

INSTITUTO DE ESPAÑA
REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

**LAS CÉLULAS GLIALES: SU IMPORTANCIA
EN EL FUNCIONAMIENTO, DESARROLLO Y
REPARACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO**

DISCURSO LEÍDO
EN LA SOLEMNE SESIÓN INAUGURAL
DEL CURSO ACADÉMICO
CELEBRADA EL 12 DE ENERO DE 2017

por la

EXCMA. SRA. DOÑA M^a TERESA MIRAS PORTUGAL,
ACADÉMICA DE NÚMERO DE LA RANF



Madrid - 2017

**INSTITUTO DE ESPAÑA
REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA**

**LAS CÉLULAS GLIALES: SU IMPORTANCIA
EN EL FUNCIONAMIENTO, DESARROLLO Y
REPARACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO**

DISCURSO LEÍDO
EN LA SOLEMNE SESIÓN INAUGURAL
DEL CURSO ACADÉMICO
CELEBRADA EL 12 DE ENERO DE 2017

por la
EXCMA. SRA. DOÑA M^a TERESA MIRAS PORTUGAL,
ACADÉMICA DE NÚMERO DE LA RANF



Madrid - 2017

Depósito legal: M. 42.656-2016

ISBN: 978-84-946424-0-1

INDICE

	<i>Páginas</i>
1. Introducción	5
1.1 Las primeras civilizaciones y el cerebro	6
1.2 Hipócrates y el cerebro.....	7
1.3 El cerebro y las estructuras nerviosas en el Renacimiento: Leonardo da Vinci y Andreas Vesalio	8
1.4 Andreas Vesalio y su obra	9
2. Las células gliales, caracterización histórica	11
2.1 Las células gliales: diversidad y funciones	13
2.2 Los astrocitos generalidades.....	13
2.3 Astrocitos humanos versus astrocitos de roedores.	14
2.4 Astrocitos: La sinapsis tripartita	17
2.5 Los trasplantes de glía humana: ¿Una anécdota o una posibilidad?.....	19
2.6 Los oligodendrocitos: mielinización del sistema nervioso central y aprendizaje.....	21
2.7 Los trasplantes de glía, oligodendrocitos, y el estudio de desórdenes neurológicos asociados a la mielina.....	23
3. Desarrollo del cerebro: Nichos neurogénicos y progenitores neurogliales	25
3.1 Factores que inducen la formación y diferenciación del sistema nervioso.....	26
3.2 La glía radial: El andamiaje del cerebro en el origen de las células neurogliales y su migración	28
3.3 Virus del Zika y la glía radial	30
3.4 Generación de neuronas y glía y su regulación durante el desarrollo embrionario.....	32

3.5. Neurogénesis en el adulto, los progenitores gliales de la zona subventricular.....	34
Reflexiones finales.....	41
Bibliografía.....	42

Excmo. Sr. Presidente, Sras. y Señores Académicos, Señoras y Señores.

Agradezco sinceramente a la Junta de Gobierno y a los miembros de la Sección Segunda de Biología, Biotecnología y Farmacogenómica, por el distinguido encargo de pronunciar el Discurso de apertura de la Real Academia Nacional de Farmacia del curso Académico del año 2017.

1. INTRODUCCIÓN

Una hipótesis científica representa una dirección nueva, un camino que se traza a la observación y a la experimentación, el cual, si no conduce inmediatamente a la verdad, suscita siempre investigaciones y críticas que nos aproximan a ella” (Ramón y Cajal, 1895).

El contenido del cráneo, conocido como encéfalo, es el conjunto de varias estructuras, cerebro, cerebelo y bulbo raquídeo, aunque de modo inexacto se denomine vulgarmente cerebro a todo el grupo. El encéfalo, a pesar de estar bien protegido por la coraza ósea rígida, puede sufrir lesiones traumáticas que exponen su contenido a la observación. Quizás, desde el comienzo de la andadura de los humanos y tras los resultados de la dura lucha por la supervivencia, algunos de nuestros antepasados, en los que seguramente los “medico-farmacéuticos” de hoy día nos reconocemos, habrían tratado de remediar, en lo posible, las lesiones acaecidas. De hecho, la trepanación craneal fue, al parecer, una técnica empleada desde los tiempos más remotos, como puede deducirse de los numerosos hallazgos arqueológicos datados en el mesolítico y neolítico. Entre estos cráneos trepanados están los hallados en Ucrania en el yacimiento de Vasilyevica II de hace unos 8000 años. Más recientes son los de Ensisheim, en Alsacia, con aproximadamente 6000-7000

años de antigüedad, posiblemente los más antiguos bien identificados y algunos de cuyos pacientes sobrevivieron. En España el museo Diocesano de Solsona expone un cráneo del Neolítico, con trepanación frontal y formación de hueso nuevo en sus bordes, lo que indica que fue uno de los casos de éxito.

Lo que resulta menos comprensible es que la trepanación o asimilada, se siguiera utilizando durante milenios, si consideramos que, una de las obras maestras de El Bosco, *“la extracción de la piedra de la locura”*, pintada entre 1475 y 1480, ubicada en el Museo del Prado de Madrid, representa claramente una trepanación. Posiblemente realizada en similares condiciones de higiene.

1.1. Las primeras civilizaciones y el cerebro

Con la adquisición de la escritura, las civilizaciones más antiguas dejaron constancia de su interés por el contenido craneal, que suponemos en algunas fue intenso, aunque lo que ha llegado a nuestros días es escaso. La civilización egipcia es una muestra de ello, pues a pesar de los limitados escritos rescatados de sus necrópolis, nos han legado en el papiro quirúrgico de Edwin Smith, escrito durante la Dinastía XVIII (1550-1295 a.C.), una clara muestra del alto nivel alcanzado. Este papiro contiene 6 de las 8 referencias al cerebro que han aparecido entre todos los papiros analizados y describe los síntomas, diagnóstico y pronóstico de dos personas con fracturas del cráneo y como hacer la limpieza y sutura de las heridas abiertas. Los eruditos del tema tienen evidencias de que este papiro es una recopilación de otros mucho más antiguos, posiblemente del 3000 a. C, que se transmitían entre los profesionales de la medicina y eran colocados en sus tumbas, como el más preciado de los tesoros.

En Mesopotamia, la medicina tuvo un desarrollo más ligado a la magia y considerando la enfermedad como algo implícito en la conducta y el pecado. En las tablillas de arcilla que contienen conocimientos de medicina, no hay descripciones específicas del cerebro, pero si muchos tratamientos medicinales con plantas, los dioses que cuidaban de cada enfermedad o parte del cuerpo, y el conjuro adecuado para cada dios específico. Señalar que el Código de Hammurabi del año 1700 a.C, que sirvió como referente y un gran avance en la claridad para aplicar las leyes y el castigo merecido, debió de desanimar a muchos médico-cirujanos en introducir innovaciones en sus técnicas, por miedo y respeto a la Ley del Talión. Tampoco en la Biblia hay mención alguna al cerebro como órgano, ni descripción de su anatomía o lesiones, aunque si hacen mención al pensamiento y la razón.

1.2. *Hipócrates y el cerebro.*

Una concepción mucho más racional y moderna de la medicina se desarrolló hace aproximadamente dos mil quinientos años, en el Mediterráneo Oriental, en la que fue quizás la época más floreciente de la Antigua Grecia. Esa época conocida como siglo de Pericles, es cuando ejerció la medicina Hipócrates de Cos. Fundador de la escuela que lleva su nombre, Hipócrates consiguió revolucionar la medicina y hacer de ella una ciencia independiente y separada de la filosofía y la adivinación. Ese momento fundacional y estelar de la Medicina racional coincide en el tiempo con las guerras del Peloponeso, y la adivinación de los oráculos. Destaca entre ellos el oráculo de Delfos, quizás el más famoso, en cuyo templo de Apolo, a través de las entrañas de animales sacrificados, vaticinaban el destino del hombre. Es sorprendente que, en medio de un mundo tan cruel e irracional, en esta pequeña isla del mar Egeo, más cerca de Turquía que de Grecia, se escribieran los primeros tratados de medicina científica, estableciendo un diagnóstico basado en la experiencia.

