Hu et al., 2006; Hu et al., 2003).

1.4.2.1 Aplicaciones del cultivo *in vitro* de precursores oligodendrogiales

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad desmielinizante, neurodegenerativa de causa desconocida para la que no existe cura. Se caracteriza por la aparición de focos de desmielinización esparcidos en el cerebro y parcialmente también en la médula espinal, causados por el ataque del sistema inmunitario contra la vaina de mielina de los haces axonales. Se han llevado a cabo algunos ensayos clínicos en estos pacientes, utilizando sobretodo moléculas moduladoras del sistema inmune (Invernizzi et al., 2008; Weinstock-Guttman et al., 2008), pero la remielinización de los axones se perfila como la mejor terapia para esta enfermedad, especialmente si se combina con terapias protectoras (revisado en (Gallo and Armstrong, 2008))

El espectacular avance llevado a cabo en los últimos años en las técnicas de cultivo *in vitro* de precursores oligodendrogiales, y en su posterior maduración (Mothe and Tator, 2008; Parr et al., 2008; Sher et al., 2008b) ha abierto la posibilidad de realizar trasplantes de precursores neurales en esta enfermedad con la esperanza de proteger las células antes de su degeneración o, incluso, de sustituirlas. En este caso, la sustitución celular tiene bastantes más posibilidades de darse con éxito que en las enfermedades neurodegenerativas, ya que la función de los oligodendrocitos parece ser básicamente la mielinización axonal, por lo que, a diferencia de las neuronas, no deben estar conectados con unas dianas específicas para llegar a ser funcionales. Así pues, la terapia con precursores oligodendrogiales derivados de NSCs es una terapia posible y prometedora para el tratamiento de

enfermedades en que se da un proceso de desmielinización axonal (revisado en (Sher et al., 2008a)).

1.4.3 Astrogénesis

La especificación y maduración de astrocitos es la menos conocida de los tipos neurales. La principal hipótesis de la que disponemos, es que se forman a partir de la glía radial, especialmente en etapas tardías del desarrollo. De hecho, se considera probado que la glía radial acaba diferenciándose terminalmente a astrocitos (Merkle et al., 2004). Además en otros estudios se ha comprobado que el mantenimiento de la actividad de Notch en los precursores neurales mediante infección retroviral, promueve la aparición de células de glía radial, que también acaban diferenciándose a astrocitos (Dang et al., 2006; Gaiano et al., 2000). El momento exacto en que aparecen los precursores astrocitarios no ha sido determinado todavía debido a la falta de marcadores específicos. Lo que está cada vez más claro es que la diversidad de astrocitos presentes en el sistema nervioso es mucho mayor de lo que se imaginaba y, por tanto, también lo son los mecanismos reguladores de su diferenciación.

Una de las vías más conocidas capaz de promover la diferenciación astrocitaria es la de EGF. Como se ha mencionado antes, en ciertas divisiones asimétricas de la SVZ, el receptor de EGF (EGFR) se distribuye de forma desigual entre las células hijas (Sun et al., 2005). El incremento de EGFR en los precursores neurales, hace que se vuelvan capaces de responder a las citoquinas, como LIF (del inglés Leukemia Inhibitory Factor) y CNTF (del inglés Ciliary Neurotrophic Factor). Estas, a su vez activan la expresión y la actividad de Stat3, que promueve la diferenciación a astrocitos (Burrows et al., 1997; Lillien and Gulacsi, 2006; Viti et al., 2003). Otro de los factores descritos como promotores de la astrogliogénesis son las BMPs (Gross et al., 1996), mediante la inducción de Smad1. Las cascadas de estos factores confluyen en la formación de un complejo activador en el promotor de GFAP que incluye factores de transcripción como Stat1, Stat3 y Smad1, y los coactivadores p300/CBP (Bonni et al., 1997; Nakashima et al., 1999).

2. Histología y desarrollo del núcleo estriado

Podemos considerar la LGE como el primordio estriatal, pero una vez formada, todavía falta mucho para que esta estructura sea plenamente funcional, ya que la maduración de los tipos de células neurales y el establecimiento de conexiones se extiende durante mucho tiempo, incluso en etapas postnatales. En este apartado se intentará dar una visión general de todo este proceso de maduración empezando por explicar a qué nos referimos al hablar de núcleo estriado y acabando por las consecuencias de su mal funcionamiento en ciertas enfermedades neurodegenerativas.

2.1 Histología y organización de los ganglios basales

Los ganglios basales están constituidos anatómicamente por el núcleo estriado (subdividido en caudado y putamen en primates y humanos), el globus pallidus, y el núcleo accumbens. Estos núcleos forman una estructura compleja y asociada funcionalmente con otras estructuras telencefálicas más o menos distantes como la corteza cerebral, y también con estructuras diencefálicas como el tálamo o el núcleo subtalámico y mesencefálicas como la sustancia negra (Bolam et al., 2000; Parent et al., 1995) (figura 12). Este conjunto de núcleos áltamente interconectado entre sí, juega un papel fundamental en el control de funciones motoras, cognitivas y límbicas.

La principal fuente de información, en forma de aferentes axonales, de este conjunto de núcleos es la corteza cerebral, siendo el núcleo estriado el que recibe la mayoría de las conexiones. Al estriado llegan también axones procedentes de la sustancia negra pars compacta, el tálamo y núcleos del tronco encefálico como el rafe o locus coeruleus. Así pues, el estriado es el encargado de integrar la información de todas estas zonas y la reenvía mediante eferencias hacia el segmento interno del globus pallidus y la sustancia negra pars reticulata, que, aunque separados espacialmente, forman una unidad funcional. Tras pasar por estos núcleos, la información es enviada al tálamo, desde donde vuelve a la corteza cerebral, cerrando así el circuito conocido como córtico-estriatal-tálamo-cortical (Bolam et al., 2000; DeLong and Wichmann, 2007; Gerfen, 1992; Parent et al., 1995).



Figura 12

Principales conexiones entre los núcleos que forman los ganglios basales. Como se observa, el estriado recibe eferencias principalmente de la corteza, el tálamo y la sustancia negra pars compacta (SNc). A su vez, el núcleo estriado tiene dos vías eferentes principales, ambas GABérgicas y, por tanto, inhibitorias. Los axones de la vía directa van a la parte interna del globo pálido (GPI) o a la sustancia negra pars reticulata (SNr). Los de la vía indirecta proyectan a la parte externa del globo pálido (GPe), desde donde se envían axones inhibitorios a neuronas glutamatérgicas del núcleo subtalámico (STN), que a su vez proyectan al GPI y la SNr. Así, a la unidad funcional formada por el GPI y la SNr, llegan señales inhibitorias de la vía directa y señales activadoras procedentes de la vía indirecta. El balance entre los dos tipos de señal es fundamental para el correcto funcionamiento de los ganglios basales. La información integrada de esta manera, se envía al tálamo, desde donde llega de nuevo a la corteza.

La población neuronal del núcleo estriado está constituida en un 90-95% por neuronas de proyección, que por su tamaño y alto contenido en espinas dendríticas se han denominado neuronas espinosas medianas o MSNs (del inglés Medium Spiny Neurons) (Oertel and Mugnaini, 1984; Ribak et al., 1979). Todas ellas son GABAérgicas y, por tanto, inhibitorias. Está descrito que la mayoría de las MSNs expresan la proteína DARPP-32 (Ouimet et al., 1992; Gerfen, 1992), pero se distinguen dos grupos principales: las que expresan encefalina y el receptor D2 de dopamina, y las que expresan sustancia P, dinorfina y el receptor D1 de dopamina. Funcionalmente, las neuronas encefalinérgicas proyectan al segmento externo del globus pallidus por lo que se denominan también estriatopalidales. Las MSNs positivas para sustancia P, por su parte, proyectan mayoritariamente a la sustancia negra pars reticulata o al segmento interno del globus pallidus y reciben el nombre de estriatonigrales

(Gerfen et al., 1990; Gerfen and Young, III, 1988; Le et al., 1990). Así quedan definidas las vías indirecta y directa, respectivamente, del estriado. Los modelos actuales sobre las funciones de los ganglios basales sugieren que las dos poblaciones de MSNs transmiten informaciones opuestas pero equilibradas, que se encargan de modular la respuesta que dan los ganglios basales a los distintos estímulos que reciben (Albin et al., 1989; DeLong and Wichmann, 2007; Graybiel, 2000). A pesar de ser dos poblaciones claramente separadas a nivel funcional, los mecanismos que llevan a la diferenciación de las MSNs positivas para encefalina y para sustancia P no se conocen con detalle todavía.

A nivel estructural, las MSNs están organizadas en dos compartimentos: alrededor del 15% de ellas se encuentran en forma de agregados o estriosomas (patches) y el resto están distribuidas alrededor de estos agregados, en la matriz (matrix) (Gerfen, 1992). Los estriosomas son ricos en sustancia P, mientras que en la matriz encontramos MSNs estriatopálidas y estriatonigrales en proporciones parecidas (Gerfen, 1985; Graybiel and Ragsdale, Jr., 1978). La posible distinción funcional entre los dos compartimentos no está clara todavía, y es un asunto de intensa investigación en la actualidad (Graybiel, 2005) (figura 13).

El 5-10% de neuronas restantes, son interneuronas, que pese a su escaso número tienen un papel fundamental en la regulación de la actividad del núcleo estriado. Se han caracterizado 4 tipos de interneuronas que son: a) colinérgicas, de gran tamaño (Bolam, 1984), b) GABAérgicas que contienen parvalbúmina, algo mayores que las neuronas de proyección (Gerfen, 1985), c) GABAérgicas de tamaño mediano que contienen calretinina (Jacobowitz and Winsky, 1991; Resibois and Rogers, 1992) y d) las que coexpresan somatostatina, neuropéptido Y y NOS (Nitric Oxide Synthase) (Morello et al., 1997; Vincent et al., 1983).

2.2 Aparición del primordio estriatal

Las neuronas de proyección estriatales provienen principalmente de la LGE, mientras que las interneuronas colinérgicas y GABAérgicas migran tangencialmente desde la MGE (Campbell et al., 1995; Deacon et al., 1994; Marin et al., 2001). En este apartado se intentará arrojar luz sobre los

mecanismos que controlan la determinación de la LGE y sobre cómo empiezan a diferenciarse las futuras células estriatales.

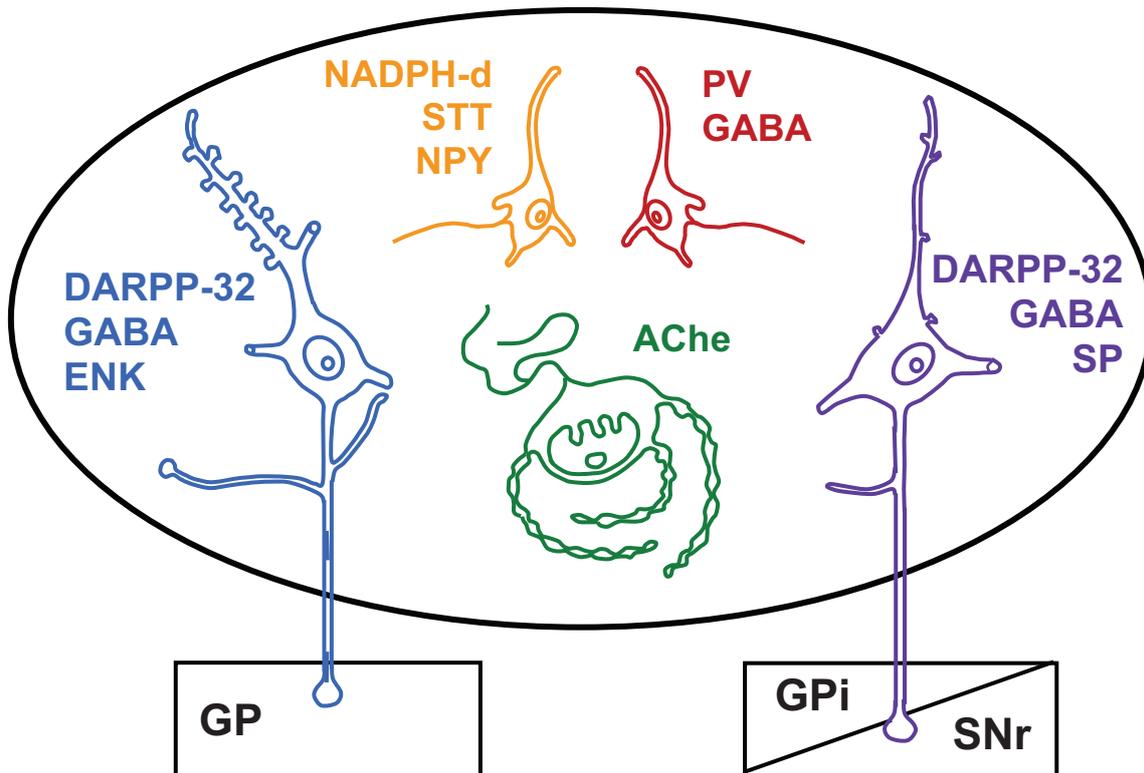


Figura 13

Representación esquemática de los diferentes tipos neuronales presentes en el núcleo estriado, así como del destino de los axones de sus neuronas de proyección. Tomado de la tesis de Raquel Martín Ibáñez.