La situación actual del Mediterráneo Oriental no dista mucho, a pesar de los casi 2.500 años transcurridos, en el panorama sangrante que ofrecen los humanos que se ven forzados a dejar la ribera sur del mismo mar. Sin olvidar, que proceden de las civilizaciones donde surgieron los primeros grandes descubrimientos para el avance de la humanidad, entre otros, el alfabeto, la obtención y aleación de los metales, el estudio de la astronomía, el manejo del agua, la domesticación de especies animales, la agricultura y el eje que dotó a la rueda de movimiento y control, entre otros muchos. Civilizaciones de las que hoy día seguimos siendo deudores. ¿Qué pensaría Hipócrates de Cos, si esta humanidad doliente llegara huyendo en masa a su hermosa isla, en aquellos tiempos tan remotos, pero recurrentes? Quizás lo vivió.

Hipócrates en su *Tratado sobre la Enfermedad Sagrada*, referido principalmente a comprender la epilepsia, hace una precisa descripción de las capacidades y funciones cerebrales. Sus apreciaciones siguen siendo actuales y llamativas incluso en nuestros días (*cito texto*): *“El hombre debería saber que, del cerebro, y no de otro lugar vienen las alegrías, los placeres, la risa y la broma, y también las tristezas, la aflicción, el abatimiento, y los lamentos. Y con el mismo órgano, de una manera especial, adquirimos el juicio y el saber, la vista y el oído y sabemos lo que está bien y lo que está mal, lo que es trampa y lo que es justo, lo que es dulce y lo que es insípido, algunas de estas cosas las percibimos por costumbre, y otras por su utilidad... Y a través del mismo órgano nos volvemos locos y deliramos, y el miedo y los terrores nos asaltan, algunos de*

noche y otros de día, así como los sueños y los delirios indeseables, las preocupaciones que no tienen razón de ser, la ignorancia de las circunstancias presentes, el desasosiego y la torpeza. Todas estas cosas las sufrimos desde el cerebro”.

(Hipócrates: *Sobre la enfermedad Sagrada*, traducido por Francis Adams, Enciclopedia Británica Inc.) SMITH, C.U.M. *El cerebro*. Madrid, Alianza Editorial, 1972, p. 23.

La medicina hipocrática caló profundamente en todos los médicos posteriores difundándose desde Grecia hacia todos los confines del imperio Romano. Este fue el caso de Galeno que ejerció la Medicina con gran influencia en diferentes lugares del imperio hasta instalarse definitivamente en Roma. Conocimientos que también pasan a los médicos árabes y persas por el contacto con el imperio Romano de Oriente, e igualmente a las diversas escuelas europeas. La medicina actual sigue siendo deudora del pensamiento hipocrático, aunque con mucha más tecnología para validar el diagnóstico.

1.3. El cerebro y las estructuras nerviosas en el Renacimiento: Leonardo da Vinci y Andreas Vesalio

Haciendo un amplio paréntesis, Europa mantuvo en sus escuelas de medicina la transmisión del conocimiento clásico, con algunos descubrimientos significativos, pero el gran avance en el conocimiento del cerebro se inicia en el Renacimiento, curiosamente de la mano de grandes artistas, algunos no necesariamente ligados a la medicina. La necesidad de un conocimiento anatómico preciso era indispensable para los grandes pintores renacentistas, rendidos ante la belleza del cuerpo humano.

El cambio en la comprensión del cerebro humano, comienza con Leonardo da Vinci. Este gran artista, polifacético e inventor de todo tipo de máquinas, nació en Vinci, pequeño pueblo próximo a Florencia en 1452 y fallecido en Francia en el Castillo de Amboise en 1519. Sus dibujos de anatomía, con una precisión y belleza desconocida hasta entonces, dieron cuenta detallada de la anatomía del cuerpo humano, incluidos los órganos internos. El cerebro, fue uno de los órganos que acaparó su interés y curiosamente, como era un tejido muy blando y difícil de cortar, ideó la técnica de inyectar cera en los conductos y cavidades del cráneo. Esta técnica, hoy en día mucho más sofisticada, permitió hacer cortes de los tejidos blandos y realizar los estudios neuroanatómicos con precisión, permitiéndole delimitar las diferentes estructuras cerebrales. Incluso dibuja con claridad los nervios de los pares craneales y su relación con los órganos de los sentidos, y la continuidad del

encéfalo con la medula espinal. Por desgracia sus estudios no se publicaron como un tratado y estuvieron dispersos y sin ser conocidos durante muchos años, siendo recuperados en su mayoría en el siglo XIX. Los conocedores de la obra de Leonardo lo achacan a la carencia de estudios formales en medicina y su falta de conexión con los profesionales del gremio. Falta de formación que suplía con su excepcional inteligencia y dotes de observación, pero sin ser consciente del valor de su propia obra en el ámbito académico.

1.4. *Andreas Vesalio y su obra*

Sin duda en esta época del Renacimiento, el médico y anatomista por excelencia, y así reconocido, fue Andrés Vesalio (Andreas van Wesel). El cual nació en Bruselas en 1514, justamente cinco años antes de la muerte de Leonardo da Vinci, y fallece en Zante, Grecia, en 1564. Su padre era médico y él pudo estudiar en los mejores centros, de Europa, con una movilidad similar a la que disfrutarían nuestros alumnos de Erasmo en la actualidad. Sin descartar las excepciones debidas a que algún soberano declaraba la guerra, o se enemistaba con el reino vecino. En esa situación, el control de las fronteras, obligaba a que los foráneos, no afines, abandonaran el reino. Analícese desde esa perspectiva las consecuencias actuales del Brexit y el absurdo que conlleva en pleno siglo XXI.

Andreas Vesalio empieza sus estudios de artes en Lovaina, continúa estudiando medicina en París, donde su profesor de anatomía, Jacobus Sylvio, lo inicia en la disección anatómica. La guerra entre Francisco I de Francia y Carlos V Rey de España y Emperador del Sacro Imperio Romano Germánico, lo forzaron a irse de París, y posteriormente moverse por Universidades de Italia. Siendo profesor de anatomía en Bolonia y Pisa, comienza a realizar láminas de anatomía de gran belleza y precisión que empleaba para la enseñanza en la facultad de Medicina. Estas láminas eran copiadas y reproducidas, por lo que decide obtener un beneficio editándolas el mismo, lo que hace en 1538 bajo el título: *Tabulae Anatomicae Sex*. Todas sus láminas procedían de las disecciones de cadáveres de ajusticiados, que un juez de Pisa ordenaba le fueran entregados para su estudio.

La obra más importante de Vesalio, que supuso una revolución en el contexto del conocimiento de la medicina, y que se considera como el primer libro de anatomía moderna, es la titulada "*De humani corporis fabrica*" y es, quizás, una de las obras de mayor influencia científica de todos los tiempos. En la biblioteca de la Real Academia Nacional de Farmacia, gracias al

mecenazgo de Don Juan Abelló, disponemos de una réplica con las mismas características que el original.

Vesalio recoge en esta magna obra las clases magistrales impartidas fundamentalmente en la Universidad de Padua. Las láminas de anatomía, fueron unas originales suyas, y otras dibujadas bajo su control por grandes artistas contemporáneos, algunos discípulos de Tiziano. Tan obsesionado estaba con la calidad que deberían de tener las láminas del libro que se pone en contacto con los mejores impresores. Finalmente, los grabados con el texto fueron impresos en Basilea por el más prestigioso impresor de la época, Joannis Oporini, en 1543. El coste de la obra fue cuantioso y solo pudo ser sufragado gracias al mecenazgo del Emperador Carlos V, aspecto que aparece recogido en la dedicatoria: *“Al divino Carlos V, máximo y siempre invicto emperador”*, quien lo nombró su médico personal. Al abdicar el Emperador en 1562, su hijo y sucesor Felipe II continuó tomándolo a su servicio como médico personal y de confianza. Lo que implicaba una alta distinción y remuneración económica.

La duración de su estancia en España fue de 12 años, y no excesivamente dichosa. Al venir a nuestro país, Vesalio dejó atrás su cátedra en Italia, y los trabajos de disección, que al plasmarlos en las láminas de dibujo de anatomía le habían dado renombre en toda Europa. Ciertamente, aquí lo habían cubierto de honores y económicamente su situación era muy holgada. No obstante, es difícil saber si era eso lo que hubiera deseado, y como todo gran científico, quizás, añoraba la excitación que produce el descubrimiento de algo nuevo. Aunque, en aquella época existía un enriquecedor ambiente cultural y grandes científicos y médicos vinieron a nuestro país atraídos por la generosidad del monarca. Como hijo de una época, era sin duda una persona religiosa lo que justifica su decisión de peregrinar a Jerusalén en 1564. Viaje del que nunca regresó, pues murió a la vuelta, en un naufragio. Podría decirse que es un trágico final, muy español, para un científico universal. Del ambiente de esa época da cuenta con su profundo conocimiento de la Historia de la Ciencia en España el Académico de Número de la RANF, Don Javier Puerto Sarmiento, en su novela histórica titulada: *La leyenda verde*.

La obra *“De humani corporis fabrica”* está dividida en siete libros consta de 869 páginas y más de 300 dibujos anatómicos. Cada uno de los libros describe un aspecto concreto de la anatomía humana. El primero trata de huesos y para nosotros tiene especial relevancia los estudios anatómicos del cráneo desde diferentes perspectivas. El segundo libro está dedicado a la anatomía de los músculos y articulaciones. El tercer libro detalla las arterias y las venas. El cuarto libro hace unas disecciones muy precisas de los ner-

vios periféricos. El quinto libro está dedicado al abdomen y órganos de la reproducción. El sexto libro describe el tórax y los órganos que contiene, con un detallado estudio del corazón. Finalmente, el séptimo libro trata del cerebro, contiene 17 xilografías con diferentes cortes cerebrales y es junto con el primero y el cuarto, los que contienen para los neurocientíficos los datos más importantes.

Las 17 xilografías del libro VII adquieren especial relevancia por su detalle anatómico, especialmente la cuarta lámina que muestra un corte axial del cerebro *in situ* dentro del cráneo. El corte está realizado inmediatamente debajo del cuerpo caloso y se aprecian claramente las zonas de sustancia blanca y sustancia gris en los dos hemisferios, diferenciados con letras denominando cada parte anatómica. Apreciaciones similares se hacen en las láminas siguientes desde la 5 hasta la 8 y su descripción relativa a la nomenclatura actual ha sido recientemente revisada (Alcocer-Maldonado 2015). Es en estas láminas donde, por primera vez, se pone de manifiesto que el contenido cerebral no es homogéneo y tiene texturas diferentes, lo que se empezó a denominar, y aún subsiste el nombre, como sustancia blanca y sustancia gris. No obstante, sería necesario esperar 300 años, hasta que Virchow comienza la caracterización de los componentes de la glía.

2. LAS CÉLULAS GLIALES, CARACTERIZACIÓN HISTÓRICA.

La palabra glía se deriva del griego y se empleaba para denominar a alguna sustancia pegajosa, liga o pegamento. Fue Rudolf Virchow, patólogo alemán, quien en 1858 da esa denominación a la sustancia grasa y viscosa que parece llenar de manera continua todo el tejido cerebral y que mantiene a los elementos del sistema nervioso unidos. Años más tarde Camilo Golgi se interesa por la estructura de la glía y establece su naturaleza celular (1873, 1903). Otros muchos investigadores se interesan por la glía y describen, por su aspecto morfológico, una serie de subgrupos entre las células gliales. En 1891, Michael von Lenhossek define un subgrupo entre las células gliales a los que denomina astrocitos. En años posteriores, otros relevantes investigadores identificaron otros subgrupos de astrocitos y los clasificaron como astrocitos protoplásmicos y astrocitos fibrosos.

No obstante, sería Don Santiago Ramón y Cajal quien da el impulso definitivo al estudio y caracterización de los astrocitos al desarrollar la técnica de tinción con oro sublimado. La mezcla de tinción contiene una disolución de cloruro de oro y cloruro de mercurio, que puesto en contacto con los

cortes cerebrales precipita sobre los gliofilamentos del citoesqueleto celular. Los astrocitos y sus prolongaciones aparecen impregnados en color negro, el fondo se ve ligeramente marrón, a veces con una aureola purpura.

Los investigadores se preguntaron durante mucho tiempo cual era el fundamento de la especificidad del oro sublimado sobre las células de glía, ya que las neuronas no se tiñen y requieren la técnica de impregnación argéntica, técnica de Cajal, muy mejorada con respecto a la de Golgi. Sabemos hoy día que Cajal, sin proponérselo, consiguió una tinción específica sobre proteínas ácidas, que forman el citoesqueleto de los filamentos intermedios de las células de glía (Ramón y Cajal, 1913-a). De los grandes avances, no solo metodológicos, sino también conceptuales que introdujeron los estudios de Cajal sobre la glía haremos mención en sucesivos apartados (Navarrete and Araque, 2014).

Generalizando, las proteínas del citoesqueleto son específicas de los diferentes linajes celulares y sirven incluso para identificar el origen de las células en estudios tumorales. En la glía la proteína que forma los filamentos intermedios se denomina: *proteína fibrilar ácida de glía*, o por sus siglas en inglés (GFAP). En la actualidad esta proteína es el marcador más empleado para caracterizar las células de glía y estudiar la diferenciación de los precursores gliales en las etapas tempranas de la neurogénesis. Los anticuerpos contra la GFAP, son muy específicos y las tinciones acoplados a segundos anticuerpos fluorescentes permiten una visualización perfecta del entramado glial del cerebro en microscopia de fluorescencia clásica y confocal. En biología molecular, el promotor del gen de la GFAP, es un utensilio esencial para conocer la diferenciación y maduración de las células de glía en diferentes áreas cerebrales (Parpura, *et al.* 2012).

No podemos cerrar este apartado sin hacer mención a Don Pío del Río Hortega descubridor de los oligodendrocitos, OLGs, y también de la microglía (Del Río-Hortega, 1921). Don Pío se formó con Nicolás Achúcarro, con quien aprendió las técnicas de impregnación por metales en los cortes neurales y posteriormente se unió al laboratorio de Cajal. Estaba muy interesado en la neuropatología y fue un destacado profesional en la caracterización de los tumores cerebrales, neuroglioma y angioglioma. Estos últimos trabajos fueron finalizados en el exilio, primero en Oxford y posteriormente en Buenos Aires, tras la sangrante diáspora de la guerra civil española (Del Río-Hortega P., 1942). Una excelente revisión de su obra ha sido realizada recientemente por el grupo del profesor Carlos Matute (Pérez-Cerdá, *et al.* 2015), y otra por el grupo del Profesor Kettenmann del Centro Max Delbrück de Medicina Molecular de Berlin, quien en un excelente artículo define el

trabajo de Don Pío del Río Hortega como *The “Big-Bang” for Modern Glial Biology* (Sierra, *et al.* 2016).

2.1. Las células gliales: diversidad y funciones

Las neuronas y la glía, son las células a partir de las cuales formamos el sistema nervioso. Ambos tipos celulares comparten algunas características, como es la asimetría celular y además ambas se forman en el embrión a partir del neuroepitelio. En la actualidad clasificamos a las células gliales, bajo los siguientes criterios: localización, morfología y función.

En el Sistema Nervioso Central, SNC, se encuentra la glía central o macroglía, a la que pertenecen los astrocitos, oligodendrocitos y células ependimarias. Es a este grupo de células gliales a las que nos referiremos de modo preferente.