2.2.1 Especificación de la zona intermedia

La localización de la LGE implica que se de la convergencia de señales dorsales y ventrales. Hasta este punto llegan, de forma débil, los gradientes morfogenéticos de BMPs, Shh, FGF y Wnts. Así pues, la integración de todas las señales que reciben las células, tanto a nivel temporal como cuantitativo, es de vital importancia para la aparición del estriado. Se puede considerar que la subdivisión llamada telencéfalo intermedio es la parte del subpallio que no expresa Nkx2.1, que correspondería al conjunto de células que comienza a expresar Gsh2 y se interpone entre la MGE y el pallio.

En la LGE, podemos distinguir con relativa facilidad la VZ, SVZ y la zona en que se encuentran las células más diferenciadas o manto, no sólo por sus características anatómicas sino también por el patrón de expresión génica de las células en cada una de las zonas (figura14). En la zona ventricular, encontramos células positivas para Mash1, Gsh2 y Olig2 (Corbin et al., 2003;

Toresson et al., 2000b). En la SVZ aparece la expresión de *Islet1* y *Nolz1*, entre otros. Finalmente, al llegar al manto las futuras neuronas de proyección pueden distinguirse por la expresión de *Ikaros*, *Ebf1* o *Ctip2* (Agoston et al., 2007; Arlotta et al., 2008; Garel et al., 1999). Otros factores, en cambio, se expresan en las células estriatales desde su nacimiento en la zona ventricular hasta la vida adulta, como *Meis2* (Toresson et al., 2000a) (figura 14).

Son muchos los mecanismos que ayudan a acoplar la neurogénesis con el desarrollo de diferentes zonas del cerebro. Entre los más importantes está el control que ejercen los factores de transcripción homeodominio sobre los bHLH. Diferentes genes homeodominio controlan la expresión de distintos bHLHs neurogénicos que controlan la proliferación de forma parecida, pero determinan la diferenciación a fenotipos diferentes. Si tomamos como ejemplo los genes homeodominio *Pax6* y *Gsh2*, nos encontramos con que ambos permiten la expresión de genes bHLH proneurales, neurogenina 2 (*Ngn2*) y *Mash1* respectivamente (Schuurmans and Guillemot, 2002; Yun et al., 2001). Los dos se encargan de hacer que los precursores neurales dejen de ser multipotentes y se determinen a un fenotipo neuronal, por lo que se les ha dado el nombre de factores neurogénicos. Pero mientras que de las células que expresan *Ngn2* se derivan neuronas de proyección corticales glutamatérgicas, de las *Mash1* positivas surgen tanto neuronas de proyección estriatales como diferentes tipos de interneuronas GABAérgicas (Parras et al., 2002). Además, estos factores de transcripción contribuyen también a mantener la determinación regional de las células en que se expresan, ya que son capaces de inhibir la expresión de los genes correspondientes a otras zonas (por ejemplo, *Ngn2* inhibe la expresión de *Mash1* (Fode et al., 2000)). Por eso, resulta de especial interés el estudio de los genes que se expresan exclusivamente en la LGE, como *Islet1*, *Nolz1*, o *Ikaros* (Agoston et al., 2007; Chang et al., 2004; Garel et al., 1999; Stenman et al., 2003), en la MGE, como *Nkx2.1*, *Lhx6* o *Lhx7* (Ericson et al., 1995; Grigoriou et al., 1998) y en el córtex, como *Pax6*, *Ngn2*, *Emx1* y *Brn4* (Schmahl et al., 1993; Shimazaki et al., 1999; Simeone et al., 1992; Sommer et al., 1996)

Por otra parte, la identificación y el análisis de los factores solubles que controlen la expresión de genes específicos de la LGE, puede darnos nuevas claves para el entendimiento de la compleja integración de señales que

se da en la aparición del núcleo estriado. En este sentido, se han identificado elementos de respuesta a RA en los promotores génicos de muchos de los genes que se expresan en el primordio estriatal en diferentes momentos de su formación, como Meis2, Nolz1, RAR β o DARPP-32.

2.2.1.1 Ácido Retinoico

Desde muy temprano en el desarrollo el RA está presente en el telencéfalo intermedio. Por eso, además de su papel caudalizante, se cree que tiene un papel primordial en la especificación intermedia. En primer lugar, células mesenquimales de las placodas olfatorias, secretan RA cerca del telencéfalo ventral, y se ha visto que éste es capaz de inducir genes en el tejido neural (LaMantia et al., 1993). Además, en el ectodermo de la cabeza adyacente al telencéfalo intermedio se ha encontrado expresión de Raldh3, una enzima limitante para la síntesis de RA (Li et al., 2000). Esta misma enzima se expresa más tarde, a partir de E12, en la propia LGE (Li et al., 2000),(Molotkova et al., 2007). También se ha encontrado la presencia de Raldh1 en las aferentes mesoestriatales que llegan al estriado hacia E15 (McCaffery and Drager, 1994). Así pues, el RA se perfila como un factor crucial tanto en la aparición de la zona intermedia como en la posterior maduración de las células estriatales. De hecho, en el estriado se expresan una multitud de genes relacionados con la señalización del RA, como los receptores nucleares (Retinoic Acid Receptors) RAR α , RAR β , RXR β y RXR γ o las proteínas capaces de unir retinol CRBPs (Ruberte et al., 1993; Zetterstrom et al., 1994). Todavía más importante en la definición de la LGE por parte de esta molécula son las combinaciones específicas de receptores, los más importantes de los cuales son RAR β y RXR γ (Liao et al., 2005; Toresson et al., 1999). La presencia de este conjunto de moléculas desde edades embrionarias muy tempranas, significa que las células de la zona intermedia telencefálica son competentes a RA y, por tanto, éste debe tener un papel primordial en su desarrollo.

Pese a que los estudios de expresión son contundentes, todavía no está clara la forma en que el RA ejerce sus efectos en el primordio estriatal. Investigaciones recientes implican a esta molécula en el control de la proliferación de los precursores neurales. Se ha visto que el RA promueve la proliferación de las células neuroepiteliales durante estadios tempranos del

desarrollo telencefálico, además de ser necesario para la correcta expresión de FGF y Shh (Ribes et al., 2006). Además, el RA es capaz de inducir la expresión de Meis2, un factor de transcripción que marca el primordio estriatal desde su aparición hasta la edad adulta (Marklund et al., 2004). En este mismo trabajo se describe que elevadas concentraciones de FGF son capaces de bloquear la especificación intermedia llevada a cabo por el RA, ya que evita la aparición de Meis2 y de Islet1, otro marcador de la LGE. Así pues, el RA no sólo tiene un efecto por sí mismo sobre las células estriatales sino que también interacciona con el resto de señales que llegan a la región.

2.2.2 Oleadas de neurogénesis en la LGE

En el caso del primordio estriatal, existen dos picos de neurogénesis: uno temprano a E11.5 y otro tardío a E14.5. Pese a que los tipos de neuronas que las componen son los mismos, las proporciones de éstas y sus conexiones son diferentes. El periodo de generación de las neuronas que conforman los estriosomas, que llegarán a ser el 10 a 15 % del total de neuronas de proyección estriatales, es anterior a la aparición de las neuronas que formarán la matriz. Esto se demostró mediante el marcaje radioactivo de neuronas postmitóticas durante el desarrollo del estriado de rata, que reveló que mientras que las neuronas nacidas entre E12 y E15 formaban el compartimento estriosomal, las nacidas entre E17 y E20 generaban la matriz estriatal (van der Kooy and Fishell, 1987). Lo mismo ocurre en el ratón, en que la primera oleada, generada a E12-13 forma las neuronas estriosomales y la segunda, a E14-15, las de la matriz (Mason et al., 2005).

El análisis de un animal deficiente para el receptor RAR β apunta a que la señalización del RA a través del mismo puede ser indispensable para la proliferación una parte de las neuronas estriatales del compartimento estriosomal, las de generación tardía, que se sitúan en la parte rostral de la LGE (Liao et al., 2008). Este dato estaría apoyado también por la expresión restringida de Raldh3 en la parte rostral de la LGE a la edad embrionaria en que se generan estas neuronas (Molotkova et al., 2007).

El correcto funcionamiento de la vía de Notch es fundamental para la formación de las neuronas de ambas oleadas, pero no para la posterior diferenciación de las mismas (Mason et al., 2005). El análisis de animales KO

para diferentes genes de la vía de Notch ha permitido conocer más a fondo su papel en el mantenimiento y la diferenciación de los precursores neurales, así como su implicación en la neurogénesis. En el KO de Notch1, por ejemplo, se observa una afectación de las neuronas estriales, mientras que las de la matriz se desarrollan con normalidad. Esto se debe a que en el momento en que se generan las neuronas de la matriz, se expresa Notch3 en la LGE, que puede compensar la falta de Notch1. Estos resultados indican que a la edad en que todavía no hay compensación (antes de E13), las neuronas estriales dependen de la vía de Notch, por lo que están realizando divisiones asimétricas, mientras que las de la matriz son precursores que proliferan por división simétrica (Mason et al., 2005).

El caso de Gsh2 es muy similar, ya que en el animal deficiente para este gen se da una disrupción específica de los estriosomas y un desarrollo relativamente normal de la matriz. Esto lo convierte en un gen imprescindible para la correcta diferenciación de la primera oleada neurogénica del estriado. La recuperación de las neuronas de la matriz se debe a que Gsh1 es capaz de compensar la pérdida de Gsh2 en etapas algo posteriores (Yun et al., 2003). Al igual que en el caso de los dobles mutantes Notch1^{-/-} Notch3^{-/-}, los dobles mutantes Gsh1^{-/-} Gsh2^{-/-} tienen severamente afectados los dos compartimentos (Toresson and Campbell, 2001; Yun et al., 2003). Gsh2 es, además, necesario para la expresión temprana en la LGE de otros genes fundamentales en el desarrollo estriado como Mash1 y la familia Dlx (Toresson et al., 2000b).

Mash1 se expresa fundamentalmente en las zonas proliferativas del subpallio (Guillemot and Joyner, 1993; Lo et al., 1991; Porteus et al., 1994). Es un gen imprescindible para el correcto funcionamiento de la vía de Notch, ya que es necesario para que se expresen Delta1 y Delta3. En el animal deficiente de Mash1, la señalización de Notch y, por tanto, la expresión de los genes bHLH está muy disminuida (Casarosa et al., 1999). La falta de Delta se postula como la causa de que en estos animales haya una disminución de las neuronas de aparición temprana (postmitóticas hacia E10.5) (Casarosa et al., 1999). Sin embargo, en otro trabajo que analizó el mismo animal se describe que en realidad se da un incremento de la diferenciación neuronal desde E11 (Horton et al., 1999). Estos trabajos demuestran en su conjunto que Mash1 es fundamental para la correcta formación de las neuronas estriales del

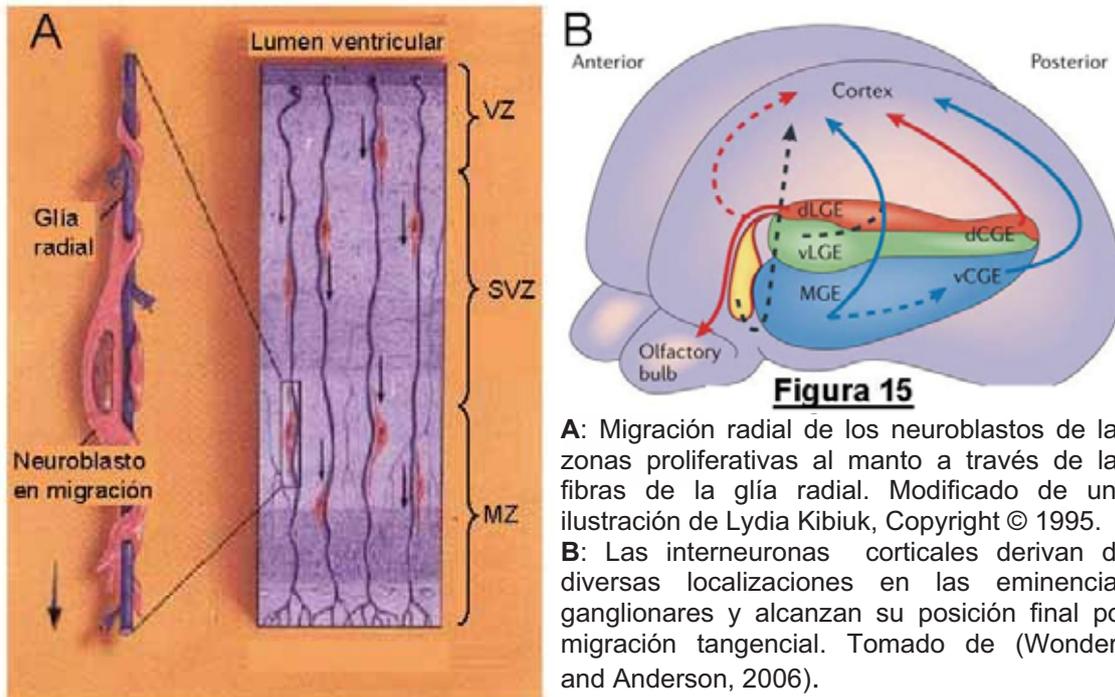
compartimento estriosomal. Las discrepancias en cuanto al mecanismo exacto que provoca las deficiencias observadas en los animales Mash1^{-/-}, se explica por la mezcla de efectos autónomos y no autónomos (debidos a la desregulación de la vía de Notch) que es capaz de desencadenar la falta de Mash1 (Yun et al., 2002). Por un lado, Mash1 promueve en la misma célula en que se expresa, el incremento de Delta, por lo que es necesario de forma autónoma para la diferenciación neuronal y en su ausencia ésta no se da correctamente, tal y como se describe en el primer trabajo (Casarosa et al., 1999). Pero al mismo tiempo, el incremento de Delta tiene un efecto no autónomo sobre las células vecinas, ya que activa en ellas la vía de Notch. En ausencia de Mash, por tanto, la activación de Notch no es lo suficientemente alta en las células vecinas y éstas acaban diferenciándose prematuramente, tal y como se describe en el segundo estudio (Horton et al., 1999).

Dlx1 y Dlx2 son dos genes homeobox necesarios para la aparición de neuronas estriatales tardías, y, por tanto, se considera que intervienen en la segunda oleada de neurogénesis en la LGE (Anderson et al., 1997b). Tienen funciones redundantes como controladores de la zona proliferativa secundaria de las eminencias, la SVZ (Anderson et al., 1997b). En los animales Dlx1/2^{-/-}, las neuronas de la matriz no son capaces de diferenciarse y se quedan proliferando en la SVZ. En cambio, si estas mismas células se disgregan y se siembran en cultivo, pueden diferenciarse con relativa normalidad (Anderson et al., 1997b). Esto indicaba que el bloqueo en la neurogénesis se debía a interacciones célula-célula. Además se ha demostrado que en el animal deficiente para estos genes, los precursores no son capaces de escapar a la vía de Notch, por lo que no pueden empezar la diferenciación (Yun et al., 2002).

Otro gen importante en el desarrollo de la matriz estriatal es Ebf1, ya que este compartimento se ve específicamente afectado en los animales Ebf1^{-/-} (Garel et al., 1999). Curiosamente, recientemente se ha descubierto que Ebf1 es fundamental para la expresión de sustancia P en las células de la matriz, por lo que cada vez avanzamos más en el conocimiento de los mecanismos que llevan a la especificación de los diferentes fenotipos neuronales estriatales (Lobo et al., 2008; Lobo et al., 2006).

2.2.3 Migración celular

La migración celular es un proceso complejo, gobernado por una multitud de mecanismos entre los que se encuentran tanto contactos entre células como la captación de gradientes de moléculas atrayentes o repulsivas. Las neuronas que se generan en la LGE y las que forman finalmente el núcleo estriado tienen dos formas básicas de llegar a su posición final: la migración radial y la tangencial (figura 15).



2.2.3.1 Migración radial

En el caso de las neuronas de proyección, el camino que deben seguir desde su lugar de origen en la VZ-SVZ de la LGE (Anderson et al., 1997a; Olsson et al., 1998) hasta la zona del manto donde finalmente madurarán, es relativamente corto y lo alcanzan por migración radial. La primera evidencia de que los progenitores indiferenciados se dirigen hacia la superficie pial gracias a los haces de fibras que conforma la glía radial, fue apuntada en 1891 por Ramón y Cajal. Casi un siglo después, se describió cómo a través de las “vías” que crean estas células especializadas, las futuras neuronas de proyección alcanzan su posición final en las capas de la corteza, empezando por las más cercanas a la luz ventricular (Rakic, 1971; Rakic, 1972). En el caso de la LGE, las células de la glía radial crean una red de fibras

perpendiculares a la superficie ventricular que llegan hasta las zonas donde se diferencian las neuronas de proyección (De Carlos et al., 1996; Halliday and Cepko, 1992; Kakita and Goldman, 1999). Así pues, se cree que las neuronas originadas en la VZ o SVZ, siguen estas fibras hasta su posición final en el manto. La glía radial está presente durante todo el proceso de neurogénesis hasta que acaba la migración neuronal, y al finalizar ésta, las células que quedan se diferencian terminalmente a astrocitos, algunos de los cuales formarán parte de la zona subventricular adulta (Merkle et al., 2004; Noctor et al., 2004).

2.2.3.2 Migración tangencial

Por su parte, la gran mayoría de las interneuronas deben viajar largas distancias hasta su destino final. La principal fuente telencefálica de interneuronas GABAérgicas es la MGE, aunque también se generan en la CGE y, en menor medida, en la LGE (revisado por (Marin et al., 2003; Nakajima, 2007; Wonders and Anderson, 2006)). Las neuronas provenientes de la MGE que alcanzan el núcleo estriado mediante migración tangencial se diferencian una vez en su lugar de destino a interneuronas colinérgicas, positivas para calretinina o GABAérgicas positivas para parvalbúmina (Marin et al., 2000). Las interneuronas estriatales se distinguen de las corticales en que no apagan la expresión de Nkx2.1, gen que marca las células provenientes de la MGE (Marin et al., 2000).

La capacidad de migrar tangencialmente está regulada por factores de transcripción ventrales que son imprescindibles para la dispersión celular, como Mash1 y Lhx6 (Alifragis et al., 2004; Liodis et al., 2007; Parras et al., 2002). Uno de los papeles más importantes en esta migración, lo juegan las señales extrínsecas en forma de factores quimioatrayentes (Flames and Marin, 2005; Pozas and Ibanez, 2005; Stumm et al., 2003) y quimiorrepulsivos (Marin et al., 2001; Zhu et al., 1999) que difunden desde la corteza y las eminencias ganglionares, respectivamente.

En la propia LGE, encontramos dos dominios diferenciados por la expresión de dos factores de transcripción, que marcan el destino final de las células que los expresan. Hacia E12.5 en la SVZ de la LGE, se distinguen dos tipos de precursores: positivos para Dlx e Islet1 y positivos para Dlx y Er81. Los

primeros se encuentran en la mayor parte de la LGE, y marcan las células que migrarán radialmente y se quedarán en el estriado. Las que expresan Er81, en cambio, están localizadas específicamente en la parte más dorsal y anterior de la LGE, en la zona llamada dLGE (por dorsal LGE), y darán lugar a interneuronas periglomerulares y granulares del bulbo olfativo, por lo que su migración es tangencial (Stenman et al., 2003).

La zona que funciona como barrera entre el estriado y la corteza, se ha descrito en los últimos años como la fuente de las neuronas que migran hacia las partes límbicas del telencéfalo basal, como la amígdala. Así, en la conjunción entre palio y subpalio, el conjunto de células que forman una mezcla de expresión de marcadores dorsales y ventrales, como Pax6 y Gsh2, forma una ruta migratoria, el LCS (del inglés Lateral Cortical Stream) que se dirige hacia zonas internas del telencéfalo basal (Carney et al., 2006).

2.3 Maduración estriatal

Una vez en la zona de diferenciación, las neuronas no dan por terminado su proceso de desarrollo, ni mucho menos. La adquisición de todas sus características y el establecimiento de conexiones aferentes y eferentes no acaba hasta después del nacimiento. En el caso de la glía, esta maduración y especificación final es todavía más tardía, dándose en su mayor parte en el período postnatal. Entre los factores que ayudan a la maduración de las células estriatales encontramos, a parte de numerosos genes, factores solubles como el BDNF y, de nuevo, el RA (Bosch et al., 2004; Ivkovic et al., 1997; Toresson et al., 1999).

2.3.1 Establecimiento de los compartimentos estriatales

La aparición de los compartimentos estriatales es un proceso que comienza desde la diferenciación de las primeras neuronas en el primordio estriatal. Las neuronas de los estriosomas se encuentran dispersas en el manto de la LGE hasta que, coincidiendo con la llegada de las neuronas de la matriz, se agregan formando grupos más o menos numerosos (van der Kooy and Fishell, 1987). La llegada continua de nuevas neuronas de la matriz va alejando dichas agrupaciones, que finalmente se convierten en estructuras estables y definidas (Krushel et al., 1989; Song and Harlan, 1994a). Hacia el día

embrionario 16, aparece Sustancia P en las neuronas estriales y encefalina en las de la matriz (Correa et al., 1981; Cuello and Paxinos, 1978; Gerfen and Young, III, 1988; Song and Harlan, 1994a). La aparición de esta diferenciación neuroquímica de los compartimentos se produce mediante gradientes opuestos, con la sustancia P avanzando desde partes rostrales y la encefalina desde la región más caudal. Pese a esto, no debemos olvidar que más tarde el patrón se homogeniza tanto a nivel de posición dentro del estriado (Harlan et al., 1989; Harlan et al., 1987) como de compartimentos (Gerfen and Young, III, 1988; Penny et al., 1986). La proteína DARPP-32, que en el animal adulto se encuentra en la mayoría de neuronas estriales, puede usarse también como marcador estriado durante el desarrollo, ya que las neuronas de la matriz no empiezan a expresarla hasta edades postnatales (Ouimet et al., 1992).

La identificación de genes que se expresan selectivamente en uno de los compartimentos puede ayudarnos a avanzar en nuestra comprensión de las diferencias morfológicas y funcionales entre ellos. Dicha identificación, en el caso del compartimento estriado, se basa en la aparición temprana de marcadores, como *Foxp2* (Takahashi et al., 2003), o en la localización estriado en el adulto, como *Ctip2* (Arlotta et al., 2008). En el caso de la matriz, *Ebf1* es el factor de transcripción implicado en su formación más importante que conocemos hasta el momento (Garel et al., 1999), y se ha descrito recientemente que este gen está implicado en la formación de neuronas estriado, es decir, que expresan sustancia P (Lobo et al., 2006). Otros candidatos a ser genes específicos de la matriz son los *Dlx*, ya que en ratones mutantes para *Dlx1/2*, ésta se encuentra gravemente perturbada mientras que los estriosomas se desarrollan con normalidad (Anderson et al., 1997b). Aunque es evidente que son indispensables para las neuronas de la matriz, lo cierto es que estos genes están implicados en la correcta migración de todas las neuronas del telencéfalo basal, incluidas las interneuronas originadas en la MGE o las interneuronas de la dLGE que poblarán el bulbo olfativo (Cobos et al., 2007; Le et al., 2007; Long et al., 2007). Por otra parte, un gen de la familia de *Ikaros*, una proteína que se expresa en el manto de la LGE (Kohtz et al., 1998), se ha visto que es capaz de unirse al promotor de encefalina y activar su transcripción (Dobi et al., 1997), por lo que

podría ser importante en la formación de al menos una parte de la matriz estriatal (Agoston et al., 2007).

2.3.2 Establecimiento de conexiones

Las primeras fibras que llegan al primordio estriatal son las aferentes dopaminérgicas procedentes de la sustancia negra. La presencia de terminales positivas para tirosina hidroxilasa (TH) es evidente desde E14, y se ha asociado su llegada a la maduración de las neuronas estriosomales, ya que las fibras se agrupan en los islotes que forman estas células (Gerfen et al., 1987; Moon and Herkenham, 1984; Voorn et al., 1988). A su vez, se ha observado que en el mutante deficiente para CTIP2, que no tiene estriosomas, las terminales dopaminérgicas de la sustancia negra están altamente desorganizadas y se difunden por todo el estriado (Arlotta et al., 2008). Las aferencias glutamatérgicas procedentes de la corteza se establecen entre los días postnatales 2 y 7, pero no se considera esta vía totalmente formada hasta el primer mes de vida (Sharpe and Tepper, 1998).

Los dos compartimentos estriatales envían sus axones hacia la sustancia negra, pero mientras que las estriosomales lo hacen desde E17, las de la matriz empiezan a hacerlo durante la primera semana postnatal. Este hecho favorece que las neuronas estriosomales establezcan mejores conexiones, lo que les permite acceder mejor a los factores tróficos, como las neurotrofinas BDNF o NT3, y sobrevivir mejor al periodo de muerte neuronal de la primera semana postnatal (Fishell and van der Kooy, 1987; Fishell and van der Kooy, 1989; Fishell and van der Kooy, 1991).