La microglía también se localiza en el Sistema Nervioso Central, pero no tiene el mismo origen embrionario. Solamente las mencionaremos en relación con las células de la glía central. Como hemos reseñado en el apartado anterior fue el histólogo español Pío del Río Hortega quien descubrió la microglía y le dio el nombre actual.

En el Sistema Nervioso Periférico, SNP, que contiene los ganglios y nervios, se encuentra la glía periférica en donde se localizan las células de Schwann, células capsulares y las células de Müller.

2.2. Los astrocitos generalidades

Los astrocitos son las células gliales más numerosas en el sistema nervioso central. Su número y tamaño está en relación con el desarrollo del encéfalo. Pertenecen al linaje neuroectodérmico y se derivan de la glía radial, que son las primeras que sirven como guía para la migración de los precursores tanto neurales como astrocitarios en las etapas tempranas del desarrollo del sistema nervioso. Los astrocitos rodean y protegen a las neuronas, controlando la osmoticidad del entorno, el aporte de nutrientes y factores de crecimiento, así como la retirada de productos de desecho originados durante el metabolismo neural o la actividad neurotransmisora. El número de astrocitos y su tamaño respecto a las neuronas varía ampliamente según el tipo de animal. En la mosca hay 10 neuronas por cada astrocito, en el cocodrilo la relación es 1 a 1 y en el humano hay entre 10 y 50 astrocitos por cada neurona. La

evidencia de que el cociente glía/neuronas varía uniformemente a través de las distintas estructuras de las especies de mamíferos que divergieron hace más de 90 millones de años, pone de manifiesto la excepcional importancia y lo fundamental que es, para la función cerebral, la interacción neurona glía (Herculano-Houzel, 2014).

Cajal, tenía su propia visión de la función de los astrocitos: “*Todo astrocito de la sustancia blanca o gris está provisto de un aparato chupador o pedículo perivascular. El aparato chupador constituye no sólo una disposición constante de los astrocitos de la sustancia blanca, sino uno de los factores neuróglícos más importantes de los centros. Semejante generalidad, junto con el hecho de que en los animales de pequeña talla (conejo, cobaya, etc.), y en los en curso de evolución (perro y gato de pocos días), el órgano chupador constituye la más espesa, y a veces la única expansión perceptible y bien coloreable del astrocito denotan que el susodicho apéndice debe desempeñar cometido fisiológico de primer orden.* Serían necesarios muchos años y todavía en proceso, a pesar de los avances tecnológicos, para comprender la función de los astrocitos en el entramado del tejido nervioso.

2.3. Astrocitos humanos versus astrocitos de roedores

Sorprende que entre los primeros dibujos de astrocitos con precisión y detalle, se encuentre uno correspondiente a una muestra humana. Es el que Cajal realizó de una muestra de la capa piramidal y el *stratum radiatum* del giro dentado del hipocampo de un hombre adulto del que se había extraído la muestra *postmortem*, tres horas después de fallecer. Esta precisión temporal, indica que Cajal era consciente de la fragilidad de las muestras y así asegurarse de su integridad (Ramón y Cajal, 1897; 1913-b; Navarrete and Araque, 2014).

Al introducir como modelo experimental el de los roedores, fundamentalmente ratones y ratas por su disponibilidad y fácil manejo, se dio por hecho que la complejidad del cerebro humano frente al de estos pequeños mamíferos era más en tamaño que en la morfología y propiedades de sus células. Sin duda las observaciones en estos modelos experimentales proporcionaron una serie de conocimientos, funcionales y de biología molecular y celular, que son esenciales para comprender los aspectos generales del funcionamiento de las células gliales. Sin embargo, retrasaron el enfoque para profundizar en la comprensión de la glía en humanos. Durante muchos años, y todavía hoy día, dividimos los astrocitos en dos grandes grupos: astrocitos, protoplásmicos y astrocitos fibrosos, considerando sus características y propiedades similares

y generalizables al resto de los mamíferos, como son los humanos y primates en general. La escasa disponibilidad y accesibilidad al tejido cerebral humano y la rápida alteración de las muestras cerebrales *postmortem* en lo que se refiere a estructuras necesariamente de gran definición y funcionales, retrasaron dar respuesta a una pregunta esencial: *¿Son los astrocitos de humanos y primates idénticos a los de los pequeños roedores?*

El grupo de la Dra. Maiken Nedergaard de la Facultad de Medicina de la Universidad de Rochester y Académica Extranjera de la RANF, trató de dar respuesta a la pregunta formulada sobre las analogías y diferencias entre los astrocitos de humanos, primates y roedores. Los resultados de su grupo fueron publicados en la prestigiosa revista *Journal of Neurosciences* en el año 2009 (Oberheim, *et al.* 2009). Todos los estudios fueron realizados con tejidos del córtex cerebral humano, redundantes de cirugías diversas, por lo tanto, recogidos en el propio quirófano en condiciones óptimas para el estudio anatómico y funcional.

Los astrocitos protoplásmicos del neocórtex humano comparados con los del ratón, tienen un diámetro mucho mayor, aproximadamente entre 2 y 3 veces y las ramificaciones o prolongaciones primarias suponen multiplicar por un factor de 10 a 20. Este hallazgo fue una auténtica sorpresa y, en buena lógica, era necesario proseguir el estudio con las analogías y diferencias en la respuesta funcional entre los astrocitos de origen humano y de roedores.

Estudios previos de otros grupos, como el del Dr. Kettenmann, en el Centro Max Delbrück de Medicina Molecular de Berlín, el del Dr. Verkhratsky en la Universidad de Manchester y el grupo de la Dra. Miras-Portugal en la Universidad Complutense de Madrid, habían identificado un amplio grupo de receptores en astrocitos que respondían originando un incremento en la señal de Ca^{2+} citosólico. Los dos primeros grupos trabajaron, sobre todo, en receptores glutamatérgicos (Verkhratsky, *et al.* 1988) y el nuestro de Madrid en cultivos primarios de astrocitos cerebelosos, tanto de rata como de ratón, donde estudiamos las respuestas con agonistas de distintos receptores purinérgicos de las familias P2Y y P2X (Jiménez, *et al.* 2000; Delicado, *et al.* 2005; Carrasquero, *et al.* 2005; 2009; 2010).

Con estos conocimientos previos, los investigadores eligieron la señal de calcio citosólico como respuesta a estímulos diversos para comparar las respuestas funcionales y su intensidad entre las poblaciones de astrocitos humanos y de ratón. De nuevo, desde una base común de respuesta, los astrocitos protoplásmicos preparados de los cortes quirúrgicos de cerebro humano, propagaban la onda de calcio, Ca^{2+} , con una velocidad cuatro veces mayor que los roedores, en respuesta a agonistas glutamatérgicos y purinérgicos,

presentando, además, una amplia variabilidad en la intensidad y especificidad de las respuestas a los diversos agonistas.

Otra sorpresa esperaba dentro de los astrocitos del neocórtex humano, ya que contiene una serie de sub-tipos de astrocitos anatómicamente diferentes a los que conocemos en roedores y con localizaciones precisas en las distintas capas de la corteza cerebral. Una nueva población de astrocitos de fibras largas localizado entre las capas 5-6, cuyas prolongaciones tienen varicosidades, que curiosamente se corresponden anatómicamente, con los ya descritos y dibujados por Cajal (1897, 1913-b). Otra nueva población o grupo son los denominados astrocitos interlaminares, con presencia abundante en las capas corticales superficiales y capaces de extender sus prolongaciones hasta las capas 3 y 4. Finalmente estaban los ya caracterizados en roedores que son los astrocitos fibrosos y son muy semejantes entre sí, con excepción del tamaño, ya que de nuevo los humanos tienen un diámetro mucho más grande.