Además, el estriado se encarga también de dar información posicional a haces axonales que pasan por su cápsula interna. Por ejemplo, se ha visto que en mutantes deficientes en *Dlx1/2* o *Ebf1*, la ruta de los axones talamocorticales se encuentra claramente alterada al pasar por la zona cercana al estriado sin que ni en el tálamo ni en la corteza se observen deficiencias de regionalización (Garel et al., 2002).

2.4 Función de los ganglios basales

Los esfuerzos por comprender el funcionamiento de estos núcleos se deben fundamentalmente a que están implicados en el desarrollo de

enfermedades neurodegenerativas que cursan con graves síntomas motores y cognitivos como la enfermedad de Parkinson o la corea de Huntington, entre otras. En el Parkinson, el principal problema es la desregulación de la actividad estriatal debida a la muerte de las neuronas que proyectan al estriado desde la sustancia negra. Por su parte, el estudio de la corea de Huntington resulta especialmente interesante para entender el funcionamiento estriatal, ya que se produce una muerte selectiva de las neuronas de proyección de este núcleo.

2.4.1 Enfermedad de Huntington

La corea de Huntington es una enfermedad neurodegenerativa hereditaria que afecta a entre 5 y 10 personas por cada 100.000 en todo el mundo. La mutación que la causa, monogénica autosómica dominante, fue identificada en 1.993 como una expansión inestable de tripletes CAG en el exón 1 del gen de la huntingtina. Esto se traduce en una excesiva cantidad de glutaminas en el extremo N-terminal de esta proteína. En la huntingtina normal, el número de repeticiones del triplete varía entre 6 y 35. Con más de 40 repeticiones se desarrolla la enfermedad, mientras que si hay entre 36 y 39 se manifiesta de forma más leve, dependiendo de factores genéticos y ambientales (McMurray, 2001). Cuanto mayor sea el número de glutaminas, más severos son los síntomas y antes se manifiesta la enfermedad, que en la mayoría de los casos aparece entre los 35 y los 55 años y evoluciona durante 15 a 20 años provocando finalmente la muerte del paciente (Persichetti et al., 1995). La corea de Huntington, como indica su nombre, produce movimientos coreicos involuntarios y además dificulta los movimientos voluntarios. Otra de sus características es la aparición de déficits cognitivos y alteraciones psiquiátricas como agresividad y depresión.

Los síntomas están causados a nivel neuropatológico por una pérdida selectiva de las neuronas de proyección del estriado (Ferrante et al., 1987; Ferrante et al., 1985; Vonsattel et al., 1985). Las dos subpoblaciones de neuronas de proyección no están afectadas por igual; las que proyectan al globus pallidus externo son las primeras en degenerar, y posteriormente lo hacen las que proyectan al globus pallidus interno y a la sustancia negra pars reticulata (Albin et al., 1992; Reiner et al., 1988; Richfield et al., 1995). Más tarde se observa también una disminución de las neuronas piramidales de las

capas II-III, V y VI del córtex motor i de asociación (Leegwater-Kim and Cha, 2004). La degeneración estriatal sería la causante de la descoordinación motora mientras que la muerte de las neuronas corticales se ha relacionado más con los síntomas cognitivos y psiquiátricos. Un hecho destacable a nivel histopatológico es la presencia de agregados de huntingtina tanto intracitoplasmáticos como intranucleares (Becher et al., 1998; Myers et al., 1988; Vonsattel et al., 1985).

La función normal de la huntingtina todavía no es del todo conocida. Se encuentra en todas las células del cuerpo, tiene un papel fundamental durante el desarrollo y es capaz de interaccionar con un amplio espectro de otras proteínas en el citosol (revisado en (Gusella and MacDonald, 1998)). Se ha demostrado que tiene influencia sobre procesos celulares como el transporte vesicular, el anclaje de proteínas al citoesqueleto, la endocitosis mediada por clatrina, el transporte neuronal o la señalización postsináptica (del Toro et al., 2006; Gauthier et al., 2004). Además, la huntingtina puede estar en el núcleo, donde puede influir sobre la expresión de determinados genes (Petersen et al., 1999; Reddy et al., 1999). Por último, tiene un papel importante en la supervivencia celular y la inhibición de algunas vías que conducen a la apoptosis (Gervais et al., 2002; Rigamonti et al., 2000). Teniendo en cuenta todas estas funciones resulta complicado explicar por qué se ven casi exclusivamente afectadas las neuronas de proyección estriatales. Hay diversas teorías que intentan explicar este hecho, pero lo más probable es que se trate de una compleja interacción entre diferentes factores (Alberch et al., 2004; Cha, 2000). Entre los más importantes se encuentran la formación de agregados de huntingtina, el incremento de sensibilidad frente a la excitotoxicidad, la disfunción mitocondrial y la falta de soporte trófico (Beal et al., 1989; Beal, 1995; Becher et al., 1998; Canals et al., 2004; Ferrante et al., 1993; Ferrer et al., 2000; Zuccato et al., 2001).

Pese a ser una enfermedad monogénica y disponer de diversas teorías sobre su causa, no hay ningún tratamiento que sea efectivo ni para parar la evolución de la enfermedad ni para mejorar los síntomas o la calidad de vida de los pacientes. Se han intentado diversas terapias basadas en la administración de antagonistas de los receptores NMDA, pero los efectos secundarios de este tipo de fármacos ha obligado a abandonar estas terapias

(Gogas, 2006; Kemp and McKernan, 2002). También se ha intentado mejorar la función mitocondrial administrando coenzima Q10, un componente de la cadena respiratoria, sin obtener mejores resultados (Smith et al., 2006). Por otro lado, mediante técnicas de ingeniería genética se está intentando desarrollar un RNA de interferencia específico para bloquear la transcripción del gen mutante de la huntingtina sin alterar la del gen normal (DiFiglia et al., 2007). Estudios realizados en un ratón mutante condicional hacen que esta vía sea de especial importancia, ya que han demostrado que la enfermedad puede revertir en gran medida cuando desaparece la huntingtina mutada de la célula (Diaz-Hernandez et al., 2005).

Por último, al igual que en otras enfermedades neurodegenerativas, se están realizando muchos esfuerzos por obtener una terapia celular segura para la corea de Huntington. La mayor parte de los estudios se basan en la obtención de una fuente apropiada de células para la liberación en el estriado de factores tróficos para proteger las MSNs. Se han probado varios tipos de células para el trasplante, como líneas celulares productoras de factores tróficos, células fetales, y células madre más o menos diferenciadas. El estudio de como se diferencian las células madre hacia un fenotipo de MSN, además, nos puede dar muchas claves de la enfermedad y ayudarnos a entender el por qué de su degeneración selectiva.

3. Células madre

Los estudios con células madre se han convertido en los últimos años en el centro de atención de la sociedad en general. El motivo de esta atención son las esperanzas que se han depositado en su uso para curar todo tipo de enfermedades mediante la sustitución de tejidos e incluso órganos enfermos por unos sanos cultivados en el laboratorio. Esta idea, que puede parecer ridícula o fantasiosa para cualquier persona que conozca mínimamente el mundo de la biología celular, se ha promovido extensamente en los medios de comunicación por lo mediático de su mensaje. Además, el uso de células madre provenientes de embriones ha suscitado un gran debate ético que ha derivado en una estricta legislación que muchas veces limita excesivamente su uso por parte de los investigadores. Pese a todas estas exageraciones, es cierto que las células madre pueden ayudarnos a elaborar nuevas terapias para enfermedades que hasta ahora no tienen ningún tratamiento, aunque con toda seguridad el tiempo que se invertirá en desarrollarlas es mucho mayor del esperado por la sociedad.

La principal característica que hace atractivas a las células madre es la posibilidad de cultivarlas indefinidamente *in vitro*, pero no debemos olvidar que su estudio *in situ* es vital para comprender plenamente sus funciones y características. Así pues, la comunicación entre el campo de las células madre y el desarrollo debe ser continua, al estar íntimamente relacionados. En este apartado se intentará explicar de forma sencilla el extenso universo de las células madre, brindando especial interés a la especificación neural y su aplicación en enfermedades del sistema nervioso.

3.1 Definición

Resulta complicado establecer una definición que pueda englobar todos los tipos de células madre que existen en un organismo desde el cigoto hasta el adulto, ya que son muy diversas y sus características pueden cambiar según las condiciones en que se encuentren (por ejemplo *in vivo* e *in vitro*). Como norma general, las células madre o células troncales se diferencian del resto de células por sus dos principales propiedades: su capacidad de auto-

replicarse indefinidamente y su capacidad de dar lugar a múltiples tipos celulares de un organismo (figura 16) (Weissman, 2000).

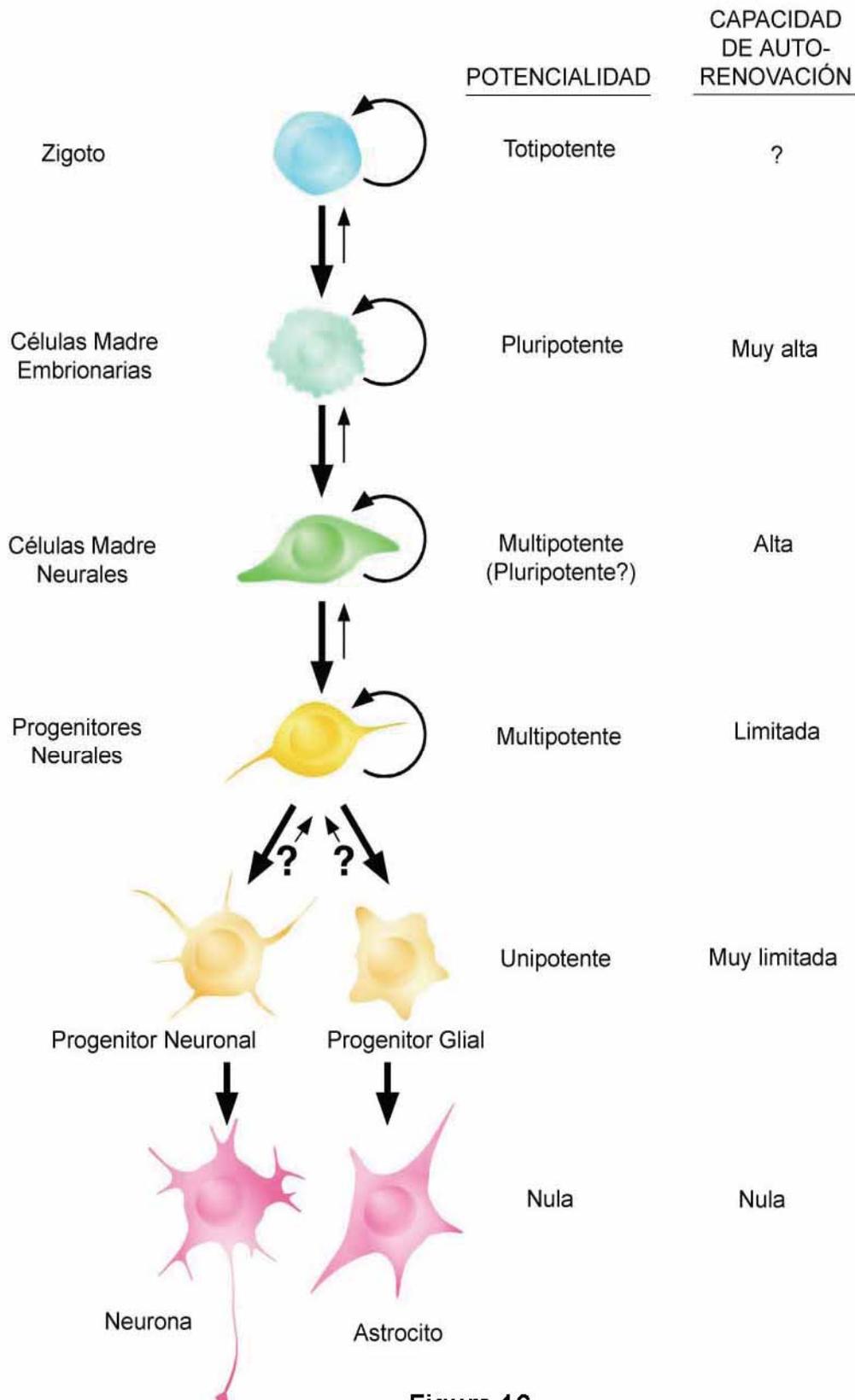


Figura 16

Diferentes tipos de células madre poseen distintas características en cuanto a autorenovación y capacidad de diferenciarse a distintos tipos celulares. Se muestra el caso del linaje neural. Modificado de Gage 2000.