¿Qué sucede en otros primates? El córtex del chimpancé, que es el primate más próximo desde el punto de vista evolutivo a los humanos, también contiene los cuatro tipos de astrocitos descubiertos en el humano, pero con menor complejidad, es decir con un tamaño y prolongaciones menores que el humano, pero mucho más complejo que el del ratón. De nuevo del humano, al chimpancé y a otros monos inferiores, como el Macaco Rhesus, disminuimos la complejidad, pero además este último, muestra solamente tres subtipos de astrocitos. Siguiendo esta tónica, en los roedores solamente se han identificado dos subtipos, los astrocitos fibrosos y los astrocitos protoplásmicos, que ya habían sido descritos en los primeros estudios sobre células de glía (Oberheim, *et al.* 2009; Nedergaard and Verkhratsky, 2012).

Esta característica exclusiva de los astrocitos del humano adulto, en su variedad, capacidad de respuesta y tamaño, plantea la posibilidad de que les permita conectar y envolver a un número mayor de neuronas en el córtex y ponerlas en sincronía y la pregunta obligada es, si esta hipótesis es cierta ¿Cuál es el significado y que ventajas supone la complejidad de la glía humana en el funcionamiento cerebral? Me permitiré citar texto a Ramón y Cajal con un extracto de su libro *Textura del Sistema Nervioso del Hombre y de los Vertebrados* (1899): “¿Qué significación funcional debemos otorgar a la neuroglía? Desgraciadamente, en el estado actual de la ciencia no es posible contestar a la importante pregunta más que mediante conjeturas más o menos racionales. En presencia de este problema, el fisiólogo se halla, por falta de métodos, totalmente desarmado”. Fueron necesarios los siguientes 80 años para desarrollar las técnicas de estudio que permitirían iniciar la respuesta a esta pregunta, planteada por Don Santiago Ramón y Cajal.

2.4. *Astroцитos: La sinapsis tripartita*

“El prejuicio de que las fibrillas neuróglícas son a las células nerviosas lo que los haces colágenos del tejido conectivo a los corpúsculos musculares o glandulares, es decir, una trama pasiva de mero relleno y de sostén (y cuando más, una ganga destinada a embeberse en jugos nutritivos), constituye sin duda el principal obstáculo que el observador necesita remover para formarse un concepto racional de la actividad de los corpúsculos neuróglícos” (Ramón y Cajal, 1899, Navarrete and Araque, 2014).

Hace poco más de 20 años, dos grupos de investigación de modo independiente publicaron sendos artículos con evidencias convincentes de que los astrocitos participaban activamente en la señalización a las neuronas y además estas células gliales tenían la capacidad de participar en el control de la función y comportamiento de los circuitos neurales. Este hallazgo era tan novedoso que el grupo de Maiken Nedergaard lo publica en la prestigiosa revista, *Science*, en marzo de 1994 y, tres meses más tarde, el grupo de Parpura lo publica en, la no menos prestigiosa revista, *Nature* en junio de 1994 (Nedergaard, 1994; Parpura, *et al.* 1994). Ambos artículos ponen de manifiesto que sí se inducía una señal de calcio en el astrocito, la neurona respondía con un mayor incremento de calcio citosólico y además que esa respuesta podía corresponderse con la liberación de glutamato por el astrocito. Este fue el comienzo de la idea de una sinapsis compartida, conocida como sinapsis tripartita, que se fue abriendo camino y ha permitido conocer con más detalle la complejidad funcional de la sinapsis.

La participación directa de los astrocitos sobre las estructuras sinápticas supondría uno de los mecanismos de control más eficientes en el funcionamiento sináptico, en donde la zona pre y post sináptica son los componentes neurales y la envuelta protectora corresponde al astrocito. Sabemos hoy día que la envuelta astrogliol perisináptica cubre la mayoría de las sinapsis del Sistema Nervioso Central. Se considera actualmente que la cubierta glial evolucionó como parte de la estructura sináptica, para su protección y sustento. No obstante, es necesario tener en cuenta que los elementos directamente responsables de la neurotransmisión, como son la maquinaria celular responsable de la liberación exocitótica regulada de los neurotransmisores, así como los receptores adecuados para la despolarización y respuesta rápida, se concentran sobre todo en las membranas pre y post-sinápticas. Mientras que, una gran cantidad de proteínas de membrana responsables de mantener la homeostasis de las sinapsis, como la limpieza del espacio de la hendidura sináptica y por lo tanto intrasináptico, mediante enzimas hidrolíticos y se-

cuestrando los restos de los neurotransmisores mediante transportadores, se sitúan en las membranas envolventes de las células gliales, cuya superficie es significativamente más amplia.

Las prolongaciones de los astrocitos que envuelven las sinapsis, han sido definidas por Verkhratsky y Nedergaard (2014) con un símil muy acertado y además de gran belleza, denominándolas: “*la cuna astrogial de la sinapsis*”. Esta estructura astrogial es la que está en el origen esencial de la sinaptogénesis. Este proceso supone una serie de etapas que van desde la protección inicial de la unión sináptica, su maduración y su aislamiento para mantener la estructura. Sin olvidar que posteriormente será esencial para remodelar la conectividad sináptica y para los procesos de plasticidad necesarios en la remodelación del sistema nervioso, además de nutrirlo.

En los humanos, el hecho de que los astrocitos puedan envolver, debido a su tamaño y número de prolongaciones, un mayor número de neuronas y sus zonas de conexión funcional sináptica, creemos es, sin duda, uno de los elementos esenciales que ha podido facilitar el incremento del tamaño cerebral y su organización.

En estos últimos años los artículos centrados en la sinapsis tripartita y su funcionamiento han cobrado protagonismo, con excelentes investigadores dedicados a esclarecer su funcionamiento. Entre estos, y en una época tan temprana con 1999, Alfonso Araque del Instituto Cajal de Madrid, en colaboración con Vladimir Parpura, publicaron un artículo que se considera como fundamental para establecer las coordenadas del área: *Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner*, (La sinapsis tripartita: la glía, la compañera no debidamente valorada). Este artículo citado más de 1.500 veces es uno de los referentes en investigación del área (Araque, *et al.* 1999; 2001). Un hito en estos trabajos lo ha supuesto el poder estudiar, mediante patch-clamp una sinapsis aislada del hipocampo y confirmar que los astrocitos potencian la liberación de neurotransmisores en esa sinapsis concreta (Perea and Araque 2007). Además de poder estudiar una sinapsis aislada, era importante poder demostrar que algunos circuitos cerebrales podrían estar controlados conjuntamente del mismo modo. La existencia de un circuito específico en donde la señalización entre astrocitos y neuronas se extienda a todo el entramado se demostró por vez primera en las vías de los ganglios basales, gracias al original trabajo del grupo de Alfonso Araque y resuelto por el investigador Ricardo Martín (Martín, *et al.* 2015). Demostrándose claramente que los astrocitos potencian la comunicación entre neuronas del mismo circuito. Estos estudios, como preveía Cajal, han sido posibles gracias al desarrollo de una tecnología muy sofisticada. Los estudios de respuestas en célula única

aislada, ya sea señal de Ca^{2+} , potencial de membrana, gracias a fluoróforos, o señales eléctricas por despolarización de membrana mediante electrofisiología. El acceso al estudio del funcionamiento del cerebro “*in vivo*” mediante la microscopia de excitación de dos fotones permite analizar *in vivo* hasta 1 milímetro de profundidad y otros métodos no invasivos como la imagen por resonancia magnética funcional permiten conocer el tipo de metabolismo y su distribución. Estas son entre otras muchas técnicas las que están permitiendo entender el funcionamiento dual neurona/glía de nuestro cerebro.

2.5. Los trasplantes de glía humana: ¿Una anécdota o una posibilidad?

Los descubrimientos del grupo de Nedergaard demostrando que los astrocitos humanos son más grandes y complejos que los de otros primates y sobre todo comparados con nuestros modelos por excelencia que son los roedores, las ratas y ratones de laboratorio, hicieron surgir todo tipo de hipótesis, que como todas, en ciencia, era necesario comprobar de modo experimental (Oberheim, *et al.* 2009). Desde el punto de vista científico era necesario responder al ¿por qué y para qué? de ese hecho experimental. Entre otras hipótesis estaba que el tamaño de los astrocitos permitió aumentar la complejidad del cerebro y era una consecuencia de su propia evolución.