3.2 Tipos de células madre según su origen

Existen muchas formas de clasificar las células madre, según la zona de la que se derivan, la edad del organismo del que se obtienen, su capacidad de diferenciación, etc. Como norma general podemos decir que la capacidad de diferenciarse en distintos tipos celulares es mayor cuanto más temprano es el estadio del desarrollo del que provienen. Aquellas que pueden dar lugar a cualquier célula del organismo y además pueden crear el tejido extraembrionario necesario para la implantación del embrión en el útero, se denominan totipotentes. Éstas sólo están presentes durante un breve período de tiempo durante el desarrollo, desde la formación del cigoto hasta el estado de mórula. Una vez se produce la cavitación del embrión, en el estado de blástula, encontramos células pluripotentes, lo que significa que pueden diferenciarse a todos los tejidos del organismo pero no son capaces de formar los extraembrionarios. A medida que avanzamos en el desarrollo, las células madre van restringiendo sus capacidades para dar lugar sólo a algunos tipos celulares, normalmente de la misma capa embrionaria de la que forman parte.

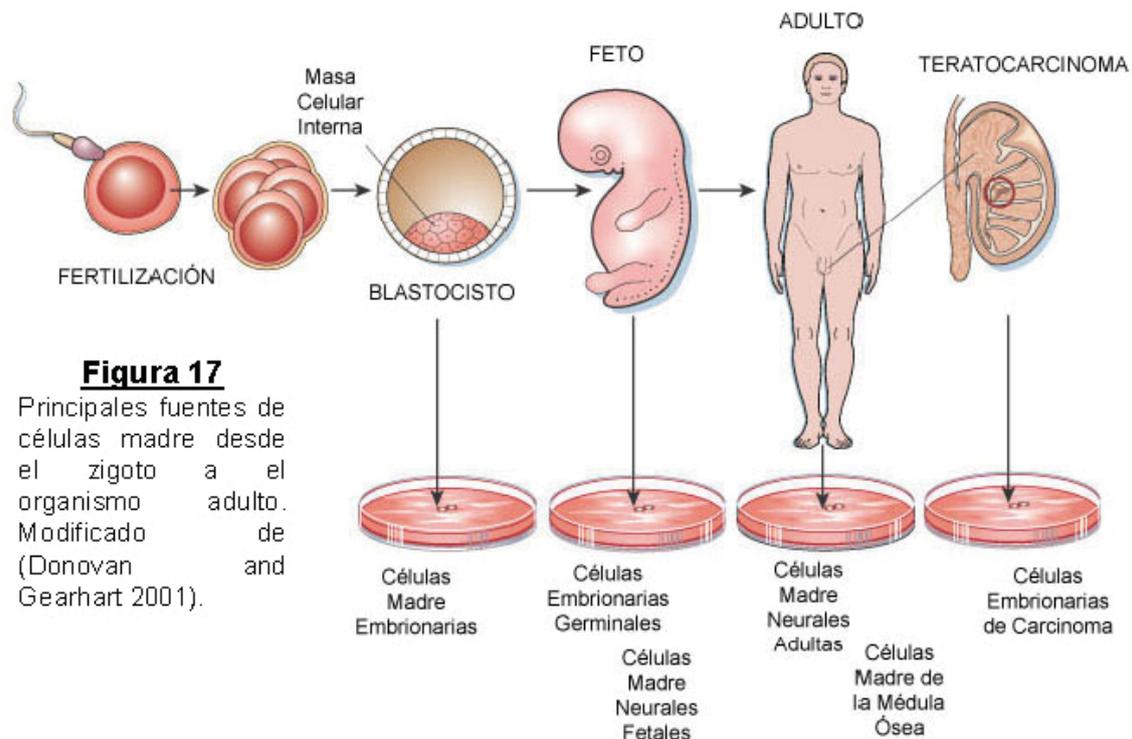


Figura 17

Principales fuentes de células madre desde el cigoto a el organismo adulto. Modificado de (Donovan and Gearhart 2001).

Curiosamente, la primera restricción en su potencial suele ser la incapacidad de dar lugar a células del linaje reproductor, es decir, los gametos que formarán un nuevo organismo. Estas células madre restringidas en su potencial, que están presentes durante toda la vida del individuo, son las llamadas células madre multipotentes. Conocemos gran cantidad de ellas, desde las

recientemente descubiertas, como las neurales, que dan lugar únicamente a neuronas, astrocitos u oligodendrocitos, a las que se conocen con detalle y hace ya tiempo que se utilizan en terapias, como las hematopoyéticas, que se diferencian a todos los tipos de células sanguíneas. Por último, encontramos las células unipotentes, que sólo dan lugar a un tipo celular, pero tienen capacidad de autorenovación, por lo que no encajan del todo en la definición de célula madre. A continuación se dan unas breves pinceladas sobre los tipos y características de las células madre según la fuente de la que son extraídas (figura 17).

3.2.1 Células madre embrionarias

Las células madre embrionarias (ESCs, 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 preimplantacional en la etapa de desarrollo correspondiente al blastocisto. Estas células tienen una capacidad prácticamente ilimitada de autorenovación y proliferación, y pueden diferenciarse *in vitro* a todos los tipos celulares de un organismo (Doetschman et al., 1985; Evans and Kaufman, 1981; Wobus et al., 1984), incluidas las células germinales (Toyooka et al., 2003). Se identifican por la expresión de una serie de genes como el antígeno de superficie SSEA-1 (Solter and Knowles, 1978), el factor de transcripción homeodominio Oct3/4 (Pesce et al., 1999; Scholer et al., 1989), o las enzimas telomerasa (Prelle et al., 1999) y fosfatasa alcalina (en el caso de las humanas (Wobus et al., 1984)).

Las primeras líneas de ESCs de ratón fueron establecidas en 1981 (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981). Desde entonces, los estudios con células madre han suscitado un gran interés como posible fuente de precursores o células diferenciadas para el desarrollo de terapias celulares, especialmente a partir del aislamiento de la primera línea de ESCs humanas en 1998 (Thomson et al., 1998).

La habilidad de las células madre embrionarias para dividirse simétricamente en cultivo y dar lugar a dos células hijas que son copias exactas de la célula madre de la que derivan, permite a las ESCs ser expandidas en cultivo antes de inducir su diferenciación. Se conocen pocos factores que regulen la capacidad de autorenovación de estas células madre

pluripotentes, ya que son aisladas y mantenidas en un estado indiferenciado sobre una capa de células alimentadoras (“feeder cells”) de fibroblastos inactivados mitóticamente. La identificación de los factores responsables de este mantenimiento de la pluripotencia es una de las vías de investigación más importantes en este campo. La búsqueda resulta especialmente complicada, ya que el principal factor descrito para las células de ratón, el LIF, (Williams et al., 1988), no funciona para las células humanas. Así pues, no se pueden extrapolar los resultados obtenidos en diferentes especies y para avanzar en el conocimiento de las ESCs humanas queda todavía mucho trabajo por hacer. Además, para hacer posible su uso en terapias, es necesario dejar de utilizar células o sustancias provenientes de animales para su mantenimiento *in vitro*, como la BSA, o los propios feeders, y superar el incremento de muerte celular y diferenciación incontrolada que supone su mantenimiento (Martin-Ibanez et al., 2008; Unger et al., 2008).

Uno de los protocolos de diferenciación más utilizados consiste en el cultivo de estas células en forma de agregados en suspensión, los llamados cuerpos embrioides, en que conviven células de las tres capas germinales: endodermo, ectodermo y mesodermo. Añadiendo diversos factores, ha sido posible el enriquecimiento del cultivo hacia precursores neurales (Kim et al., 2002), cardíacos (Maltsev et al., 1993) o hepáticos (Jones et al., 2002). Sin embargo, para obtener poblaciones puras de células diferenciadas es necesaria la selección posterior del fenotipo requerido. Además, es de vital importancia la eliminación de todas las células pluripotentes presentes en el cultivo, ya que pueden llevar a la formación de teratomas, principal causa de que estemos todavía lejos de poder realizar trasplantes de estas células con seguridad.

3.2.1.1 Obtención de ESCs a partir de células somáticas

En 1996, la oveja Dolly se convirtió en el primer animal producido mediante transferencia nuclear (Campbell et al., 1996), lo que supone la clonación de organismos adultos. Esta técnica consiste en introducir el núcleo de una célula somática de un organismo adulto (normalmente una célula epitelial), en un óvulo fertilizado al que previamente se le ha extraído el núcleo. Desde entonces esta misma técnica se ha aplicado con relativo éxito a otros

animales (Chesne et al., 2002; Lee et al., 2005; Meng et al., 1997; Polejaeva et al., 2000; Shin et al., 2002), muchas veces con la esperanza de usar los animales transgénicos para usos médicos, de incremento de la producción agrícola o incluso para el lucrativo negocio del clonaje de mascotas muertas.

En los últimos años están apareciendo numerosos trabajos sobre las llamadas iPSCs (Induced Pluripotent Stem Cells). Se trata de fibroblastos transducidos con cócteles de, normalmente, cuatro genes entre los que se encuentran Oct4, Sox2, Klf4 y Myc (Aoi et al., 2008; Kim et al., 2008; Park et al., 2008; Qi and Pei, 2007; Takahashi and Yamanaka, 2006). Estas células, se comportan de forma parecida a las células madre embrionarias, ya que pueden diferenciarse prácticamente a cualquier tipo celular. Hay varios impedimentos que hacen difícil el uso de estas células para su uso en terapias. El más importante está relacionado con la propia naturaleza oncogénica de los factores que se utilizan para promover la des-diferenciación. Además, dado que los genes se introducen con vectores virales, hay que tener en cuenta que cabe la posibilidad de que los mismos se inserten en el genoma provocando mutaciones que pueden resultar muy perjudiciales para las células.

El uso de estas células inducidas, así como la transferencia nuclear puede tener problemas añadidos, como el control de las modificaciones epigenéticas, que consisten en la modificación de la accesibilidad de la cromatina y, por tanto el silenciamiento o activación de la expresión génica. La incorrecta reprogramación epigenética se postula como la principal causa de que los experimentos de transferencia nuclear somática, como el que se llevó a cabo con la oveja Dolly, no tuvieran el éxito esperado (Niemann et al., 2008).

3.2.2 Células madre fetales

Es posible aislar células que cumplan las dos condiciones básicas que las definen como células madre de prácticamente todos los tejidos de fetos en desarrollo. Normalmente son consideradas como multipotentes: pueden dar lugar solamente a los tipos celulares presentes en el propio tejido al que pertenecen. Estas células a su vez generan los llamados precursores, que son mucho más restringidos (revisado en (Temple, 2001)).

Aunque son fáciles de obtener, muchas veces pierden sus capacidades a medida que avanzan los pases en cultivo, por lo que no pueden

mantenerse durante mucho tiempo. Para solventar este problema, se han establecido multitud de líneas celulares a partir de estos precursores mediante la inmortalización. Este procedimiento se basa en incorporar a las células genes que les den la capacidad de seguir proliferando indefinidamente *in vitro*. Incluso se puede conseguir que dejen de expresar dicho gen en respuesta a ciertos estímulos mediante la utilización de promotores regulados por temperatura o sustancias químicas. De esta manera se han obtenido líneas de precursores de todo tipo de tejidos, como neurales (línea C17.2 de cerebelo (Ryder et al., 1990; Snyder et al., 1992), línea SHY5Y de tumor humano (Biedler et al., 1978)) o líneas de células hepáticas (como las 293GPG o las HELA (Ory et al., 1996)). Estas líneas se han utilizado para estudios de toxicidad, de desarrollo, etc. Pero el hecho de que se trate de clones amplificados a partir de una sola célula inmortalizada, hace que se deba ir con cuidado al extraer conclusiones generales de los resultados obtenidos.

Los progenitores del tejido neural son sencillos de obtener en animales, y se mantienen indiferenciados *in vitro* en forma de neuroesferas (agregados celulares) durante muchos pases. En el caso de las humanas, su obtención resulta mucho más complicada por la escasez de tejido embrionario y por la imposibilidad de obtenerlo siempre de la misma edad. Aun así, se han derivado gran variedad de progenitores y NSCs humanas de distintas partes del sistema nervioso y a distintas edades embrionarias, demostrándose así que es posible un cierto mantenimiento *in vitro* y su diferenciación a los tres tipos neurales (Buc-Caron, 1995; Carpenter et al., 1999; Chalmers-Redman et al., 1997; Flax et al., 1998; Odeberg et al., 2005; Piao et al., 2006; Quinn et al., 1999; Schwartz et al., 2003).

Sin embargo, parece ser que la mayoría de estas células se comportan de forma parecida a las células somáticas, ya que tras un número limitado de divisiones, entran en senescencia y mueren. Esto ha potenciado el estudio de nuevos medios de cultivo e inmortalización de los precursores para obtener un pool amplificable de precursores neurales humanos que pueda ser usado para terapias de trasplante celular (Conti and Cattaneo, 2008; De et al., 2007; Roy et al., 2007).