En el año 2013 el grupo de Nedergaard realiza los primeros trasplantes de células de la glía humana a cerebro de roedores con resultados reproducibles. Estos resultados fueron publicados en la revista más prestigiosa y de mayor índice de impacto de área, *Cell Stem Cell* (Han, *et al.* 2013). El primer trasplante se realizó con células progenitoras de glía humana (GPCs), procedentes de un feto de 17-22 semanas de gestación, aisladas mediante la técnica de “cell sorting, activada magnéticamente” y se cultivaron para expandir su número (Han, *et al.* 2013). Las células humanas antes de ser trasplantadas se transfectaron con el gen de la proteína verde fluorescente —EGFP— para su localización inmediata sin necesidad de utilizar anticuerpos. Los ratones receptores eran neonatos inmunodeficientes, para evitar una destrucción de las células humanas trasplantadas. Los ratones al madurar eran animales quiméricos y fueron sacrificados a distintos tiempos para estudiar la evolución de las diversas células gliales, su localización y su funcionalidad. Los resultados fueron concluyentes, a los 4 o 5 meses después del trasplante los astrocitos humanos mostraron predilección por el hipocampo y las capas profundas corticales del cerebro de ratón; a los 12-20 meses los astrocitos humanos habían colonizado ya la amígdala, el

tálamo, el neocórtex y el córtex. No olvidemos que el máximo tiempo de vida de un ratón está en torno a los 20 meses. Todavía más notable, si cabe, era el hecho de que los astrocitos humanos mantenían su estructura que es más compleja que los de ratón y parecían desarrollarse de modo autónomo y maduro (Han, *et al.* 2013).

Desde el punto de vista funcional, los astrocitos del ratón quimérico, mantenían las características propias de cada origen y la progenia de los humanos. También, mantenían la mayor velocidad de la señal de Ca^{2+} , y las características de la plasticidad de la glía humana en la potenciación a largo plazo (LTP) en el hipocampo del ratón adulto. En cierto modo los astrocitos humanos incrementaban la transmisión sináptica excitadora del hipocampo de ratón, confiriéndoles propiedades similares a los obtenidos en estudios con muestras humanas procedentes directamente de tejido redundante de quirófano (Parpura and Verkhratsky, 2012).

El éxito de los trasplantes de glía humana al ratón, fue sin duda una hazaña tecnológica, pero detrás de una poderosa tecnología vienen las consideraciones de su significado fisiológico y su posible utilidad.

Como el hipocampo de ratón quimérico tiene características humanas en lo que concierne a la potenciación a largo plazo-LTP, la primera pregunta obligatoria era: ¿si los ratones quiméricos humanizados incrementaban sus habilidades de aprendizaje y memoria? La respuesta fue muy significativa en los test de reconocimiento y localización de objetos, orientación en el laberinto y evitar los peligros asociados a señales. El modelo se abrió a otros planteamientos para estudiar aspectos patológicos de la glía en cerebro humano y su posible reparación.

El hecho de que los trasplantes de glía humana a ratón fueran posibles y que además estos animales quiméricos mejoraran su capacidad de memoria y aprendizaje, sin que las neuronas se vieran modificadas, confirmó el papel esencial jugado por la glía en el mantenimiento sináptico.

No puedo evitar acudir a los recuerdos de infancia, cuando la imaginación nos llevaba al mundo fascinante de los animales con los que podíamos hablar. Estamos ahora técnicamente entrando en el mundo de las quimeras y casi, sin darnos cuenta, pensamos en hacer realidad la ficción del Ratoncito Pérez de nuestra infancia. Animal listísimo y entrañable que recompensaba la pérdida de nuestros dientes de leche con algún regalo. Pero esta técnica, sin olvidar las fábulas, es real y permite muchos más avances en la comprensión del cerebro, como demostró el grupo de Steven Goldman (Windrem, *et al.* 2014).

2.6. *Los oligodendrocitos: mielinización del sistema nervioso central y aprendizaje*

Los oligodendrocitos proceden de células neuroepiteliales progenitoras, y su tamaño es más pequeño que el de los astrocitos. En el apartado 3.1. analizaremos de modo específico las etapas de diferenciación de la progenie neuroepitelial y la diversificación de neuronas y glía. En los estados iniciales migran como oligodendrocitos inmaduros hasta alcanzar los tractos fibrosos. La maduración de los oligodendrocitos implica el desarrollo de sus prolongaciones para envolver los haces de fibras del sistema nervioso central, formando la vaina de mielina. Proceso que se puede considerar equivalente en función al de las células de Schwann en la mielinización del sistema nervioso periférico.

Los oligodendrocitos asociados con los haces nerviosos secretan componentes de la matriz extracelular, para madurar y formar la vaina espesa de mielina capaz de envolver el axón con múltiples capas, hasta 150 en algunos casos. La mielina es esencial para que los impulsos eléctricos sean transmitidos a alta velocidad y sus alteraciones redundan en problemas de la conducción de señales en las vías nerviosas centrales. La mielina es además la que da la textura y el nombre a la sustancia blanca del cerebro. Mutaciones en las proteínas de las membranas de los oligodendrocitos dan lugar a mielinizaciones incompletas y alteraciones del SNC. Existen casos de actividad autoinmune contra los componentes de membrana de los oligodendrocitos, y se relacionan con la aparición de brotes de la esclerosis múltiple. Uno de los investigadores españoles con mayor dedicación al estudio de la esclerosis múltiple es el profesor Carlos Matute de la Universidad del País Vasco. Junto con su grupo han tratado de establecer la conexión entre la muerte excitotóxica de los oligodendrocitos y las enfermedades desmielinizantes, entre los causantes ha señalado al receptor P2X7 como uno de los posibles actores y sugerido el bloqueo de este receptor para evitar la excitotoxicidad del ATP sobre estos receptores en situaciones de inflamación y en las lesiones isquémicas sobre los oligodendrocitos (Matute, *et al.* 2001; 2007; Domercq, *et al.* 2010). Los receptores P2X7, habían sido propuestos por nuestro grupo como diana preferente en el tratamiento de Alzheimer y en las epilepsias inducidas y traumáticas (Díaz-Hernández, *et al.* 2012; Engel, *et al.* 2012).

La mielinización de los axones en el cerebro humano es lenta y suele finalizar hacia la década de los treinta (Stephen *et al.* 2001). La última zona que se mieliniza es el córtex cerebral. Hasta ahora lo más estudiado con el aprendizaje era el número de sinapsis y conexiones del córtex, pero las imágenes de resonancia magnética funcional, muestran que las zonas mielinizadas

incrementan su tamaño, ya que las conexiones funcionales se incrementan y se envía la información a otras áreas cerebrales. En un magnífico artículo, el grupo del Profesor Manuel Carreiras del Centro de Conocimiento y Lenguaje de San Sebastián, ha demostrado mediante técnicas no invasivas (MRI) que el aprendizaje de la lectura implica un desarrollo ontogénico del cerebro con incremento de las conexiones entre los lóbulos temporal y occipital, que se corresponde con el reconocimiento de las letras que es visual, y la asociación al sonido de las palabras, toda una proeza (Ullen 2009; Scholtz, *et al.* 2009; Carreiras, *et al.* 2009; Fields, 210).

Siempre hemos escuchado que el sueño reparador ayuda a la consolidación de la memoria y son muchas las teorías expuestas. Los defensores de los oligodendrocitos y las conexiones cerebrales, han aportado una razón más, que reside en el hecho de que durante el sueño es cuando se incrementa la expresión de los genes que controlan el desarrollo de los oligodendrocitos y su capacidad mielinizante. Seguramente no es la razón última y exclusiva, pero es una de las que se necesita para el resultado final (Cirelli, *et al.* 2004).