3.2.3 Células madre adultas

Se ha demostrado la existencia de células madre adultas en casi todos los tejidos, aunque su proporción dentro de los mismos suele ser muy pequeña. Estas células son componentes esenciales de la homeostasis tisular ya que se encargan del reemplazo de células senescentes y de la restauración de la pérdida de funcionalidad por enfermedades o traumas. La capacidad de las células madre para cumplir estas funciones depende de forma extraordinaria del tipo de tejido al que pertenecen. Cada tejido tiene su tiempo de renovación, y este tiempo está relacionado con la capacidad de sus células madre para producir nuevas células. Este hecho fue puesto en evidencia recientemente por el grupo de Frisén y colaboradores mediante un original experimento basado en la incorporación de carbono 14 derivado de la pruebas atómicas llevadas a cabo durante la guerra fría (Spalding et al., 2005). Así han demostrado, por ejemplo, que las células epiteliales que recubren la superficie del intestino tardan en ser sustituidas por completo tan sólo unos días, mientras que parece que las células de la corteza cerebral no se renuevan en absoluto (Bhardwaj et al., 2006).

La capacidad de proliferación *in vitro* y el potencial de diferenciación de las células madre adultas es mucho menor que el de las células madre embrionarias o fetales, lo que hace muy complicado su aislamiento y amplificación (Temple, 2001). Las células madre adultas son multipotentes, y capaces de diferenciarse hacia fenotipos específicos del tejido al que pertenecen. Sin embargo, trabajos recientes sugieren que no están restringidas a un solo linaje, sino que bajo determinadas circunstancias son capaces de formar tipos celulares pertenecientes a otros tejidos, fenómeno conocido como transdiferenciación. Esto ha sido observado extensamente en el caso de las células madre hematopoyéticas, las cuales han sido diferenciadas a hepatocitos (Lagasse et al., 2000) o neuronas (Brazelton et al., 2000; Mezey et al., 2000). También las células madre neurales adultas son capaces de diferenciarse a células hematopoyéticas (Bjornson et al., 1999). Incluso se ha observado que células madre mesenquimales tienen capacidad de diferenciarse a células de las tres capas germinales (Muguruma et al., 2003; Reyes et al., 2001), por lo que su potencialidad es similar a la de las células madre embrionarias, aunque la frecuencia de transdiferenciación en estos

cultivos es inferior al 0,02%. Esto abre la puerta a que estas células puedan ser utilizadas como fuente de tejidos para uso clínico y el desarrollo de terapias autólogas, eliminando de esta manera el riesgo de rechazo al trasplante y los problemas éticos del uso de las células provenientes de embriones. Pero en ese caso, seguiremos encontrándonos con el problema de controlar perfectamente el proceso de diferenciación para eliminar la proliferación de los precursores.

Una característica muy importante de las células madre adultas *in vivo* es que se localizan en unos emplazamientos muy restringidos dentro del tejido al que pertenecen, denominados nichos. Los nichos están formados por células especializadas dispuestas alrededor de las células madre y en ellos se generan señales ambientales que mantienen y regulan el comportamiento de las células madre.

En mamíferos se han descrito y caracterizado nichos en la médula ósea, la piel y el folículo piloso, el intestino, los testículos y el sistema nervioso. Todos ellos presentan una serie de características comunes que se pueden resumir en tres. En primer lugar, presentan una localización específica dentro del tejido e intervienen tanto en el mantenimiento de las células madre como en su anclaje físico. Por ejemplo, osteoblastos positivos para N-caderina forman el nicho de las células madre hematopoyéticas en la médula ósea (Calvi et al., 2003) (Zhang et al., 2003), mientras que células endoteliales son las que forman el nicho de las células madre neurales (Doetsch, 2003; Ramirez-Castillejo et al., 2006).

En segundo lugar, en el nicho se generan factores extrínsecos que controlan la auto-renovación y la diferenciación 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: Shh, Wnts, BMPs, FGFs, Notch, SCF, Ang-1, LIF, PDEGF, etc.. (Duncan et al., 2005; Ivanova et al., 2002; Ramalho-Santos et al., 2002; Ramirez-Castillejo et al., 2006; Reya et al., 2003).

Por último, en los nichos las células madre se dividen de forma asimétrica generando una célula hija con propiedades de célula madre que se queda en el nicho (auto-renovación) y otra célula hija que lo abandona para proliferar y diferenciarse dando lugar a células maduras funcionales (Smith, 2005; Urbanek et al., 2006).

Así pues, las células madre adultas no tienen una gran capacidad de proliferación, ya que esta capacidad suele estar en las llamadas células transitorias de rápida amplificación. Esta relativa quiescencia hace que sean extremadamente difíciles de localizar. Recientemente se ha descrito un nuevo método de identificación de los nichos de las células madre adultas basado en la mayor longitud de sus telómeros (Flores et al., 2008).

3.2.4 Otros tipos de célula madre

La investigación con células madre empezó en los años setenta, con la derivación de células de tumores gonadales denominados teratocarcinomas (Stevens, 1967) y su establecimiento como líneas celulares que fueron llamadas células madre embrionarias de carcinoma. Estas células pueden mantenerse *in vitro* en un estado indiferenciado cultivándolas sobre una capa de células alimentadoras (Martin and Evans, 1974), y presentan la capacidad de diferenciarse a células de las tres capas embrionarias, pero no pueden generar células germinales ni extraembrionarias. (Martin and Evans, 1974) (Stevens, 1967) (KLEINSMITH and Pierce, 1964). Sin embargo, pronto se vio que estas células muestran aberraciones cromosómicas (Papaioannou et al., 1975), y pierden la capacidad de diferenciarse *in vitro* a menos que se añadan multitud de factores externos (Nicolas et al., 1975) (McBurney et al., 1982). Estas características, junto con su origen tumoral animaron a los investigadores del momento a buscar otras fuentes de células pluripotentes.

Las células madre embrionarias germinales se aíslan de los primordios de las gónadas de un embrión post-implantacional (de 5-10 semanas de vida en humanos). Son pluripotentes, por lo que pueden generar todos los tipos de células, somáticas y germinales, pero no tejido extraembrionario. Presentan, al igual que las células madre embrionarias, una gran capacidad de proliferación y de diferenciación, aunque no comparten todas las propiedades de éstas (Shamblott et al., 1998). Recientemente se ha demostrado que es posible extraer células madre pluripotentes parecidas a las células embrionarias germinales, incluso de las gónadas de ratones recién nacidos (Kanatsu-Shinohara et al., 2004).

Las células madre obtenidas de la sangre de cordón umbilical se postulan como una gran herramienta, especialmente para la cura de

enfermedades del sistema hematopoyético. Entre sus muchas ventajas, estas células presentan un grado de inmunogenicidad mucho menor, ya que el sistema inmune en el cordón umbilical es más “naive”. Además tienen una mayor capacidad de proliferación que las obtenidas de donaciones de médula ósea, por lo que con la misma cantidad es posible realizar un número más alto de trasplantes (revisado en (Sullivan, 2008)). La posibilidad de almacenar muestras durante mucho tiempo, ha llevado a la formación de bancos de cordón umbilical que facilitan mucho el encontrar un donante apropiado para cada paciente. Un pequeño porcentaje de las células de este tejido se han identificado como células madre mesenquimales, que tienen una mayor plasticidad que las hematopoyéticas, ya que pueden diferenciarse a varios tipos de tejido, como el epitelial o el óseo. Por esto, se ha promovido la idea de que guardar el cordón umbilical de los recién nacidos facilitará el obtener una fuente de células de prácticamente cualquier tejido que permitirían realizar una terapia autóloga, en caso de ser necesario. Actualmente existe bastante controversia sobre las posibilidades reales de estas terapias, sobretodo, por el negocio que supone su almacenaje para muchas empresas que han aparecido en los últimos años (Gunning, 2007; Samuel et al., 2008).

3.3 Células madre neurales

Las células madre neurales son multipotentes, ya que son capaces de diferenciarse en los tres subtipos de células neurales: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Gage, 2000; Temple, 2001). Pueden obtenerse de diferentes zonas y estadios del desarrollo, pero sus características principales son similares. Reciben también el nombre NSCs, y se expanden *in vitro* en forma de agregados en suspensión, las llamadas neuroesferas. Las NSCs pueden derivarse a partir de ESCs, o aislarse de diferentes zonas del cerebro tanto durante el desarrollo como en el adulto.

3.3.1 Origen de las NSCs

3.3.1.1 A partir de ESCs

Las dificultades para aislar NSCs humanas, han promovido el desarrollo de protocolos para obtenerlas a partir de ESCs. Esto supondría tener una fuente casi inagotable de células neurales para utilizar en terapias y

permitiría minimizar el rechazo inmunológico mediante la selección de la línea de ESCs que más se adapte a las características del paciente. Además, nos permite estudiar los mecanismos que determinan la conversión neural de estas células pluripotentes. Los distintos protocolos publicados suelen basarse en el uso de genes y moléculas que durante el desarrollo actúan en la especificación del tejido neural. De forma parecida también a lo que ocurre durante el desarrollo, se piensa que las células madre embrionarias adquieren el fenotipo neural por defecto, aunque este tema está siendo todavía ampliamente debatido (Smukler et al., 2006; Tropepe et al., 2001). La obtención de NSCs debe sobreponerse a la muerte celular y a la pérdida de capacidad proliferativa que sufren las ESCs al ser diferenciadas mediante protocolos excesivamente restrictivos, como los que demuestran el fenotipo por defecto. Por eso, existen varios protocolos descritos para llegar a la obtención de cultivos de precursores neurales nestina positivos. Estos cultivos deben ser totalmente puros y no contener ni células de otros linajes ni células que retengan el enorme potencial proliferativo de las ESCs, ya que eso llevaría a la formación de teratomas. La forma en que se diferencian estas células difiere mucho entre los diferentes protocolos, y puede basarse en la disociación y cultivo en monocapa (Ying and Smith, 2003), la formación de EBs (Bibel et al., 2004; Guan et al., 2001; Lee et al., 2000; Okabe et al., 1996), o el cocultivo con líneas celulares que actúan como inductoras neurales (Kawasaki et al., 2000; Kitajima et al., 2005).

3.3.1.1.1 Factores que contribuyen a su diferenciación

Como durante el desarrollo, en la diferenciación neural de las células madre embrionarias, se utilizan primero factores que especifiquen el fenotipo neural y más tarde otros que especifiquen el tipo de neurona en que deben convertirse (figura 18). Para la primera etapa, los factores más usados son inhibidores de BMPs (Baharvand et al., 2007; Gerrard et al., 2005; Itsykson et al., 2005; Pera et al., 2004), o el RA (Baharvand et al., 2007; Carpenter et al., 2001; Erceg et al., 2008; Levenberg et al., 2003; Park et al., 2004; Reubinoff et al., 2001; Schuldiner et al., 2001; Zhang et al., 2001). Este último debe manipularse con especial cuidado por dos motivos, puede inducir diferentes fenotipos dependiendo de la concentración (Gottlieb and Huettner, 1999; Guan et al., 2001), y puede tener un efecto diferenciador excesivo que no permita la

posterior expansión de los precursores neurales (Martin-Ibanez et al., 2007). El FGF, por su parte, pese a ser considerado también un factor neuralizante durante el desarrollo, se utiliza más como estimulador de la supervivencia y de la proliferación de los precursores neurales (Carpenter et al., 2001; Dhara and

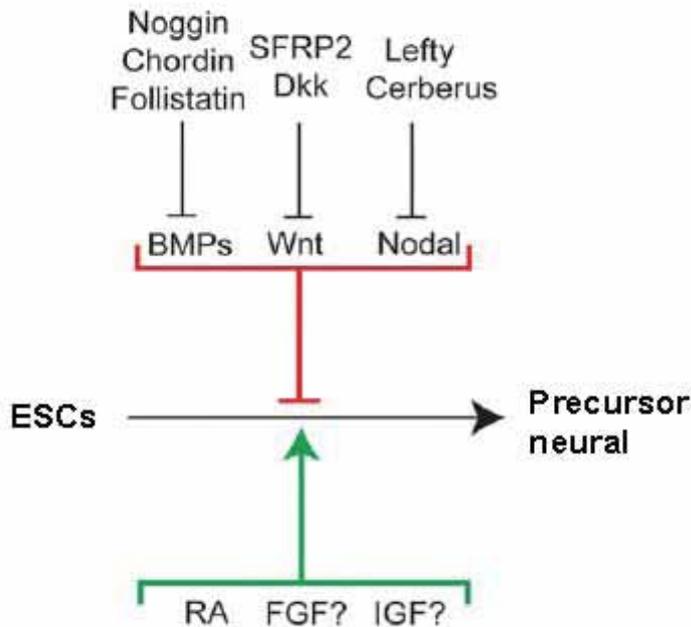


Figura 18

Esquema de las principales moléculas que influyen en la adquisición de un fenotipo neuronal por parte de las células madre embrionarias. Modificado de (Gaulden and Reiter 2008).

Stice, 2008; Okabe et al., 1996; Shin et al., 2006).

Para dirigir la diferenciación posterior a células de una zona específica, se han utilizado, por ejemplo, inhibidores de Wnt para dar fenotipo telencefálico (Watanabe et al., 2005), el cocultivo con células inductoras para conseguir motoneuronas o neuronas periféricas (Lee et al., 2007; Pomp et al., 2005) o RA y Shh para las motoneuronas (Li et al., 2005; Shin et al., 2005).

También se estudia la manera de enriquecer los cultivos en astrocitos mediante CNTF (Barberi et al., 2003) u oligodendrocitos mediante la adición de PDGF, NT3 o Triyodotironina (Dhara and Stice, 2008; Keirstead, 2005; Shin et al., 2006).

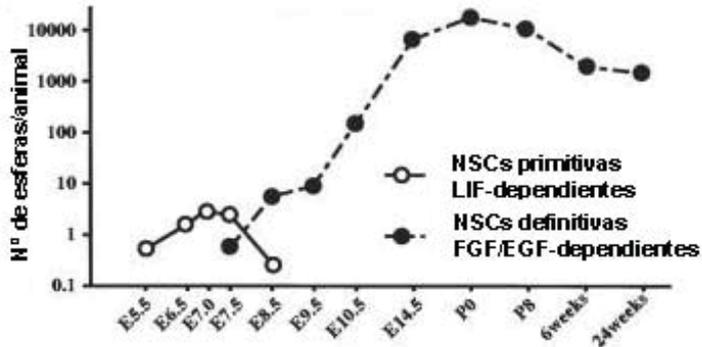
Los genes neurales se han utilizado especialmente como marcadores de la diferenciación neural de las células madre embrionarias. Las líneas que expresan GFP bajo el control de promotores neurales, como Sox1 (Watanabe et al., 2005; Ying and Smith, 2003) o Mapt (tau) (Bibel et al., 2004), son especialmente útiles para seleccionar las células neurales y evitar la formación de tumores al transplantarlas (Fukuda et al., 2006). Hay varias razones por las que la expresión de estos genes no se utiliza para dirigir el fenotipo de las células madre embrionarias. En primer lugar, la presencia de estos genes está altamente regulada por multitud de factores en las células en desarrollo, y esta regulación se pierde al transfectar vectores de expresión, por

lo que los efectos de esta expresión incontrolada pueden ser totalmente distintos a los de la expresión regulada. Por otro lado, la expresión de dichos genes durante el desarrollo es, en la mayoría de casos, transitoria, por lo que de nuevo la expresión no controlada mediante un vector de expresión no resulta adecuada.

3.3.1.2 Fetales

La obtención de células madre neurales de todas las partes del sistema nervioso de los animales de laboratorio es sencilla. Basta con diseccionar la zona en la que se está interesado y proceder a disgregarla y crecer las células en cultivo en presencia de mitógenos y ausencia de suero. El medio más comúnmente utilizado para el aislamiento y expansión de estos cultivos es el suplementado con FGF y EGF. Las células en estas condiciones forman unos agregados flotantes, parecidos a los EBs pero que están formados únicamente por células neurales, las neuroesferas. Su composición celular no está bien definida por el momento, pero se sabe que conviven en ella diferentes tipos de precursores neurales, así como células más diferenciadas como neuronas jóvenes y astrocitos. Su elevada capacidad proliferativa y su facilidad para diferenciarse en los tres tipos neurales con la simple eliminación de los mitógenos, las hacen unas herramientas excelentes para estudios de desarrollo del sistema nervioso.

Según la edad en la que aparecen *in vivo*, se han descrito varios tipos de células madre neurales (figura 19). Hacia E7 se pueden aislar neuroesferas de la placa neural de ratones, pero éstas no responden a FGF ni EGF, sino que el cultivo es promovido por LIF (Hitoshi et al., 2004). Estas células reciben el nombre de NSCs primitivas, ya que son el primer tipo celular que podemos considerar como capaz de dar lugar a cultivos neurales *in vitro* (Tropepe et al., 2001). Poco más adelante, a E8.5, estas células adquieren la capacidad de proliferar en respuesta a FGF, gracias al inicio de la actividad de la vía de Notch (Hitoshi et al., 2004; Tropepe et al., 1999). Estas son las llamadas NSCs definitivas, y se dividen de forma simétrica para amplificar su número. Más tarde, poco antes de E14, estas células generan por división asimétrica otra población de NSCs con capacidad de responder a EGF (Martens et al., 2000).

Figura 19

Aparición de los distintos tipos de NSCs durante el desarrollo en ratones. Las NSCs primitivas, dependientes de LIF, se encuentran sólo durante un breve periodo de tiempo, entre E5.5 y E8.5. A partir de entonces, generan por división asimétrica las NSCs definitivas, dependientes de FGF y/o EGF. Tomado de (Hitoshi et al., 2004).

distintas zonas del sistema nervioso, tienen distintas propiedades (Eriksson et al., 2003; Kim et al., 2006). Uno de los mayores inconvenientes que presenta el mantenimiento de estas células en cultivo es que parece que con los pases se homogenizan sus características y se restringe su potencial para diferenciarse a las células de la zona de la que provienen (Dromard et al., 2007; Gabay et al., 2003; Santa-Olalla et al., 2003; Skogh et al., 2003), aunque otros trabajos demuestran el mantenimiento de cierta especificidad de zona en el caso de las células humanas (Kallur et al., 2006). Se han identificado genes implicados en su capacidad de diferenciarse a fenotipos concretos. Por ejemplo, el potencial para dar lugar a neuronas con características estriatales depende de Gsh2, y su expresión se pierde con los pases en cultivo (Jensen et al., 2004). Este problema es especialmente importante para la obtención de fenotipos dorsales debido al efecto ventralizante del FGF (Bithell et al., 2008), que por otra parte, es necesario para la supervivencia y proliferación del cultivo.

3.3.1.3 Adultas

Las NSCs adultas están concentradas principalmente en dos zonas o nichos: la zona subventricular (SVZ del inglés subventricular zone) de la pared del ventrículo lateral y la zona subgranular del giro dentado del hipocampo. Las células nacidas en la SVZ migran anteriormente a través de la ruta migratoria rostral recorriendo una larga distancia hasta llegar al bulbo olfativo, donde se diferencian a interneuronas (Alvarez-Buylla et al., 2002; Doetsch et al., 1997). Por otro lado, las neuronas del giro dentado nacen en las capas de la zona subgranular y recorren una pequeña distancia para integrarse en el propio giro dentado (Gage, 2000).

3.3.1.3.1 SVZ

La SVZ es conocida también como SEZ (del inglés subependymal zone), pero no deriva de la SVZ embrionaria, sino que se cree que proviene de la glía radial tanto de las eminencias ganglionares como del córtex, que se diferencian terminalmente en astrocitos que se sitúan por debajo del epéndima ventricular (Merkle et al., 2004). Estudios de microscopía electrónica han permitido una reconstrucción detallada de la citoarquitectura de la SVZ (figura 20) (Doetsch et al., 1997). El nicho de la zona subventricular se encuentra constituido por cuatro tipos celulares (Doetsch et al., 1997). Una monocapa de células endodiales ciliadas que rodean la pared del ventrículo lateral son las responsables de producir los factores que regularán el comportamiento de las células madre neurales. Adyacentes al ventrículo y en contacto con él se encuentran las células B que son las verdaderas células madre de la SVZ. Éstas son positivas para el marcador astrocitario GFAP y se encuentran en contacto con la lámina basal de los vasos sanguíneos. Poseen una gran capacidad de autorenovación y dan lugar a las células de tipo C, de rápida amplificación (transit amplifying cells). Las células C a su vez darán lugar a las células A, neuroblastos postmitóticos que migran hacia el bulbo olfativo. Estas células siguen la ruta migratoria rostral (RMS del inglés Rostral Migratory Stream) hasta el bulbo, donde se diferencian (Lois and varez-Buylla, 1994).

El hecho de que las células madre neurogénicas presenten características estructurales y moleculares de células clásicamente

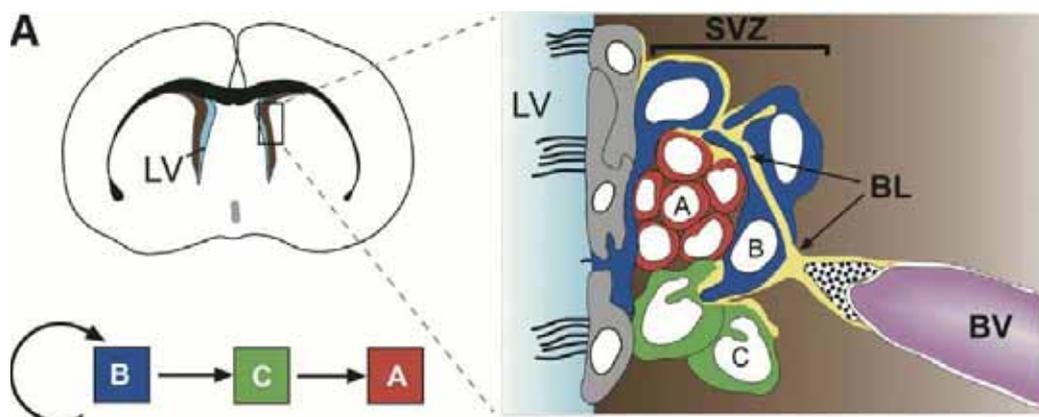


Figura 20

Citoarquitectura del nicho neurogénico de la SVZ adulta. Se muestra la situación de la SVZ en un corte coronal del cerebro y la organización y jerarquía de las células que componen el nicho. LV = Lateral Ventricle (ventrículo lateral). BL = Basal Lamina (lámina basal) BV = Blood Vessel (vaso sanguíneo). Tomado de (Alvarez-Buylla and Lim, 2004).

consideradas de un linaje astrogial, ha cambiado por completo los conceptos tradicionales sobre el desarrollo del cerebro así como de la identidad de las células madre (Doetsch et al., 1999; Imura et al., 2003; Seri et al., 2001).

Recientemente se ha demostrado que la SVZ no es una estructura homogénea, sino que diferentes regiones de la misma dan lugar a distintos tipos de interneuronas (Lledo et al., 2008; Young et al., 2007) Curiosamente, la estructura de la SVZ parece ser totalmente diferente en los primates superiores, lo que nos recuerda que los estudios con ratones se vuelven poco extrapolables en ciertas circunstancias. Además, la existencia o no del RMS en humanos genera un intenso debate entre los científicos en estos momentos ((Curtis et al., 2007), ver comentarios en la revista).

3.3.2 Control epigenético

Los mecanismos básicos que controlan nuestras células nerviosas son los mismos que los que controlan el simple cerebro de una planaria. Incluso los genes que se activan y desactivan en momentos determinados son los mismos. Pero debemos ser cautos con las extrapolaciones, ya que una misma acción, unos mismos genes, pueden tener consecuencias absolutamente distintas dependiendo del entorno.

Las modificaciones epigenéticas del genoma han evolucionado en nosotros extraordinariamente más rápido que las genéticas. Son una forma de evolución distinta, sin cambios en la información genética que poseen nuestras células pero sí en la forma que tienen de utilizarla. Se trata de cambios en el estado del DNA que facilitan o dificultan su transcripción a mRNA. Este hecho que ahora empezamos a entender puede convertirse en una de las ramas de investigación más prometedoras de los próximos años.

Una de las principales dificultades a que nos enfrentamos al describir las vías de señalización que definen el fenotipo neural que adoptará una célula, es que los precursores neurales pueden responder de forma totalmente distinta a la misma señal según el estado en que se encuentren. Así pues, muchas moléculas que en etapas tempranas promueven la proliferación de los precursores, como por ejemplo LIF o EGF, se vuelven más tarde potentes inductores de la diferenciación, en este caso, astrocitaria. Esta

capacidad de responder de forma diferente a un mismo estímulo está relacionada con los grandes cambios epigenéticos que se dan en los precursores a medida que avanza el desarrollo. Comprender el patrón temporal de estas modificaciones durante el desarrollo es fundamental para adecuar los protocolos de diferenciación de las NSCs y hacerlos más efectivos.

Una de las modificaciones epigenéticas más estudiada se basa en la modificación de las histonas que están unidas al DNA, manteniendo su plegamiento y estructura. Entre las muchas alteraciones posibles (acetilaciones, metilaciones, fosforilaciones, sumoilaciones y ribosilaciones), las más importantes son las acetilaciones. La acetilación de las histonas hace que se libere un poco el DNA, haciéndolo más accesible a las proteínas que se encargan de la transcripción. Las proteínas implicadas en esta regulación que mejor se han estudiado en el sistema nervioso son las HDACs. Se clasifican en dos tipos, I y II, según sus propiedades. Las de tipo I se expresan de forma ubicua en todas las células, mientras que las de tipo II son específicas de tejido. Las HDACs de tipo II mantienen los precursores neurales indiferenciados, ya que se ha observado que inhibidores de las mismas promueven su diferenciación neuronal (Hsieh et al., 2004).