Una pregunta obligada es ¿cómo perciben los oligodendrocitos que los axones que envuelven están activos? El estudio de este apartado ha merecido especial atención por parte del Dr. R. Douglas Fields del Instituto de Desarrollo Humano y Salud Infantil de los Institutos de la Salud de Estados Unidos, NIH. Por el momento se han identificado algunos mecanismos, entre ellos, que la estimulación eléctrica de los axones “*in vitro*” induce la formación de mielina. Se requieren frecuencias específicas de estimulación, para que las proteínas de adhesión celular, L1 CAM de los axones no mielinizados se asocien con las membranas de los oligodendrocitos. Para nuestro grupo, es especialmente importante que la activación de los axones que transmiten la señal eléctrica en el SNC, liberan el neurotransmisor, adenosina trifosfato, ATP, que a su vez activa receptores de las células gliales, liberando factores de crecimiento, entre ellos la citoquina denominada factor inhibidor de la leucemia. Esta citoquina mantiene y estimula la mielinización de los oligodendrocitos ya asociados con los axones y por lo tanto maduros. Al mismo tiempo los ecto-enzimas, ecto-nucleotidasas, que hidrolizan el ATP, de los que existen diversas familias destruyen el nucleotido liberado y producen fosfato inorgánico y adenosina, que promueve la diferenciación de los precursores de oligodendrocitos hacia sus formas maduras mielinizantes (Stevens, *et al.*, 1988; 2002; Fields and Ni, 2010; Fields 2010).

Sea cual sea el mecanismo que induce una mayor mielinización de los nervios debidos al aprendizaje y el entrenamiento repetitivo, por ejemplo, de los pianistas, es necesario recordar que hay épocas más favorables para la

proliferación de los oligodendrocitos y el incremento visible del cuerpo calloso que conecta los hemisferios y las regiones cerebrales. En los humanos la habilidad para formar nuevos oligodendrocitos disminuye con la edad (Back, *et al.* 2001). Esto se correlaciona con el declive del aprendizaje en los humanos y la disminución del volumen del cuerpo calloso a partir de los 50 años.

La capacidad de conexión entre partes del cerebro y la función asociativa, se ha tratado de relacionar con la inteligencia y como no podía ser de otro modo, el cerebro de Einstein es uno al que hacer referencia. Estos estudios son todavía posibles, ya que una hora y media después de su fallecimiento, se perfundió con líquido de fijación a través de la carótida y el cerebro se extrajo posteriormente. Se hicieron múltiples fotografías del cerebro completo, desde todos los ángulos, para así definir bien el tamaño y circunvoluciones de los diferentes lóbulos. Posteriormente, se procedió a seccionarlo en los dos hemisferios longitudinalmente dejando visible el cuerpo calloso y su grosor. Finalmente se troceó en pequeños cubos, en los cuales se estudiaron las conexiones sinápticas, su número, tamaño y subtipos, mediante tinciones varias para microscopía. Recientemente basándose en las fotos, el grupo de Weiwei Men del laboratorio de resonancia magnética de Shanghai, China (Men, *et al.* 2014) analiza el cuerpo calloso del cerebro de Einstein en comparación con el de personas ancianas de su edad y otros 52 jóvenes varones sanos. Sus resultados confirman que a lo largo de todo el cuerpo calloso el grosor es mayor en el cerebro de Einstein que en el de los de su misma edad e incluso en algunas zonas cuando se compara con el de los jóvenes. Como conclusión discuten que uno de los aspectos de la gran inteligencia de Einstein se debió a su gran capacidad de conectar las estructuras corticales en intensidad y velocidad, no a su tamaño, pues estaba en el valor medio de su edad.

2.7. Los trasplantes de glía, oligodendrocitos, y el estudio de desórdenes neurológicos asociados a la mielina

La importancia de las células madre de glía para el estudio y remediación de desórdenes neurológicos, había sido propuesto por el grupo de Steven Goldman, tanto para el tratamiento de desórdenes pediátricos de la mielina, como para establecer modelos racionales basados en el tratamiento con células madre gliales (Goldman, *et al.* 2008, 20012). Los trasplantes de glía permitieron el estudio de una gran variedad de desórdenes neurológicos, ya que las células progenitoras de glía podían diferenciarse a otros tipos gliales como

los oligodendrocitos, de menor tamaño que envuelven los haces nerviosos en el sistema nervioso central. Los primeros estudios hicieron hincapié en la generación de nuevos astrocitos de procedencia humana (Han, *et al.* 2013). Pero las células gliales progenitoras podían diferenciarse a otros subtipos gliales y para demostrarlo, tomaron como modelo el ratón “*shiverer*”, (ratón temblón, o ratón tiritón), que sufre una mutación genética en la proteína de membrana de la vaina de mielina, conocida como Proteína Básica de la Mielina, MBP, e impide a los oligodendrocitos aislar de modo conveniente los axones del sistema nervioso central.

Como anécdota personal, destacar que, en el año 1973, realizando mi Tesis Doctoral en Estrasburgo (Francia), existía un grupo dedicado al estudio de la epilepsia, que disponía de un gran número de modelos animales. Todos los investigadores estábamos interesados en comprender los procesos que los llevaban a sus crisis que eran muy elusivas en aquel momento. Por aquel entonces no se conocían los genes que estaban dañados, ya que la tecnología no estaba desarrollada, y los diferentes modelos procedían de animalarios en donde surgía una mutación espontánea, con síntomas convulsivos asimilables a las crisis epilépticas. Entre los muchos modelos de ratones que sufrían crisis estaban los *shiverer*, difícilísimos de mantener y que morían muy pronto, por lo que su elección para realizar los trasplantes de glía humana sana, me parecieron muy acertados ya que permiten discernir con claridad su eficacia.

El grupo de Steven Goldman realizó un trasplante de progenitores gliales humanos sanos a los ratones neonatos temblones (*shiverer*) y demostró que la diferenciación de las células madre gliales humanas está influenciada por el ambiente del huésped y en este caso muchas más células se diferenciaron a oligodendrocitos para compensar la hipo-mielinización del ratón receptor (Windrem, *et al.* 2014). El artículo publicado en el Journal of Neuroscience a finales de 2014, demuestra que al cabo de un año los oligodendrocitos humanos habían sustituido completamente a los dañados del ratón temblón y que habían cesado en plenamente los temblores continuados del animal, alargando además su vida. Steven Goldman era consciente de que son muchas las mutaciones humanas que causan problemas en la mielinización, cuyos genes son conocidos y que, si creamos los diferentes ratones genéticamente modificados, nos pueden dar datos de gran relevancia para su tratamiento o reparación. En una excelente revisión de este tema Goldman (Goldman, *et al.* 2015), analiza las perspectivas futuras en el ámbito de la enfermedad y los mecanismos del conocimiento, mediante el empleo de animales quiméricos, en lo referente a la glía.

Las inmensas perspectivas que se abren a la reimplantación de los propios precursores de oligodendrocitos, una vez corregidos, con la tecnología CRISP de edición genómica, es algo que no pasa desapercibido a los clínicos investigadores y son muchos los trabajos iniciados en el campo de las aplicaciones en neurociencia. Estos utensilios moleculares sin duda permitirán un avance en la frontera de la neurociencia básica y translacional, entre ellos la edición de células madre diferenciadas y corregidas para cada tejido específico, y en el caso que nos atañe, la sustitución de los diferentes subtipos de glía patológicos de un individuo, por los del mismo individuo, pero ya corregidos (Heindenreich and Zang, 2016).

3. DESARROLLO DEL CEREBRO: NICHOS NEUROGÉNICOS Y PROGENITORES NEUROGLIALES

En los epígrafes anteriores hemos introducido el concepto de células precursoras, sobre todo las precursoras de los distintos tipos gliales, para su empleo en trasplantes y conocer su evolución en un entorno cerebral diferente. Hemos constatado la gran importancia de las células de glía humana y su capacidad de mantener las características morfológicas y de robustez funcional. Añadiendo, además, el aspecto más característico, que son células competitivas e invasivas y reemplazan a las originales de la especie en cuyo cerebro han sido trasplantadas, generalmente ratones o ratas como modelo. Por ese motivo, el conocimiento del origen a partir de sus células precursoras y su diferenciación precisa es indispensable para crear ratones “humanizados” que nos sirvan de modelo en las patologías humanas.