Otra de las modificaciones más comunes es la metilación del DNA. Esta se da normalmente en zonas del DNA ricas en dinucleótidos CpG, las llamadas islas CpG. La metilación supone la inactivación del DNA y, por tanto, la disminución de la transcripción génica. En el sistema nervioso, un ejemplo claro de esta regulación es la metilación del sitio de unión de STAT3 del promotor de GFAP durante la neurogénesis (Takizawa et al., 2001). Esto quiere decir que la diferenciación de los precursores neurales a astrocitos está inhibida en el período en que deben generarse neuronas. Además, se ha demostrado que para la diferenciación astrogial se requiere la desmetilación tanto de genes marcadores astrocitarios (GFAP y S100B), como de diversos genes de la vía JAK/STAT (Fan et al., 2005).

La implicación de factores morfogenéticos en el control de estas modificaciones del DNA, hace todavía más evidente su importante papel en el desarrollo del sistema nervioso. Por ejemplo, el FGF es capaz de producir cambios a nivel de cromatina (metilación de histonas) en el promotor de GFAP. Estas metilaciones facilitan la unión de CNTF al promotor, y por tanto, provocan

la diferenciación de los precursores neurales a astrocitos (Song and Ghosh, 2004).

La unión entre la información morfogénica y las modificaciones epigenéticas, es posible gracias a la regulación de los complejos proteicos que se unen al DNA para llevar a cabo dichas modificaciones. Las proteínas del complejo pueden ser alteradas a nivel de expresión o de actividad en respuesta a las señales que recibe la célula. El cambio en la composición del mismo resultará en el incremento o disminución de su actividad. Un buen ejemplo de esto se da con la familia de proteínas Groucho/Tle. Estas, tienen la capacidad de reclutar HDACs, por lo que son represores transcripcionales. Entre otras muchas funciones, colaboran a la represión génica mediada por los genes Hes, de la vía de Notch (Grbavec et al., 1998). En respuesta a la señalización de EGF, groucho se fosforila, lo que se traduce en una disminución de su capacidad represora y, por tanto, un incremento de la transcripción de los genes inhibidos por Hes1 (Hasson et al., 2005).

3.3.2.1 RNAs no codificantes

Cada vez es más evidente el importantísimo papel que tienen los RNAs no codificantes (ncRNAs) en el control de la transcripción génica, lo que incluye el sistema nervioso (para revisión ver (Mehler and Mattick, 2007)). La idea de que la información genética debe traducirse a proteínas para ser funcional, se ajusta a la realidad en procariotas, pero no en eucariotas. Además, más del 70% de las proteínas del genoma humano pueden estar potencialmente reguladas por una de las muchas clases de ncRNAs: los microRNAs. Dentro del sistema nervioso, diferentes tipos de microRNAs se expresan diferencialmente en neuronas y células gliales (Smirnova et al., 2005), y se ha demostrado que son necesarios para la correcta morfogénesis y diferenciación neural en la corteza cerebral y el hipocampo (Davis et al., 2008).

En el telencéfalo basal, el caso más estudiado hasta el momento es el de *Evf1* (Faedo et al., 2004; Kohtz and Fishell, 2004). Este gen está localizado al lado del gen *Dlx6*, y se expresa en respuesta a *Shh* (Kohtz and Fishell, 2004). Además, se encuentra incrementado en los mutantes de *Pax6* y disminuido en los de *Dlx1/2*, por lo que se postula que su regulación depende de la acción de *Dlx1/2* (Faedo et al., 2004). Además, recientemente se ha

descrito la presencia de una forma de splicing alternativo de Evf1, llamada Evf2 (Feng et al., 2006). Sorprendentemente, este ncRNA tiene capacidad para formar un complejo estable con Dlx2, mediante el cual estimula la expresión de Dlx5/6. Así pues, los ncRNAs pueden regular la expresión génica modulando tanto la estabilidad del mRNA de otras proteínas, como interaccionando directamente con ellas.

3.4 Terapias de trasplante celular para enfermedades del sistema nervioso

Las esperanzas generadas por las células madre para el tratamiento de diversas enfermedades se han traducido ya en multitud de ensayos clínicos. Además del trasplante de células hematopoyéticas para la recuperación del linaje sanguíneo, otro tipo de células madre, las mesenquimales, se utilizan también con éxito para la cura de fístulas (García-Olmo et al., 2008) e incluso como terapia protectora en ciertas enfermedades coronarias (Mazo et al., 2008; Shi and Li, 2008). En el caso del sistema nervioso estamos todavía lejos de ofrecer resultados tan prometedores, debido a su enorme complejidad. Pero, sin duda las múltiples aplicaciones de las células madre serán capaces de generar en los próximos años terapias eficientes para ciertas enfermedades neurodegenerativas.

3.4.1 Tipos de terapias

Estas estrategias se pueden clasificar básicamente en tres tipos: terapias de sustitución celular, de movilización endógena de la neurogénesis y de protección de las células para evitar su muerte.

Las terapias de sustitución celular han sido el primer objetivo de las investigaciones con células madre, si bien son, a priori, las que representan un reto más importante. A grandes rasgos, se basan en la diferenciación del tipo adecuado de célula madre hacia un fenotipo neural concreto, de una forma controlada, homogénea y en las cantidades suficientes, para transplantarlas en la zona donde se espera que reemplacen la función de las células que se han perdido. A medida que ha ido avanzando nuestro conocimiento sobre las propiedades de las células madre neurales, se ha ido descubriendo que supuestos efectos beneficiosos de este tipo de terapias no se debían a la

sustitución de las células enfermas, sino a la protección de las mismas gracias a la secreción de diversos factores tróficos por parte de las células transplantadas (Bjorklund and Lindvall, 2000; Peschanski et al., 2004).

Así, las terapias más prometedoras resultan ser las que buscan la protección de las células existentes. El principal problema de esta aproximación es la vía de administración de los factores neuroprotectores, ya que la mayoría de factores tróficos son moléculas proteicas incapaces de atravesar la barrera hematoencefálica. Las principales moléculas neuroprotectoras que han sido utilizadas para este tipo de terapia son las neurotrofinas, como el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina-3 (NT3) o la neurotrofina 4/5 (NT4/5) (Alberch et al., 2004; Perez-Navarro et al., 1994). También se ha utilizado el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), y algunas citoquinas como el factor neurotrófico ciliar (CNTF), el TGF- β , entre otros muchos factores (Alberch et al., 2002; Lindvall and Wahlberg, 2008; Schober et al., 2007).

Una de las estrategias más prometedoras para solventar el problema de la administración de los factores, es el trasplante intracerebral de células capaces de liberarlos. Los primeros intentos de trasplantes de fibroblastos modificados para sobreexpresar factores neuroprotectores tuvieron cierto éxito, pero estas células no se integran en el parénquima cerebral y en ocasiones forman tumores, por lo que no son una buena fuente para los trasplantes en humanos (Alberch et al., 2004; Chen and Gage, 1995; Grill et al., 1997). Las NSCs, en cambio, muestran buena supervivencia y buena integración en el cerebro adulto. Migran extensamente y, o bien permanecen en estado indiferenciado quiescente o bien se diferencian hacia fenotipos mayoritariamente gliales, sin formar tumores (Martinez-Serrano and Bjorklund, 1997; Park et al., 2002). El trasplante de NSCs manipuladas genéticamente se perfila, pues, como una estrategia realista para la administración de factores neuroprotectores (Arenas, 2002; Martinez-Serrano and Bjorklund, 1997; Pineda et al., 2007).

Por último, está demostrado que es posible conseguir una movilización de la neurogénesis endógena. Se ha observado que el aprendizaje, el ejercicio y la riqueza de estímulos del entorno incrementan la neurogénesis y el reemplazo neuronal (Kempermann et al., 1997; Lie et al.,

2004; Nottebohm, 2002; Van Praag et al., 2000), mientras que el estrés los reduce (Duman et al., 1999), probablemente por la acción negativa de los glucocorticoides (Cameron and McKay, 1999). Se han utilizado diversos factores de crecimiento para promover la neurogénesis endógena, muchos de ellos con resultados positivos. La administración de factores estimulantes como EGF, FGF, TGF β , IGF1, etc. incrementa la proliferación de precursores neuronales tanto en la zona subventricular como en el giro dentado (Aberg et al., 2000; Chmielnicki et al., 2004; Craig et al., 1996; Fallon et al., 2000; Jin et al., 2002; Kuhn et al., 1997; Teramoto et al., 2003; Zigova et al., 1998). Se ha visto como muchas de estas nuevas células adquieren fenotipos neuronales, migran a otras zonas, como el núcleo estriado o el bulbo olfativo, y pueden integrarse funcionalmente (Lindvall et al., 2004).

La neurogénesis aumenta también como consecuencia del daño o degeneración neuronal. Se sabe que ciertas lesiones, como la isquemia global o parcial (Jin et al., 2003; Parent et al., 2002; Peterson, 2002) o enfermedades neurodegenerativas como es el caso de la enfermedad de Huntington (Curtis et al., 2003) estimulan la proliferación de precursores de la zona subventricular, que migran a la zona dañada y adquieren un fenotipo neuronal correcto (Arvidsson et al., 2002). Sin embargo, sólo se consiguen regenerar un porcentaje pequeñísimo (<0.2%) de las neuronas perdidas. Se han mostrado evidencias reales de la existencia de integración específica y funcional de nuevas neuronas en el hipocampo después de una isquemia global (Nakatomi et al., 2002), lo que demuestra que el cerebro adulto conserva cierta capacidad de regeneración. Las NSCs poseen la sorprendente capacidad de migrar selectivamente hacia zonas del cerebro que han sido dañadas o han degenerado (Aboody et al., 2000; Snyder et al., 1997). Además, las células madre administradas exógenamente son capaces de integrarse en los nichos existentes en la zona en que se transplantan, tal y como se ha demostrado para el caso de células madre hematopoyéticas transplantadas en la SVZ adulta (Bonilla et al., 2005). La probable existencia de señales gliogénicas inhibitorias de la neurogénesis en la mayor parte de casos de daño cerebral, abre la puerta al desarrollo de moléculas capaces de contrarrestar dicha inhibición, permitiendo así una tasa más elevada de reemplazo neuronal (Rossi and Cattaneo, 2002).

3.4.2 Ensayos clínicos y perspectivas de futuro

Hace ya algunos años se llevaron a cabo diversos ensayos clínicos de terapia celular para enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson (Hagell et al., 2002; Lindvall and Hagell, 2000; Piccini, 2002; Polgar et al., 2003) o la corea de Huntington (Bachoud-Levi et al., 2000a; Bachoud-Levi et al., 2000b; Bjorklund and Lindvall, 2000; Freeman et al., 2000; Hauser et al., 2002; Philpott et al., 1997; Rosser et al., 2002; Watts and Dunnett, 2000). Los trasplantes consistían en tejido procedente de fetos humanos, muchas veces sin disgregar.

Pese a que algunos de los ensayos dieron resultados prometedores, actualmente este tipo de terapias se encuentran paralizadas por diversos motivos. En primer lugar, el objetivo de los trasplantes fue el de sustituir las células dañadas por otras sanas procedentes del tejido fetal. Poco después se demostró que el efecto observado no se debía en ningún caso a la sustitución, sino al efecto neuroprotector que habían ejercido las células fetales sobre las neuronas que todavía no habían degenerado en los pacientes. Este hecho puso de manifiesto que se deben estudiar cuidadosamente las terapias en los animales de experimentación antes de plantear su paso a los humanos. En segundo lugar, el origen fetal de los trasplantes plantea problemas éticos y de tipo práctico, ya que no es posible controlar de forma precisa la calidad ni la cantidad de los mismos. Por último, estas terapias, aunque consiguen mejorar ciertos síntomas de las enfermedades neurodegenerativas en que se aplican, en ningún caso consiguen parar o revertir su evolución, por lo que no suponen una gran diferencia con los métodos farmacológicos ya utilizados. En el caso de la corea de Huntington, en que no existe ningún tratamiento efectivo, pueden funcionar como tratamiento sintomático, pero se debe evaluar detenidamente el riesgo que suponen este tipo de operaciones. Actualmente se está desarrollando, por ejemplo, un ensayo clínico para el uso de células madre como terapia protectora en la esclerosis lateral amiotrófica. Investigaciones previas en ratones dieron resultados prometedores, mostrando que las células madre transplantadas eran capaces de evitar la muerte de las neuronas mediante el aporte de GDNF (Cabanés et al., 2007).

Por eso, actualmente se están realizando muchos esfuerzos para utilizar las células madre como fuente de células para ser transplantadas y aportar soporte trófico en las zonas afectadas en diversas enfermedades. Entre los problemas que quedan todavía por solucionar, encontramos la homogeneización de las condiciones de cultivo para obtener resultados reproducibles, el establecimiento de un protocolo de diferenciación que no permita la aparición de otros tipos celulares y, sobretodo, la total eliminación de células que mantengan la capacidad proliferativa, para evitar la formación de tumores.