De nuevo estamos cometiendo el error de pensar que los oligodendrocitos son todos iguales en el cerebro de un determinado mamífero, pero la naturaleza siempre nos demuestra que es mucho más compleja de lo que imaginamos y que por esa razón no se puede dar nada por sentado. Este es el caso de los oligodendrocitos, de los cuales la Dra. Götz ha puesto de manifiesto que su trasplante revela grandes diferencias en la maduración según cual sea la zona de donde son obtenidos. (Viganó, *et al.* 2013).

Comprender como se forman los progenitores neurogliales implica conocer cómo se desarrolla el sistema nervioso de los vertebrados, sobre todo de los mamíferos y que factores transcripcionales se activan en cada etapa, hasta llegar al individuo adulto. Teniendo en cuenta que una vez en la etapa adulta existen nichos neurogénicos que permanecen todavía activos y capaces

de proliferar y diferenciarse, la cuestión es si los factores que lo impulsan son los mismos requeridos para el cerebro en desarrollo.

3.1. Factores que inducen la formación y diferenciación del sistema nervioso

“The brain is the most complex organ in our bodies. It is made up of close to a trillion nerve cells (or neurons), each of which makes connections with, on average, hundreds of other nerve cells, to form the complex neuronal circuits that control all brain activities, including perception, emotion, the control of movement, and consciousness.

Remarkably, this pattern of connections among nerve cells is highly precise, and arises during embryonic and fetal development through the actions of specific molecules that control the formation of these connections. Defects in this process can lead to brain miswiring, which may result in neurological or psychiatric disorders” (Marc Tessier-Lavigne, 2007, Presidente de la Universidad de Stanford).

El sistema nervioso de los vertebrados se desarrolla a partir del ectodermo, que es la capa más externa del embrión. Una vez que se forma la placa neural, se invagina formando un canalículo y posteriormente se cierra formando el tubo neural.

Las células del ectodermo quedan tapizando el interior del tubo, y se van a diferenciar en el eje rostro-caudal para dar lugar a todas las estructuras cerebrales, con sus células específicas. En el estadio de desarrollo con cinco vesículas, podemos visualizar ya claramente lo que van a ser los ventrículos laterales con el telencéfalo; el tercer ventrículo con las prolongaciones retinianas; el mesencéfalo con la estructura del acueducto; el cuarto ventrículo con el metencéfalo que va a dar lugar al puente y al cerebelo y finalmente la medula con el canal central. Para construir el neocortex de los mamíferos es necesario una gran batería de factores intrínsecos que poco a poco se fueron elucidando, de los cuales veremos sus características en los párrafos siguientes (Job and Tan, 2003). En nuestro país, contamos con un gran anatomista, el profesor y catedrático de Anatomía de la Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia, el Dr. Luis Puelles, quien ha estudiado la distribución de los genes marcadores Hox y otros para diferenciar no solamente las áreas, sino también como se establecen las migraciones celulares en el embrión que permiten explicar la formación de los distintos núcleos y sus conexiones, cuya evolución se corresponde con el modelo prosomérico. Ha sido gracias a su tenacidad que conocemos con pre-

cisión como se forma el cerebro en el embrión, su evolución durante la etapa fetal y como alcanza la funcionalidad al nacimiento y tiempo en el entorno (Puellas and Rubenstein, 1993; 2003; Rubenstein, *et al.* 1994).

Con el avance en el conocimiento del desarrollo del sistema nervioso central ha surgido también una cierta confusión terminológica dependiendo del origen y escuelas de los investigadores. Por ese motivo se formó un grupo de trabajo con 7 neuroanatomistas reconocidos mundialmente, bajo el auspicio de la “*International Federation of Associations of Anatomists*” (IFAA), que en septiembre de 2016 presentaron sus conclusiones. En ese grupo de trabajo y como referente mundial estaba el Profesor Luis Puellas. El trabajo se ha publicado en *Clinical Anatomy* en noviembre de 2016 (Donkelaar, *et al.* 2016) y lleva por título “*Towards a Terminologia Neuroanatomica*” (Donkelaar, *et al.* 2016).

El desarrollo de las estructuras embrionarias del tubo neural requiere de la expresión de genes específicos y un programa epigenético de cada tiempo y lugar que controlan además los factores de transcripción conocidos como la familia de los homeoboxes (Liu, *et al.* 2015). En la zona rostral, donde estará el futuro cerebro, expresan el factor de transcripción *Otx2*, mientras que, en la parte caudal, donde estará la medula espinal, es el factor de transcripción *Gbx2* el que se expresa. Estos factores de transcripción controlan de modo opuesto el factor *Wnt* y su cascada de señalización que son de los más activos en la regulación de la diferenciación de los progenitores neurales corticales (Munji, *et al.* 2011). La zona donde se expresa *Otx2*, produce entre otras las neuronas dopaminérgicas, mientras que la zona caudal que expresa *Gbx2* induce la aparición de las neuronas serotoninérgicas. Cada una de las zonas bajo la influencia de un determinado homeobox, tiene asociadas diferentes enfermedades. En el caso del homeobox *Otx2*, las mutaciones heterocigóticas en humanos, ya que las homocigóticas no son viables, se han asociado con malformaciones oculares severas y disfunciones pituitarias. Incluso una mutación del gen *Otx2* ha sido clasificada como oncogén, en los tumores conocidos como meduloblastoma (Beby and Lamonerie, 2013).

La posición rostrocaudal es uno de los factores determinantes para la especialización de los subtipos de neuronas, que a su vez se corresponden con homeodominios, cada uno dependiendo de los niveles de los factores de transcripción *Hox*. La expresión de estos genes resulta en la formación de un sistema nervioso segmentado. La segmentación del desarrollo del cuerpo y del sistema nervioso se descubrió en los insectos en la década de los 80 del pasado siglo, y hoy día sabemos que es generalizable a todos los animales, por supuesto incluyendo a los mamíferos, de los que los humanos formamos parte. El genoma de los mamíferos contiene 39 *Hox* genes, to-

dos ellos derivados de un antepasado común. Recientemente el grupo del Profesor Gómez-Skarmeta, del Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, ha hecho una contribución magistral al conocimiento de los homeoboxes y su evolución funcional. El trabajo demuestra que la región del genoma que contiene los genes HOX, que son necesarios para formar las estructuras desde el cerebro a las extremidades, ha sufrido un cambio en su estructura tridimensional en la transición de invertebrados a vertebrados y ese cambio ha sido indispensable para el desarrollo de las extremidades durante la evolución (Acemel, *et al.* 2016).

La regulación de la migración neural y sus posibles anomalías comienzan a coger relevancia en los casos de autismo, considerándose como un grupo de enfermedades con un alto grado de heredabilidad, aunque difíciles de estudiar y definir, ya que dependen del momento y el lugar en que los factores transcripcionales responsables de la anomalía comienzan su actividad (Reiner, *et al.* 2016).

Entre los muchos factores de transcripción que son esenciales para definir el patrón rostrocaudal del córtex se encuentra el Pax6. Este fue uno de los primeros grandes hallazgos de la doctora Magdalena Götz, Académica Extranjera de la RANF, que es una de las investigadoras más relevantes trabajando en este factor y entre otros muchos hallazgos descubrió, junto con su grupo, que la expresión de Pax6 es capaz de impedir o restringir la migración de células neurales entre el córtex y los ganglios basales en la etapa de desarrollo (Chapouton, *et al.* 1999).

No obstante, hay un artículo que para nosotros tiene especial significado, ya que este discurso está orientado hacia las células de glía. El descubrimiento que fue crucial y muy temprano, 1998, es el primero que hace referencia al descubrimiento de que el gen Pax6 controla la diferenciación de la glía radial en el córtex cerebral (Götz, *et al.* 1988).

Con la glía radial estamos entrando en la respuesta a ¿cómo se realiza físicamente la organización del cerebro? y ¿cómo unas células neurogliales en origen van a producir toda la diversidad de neuronas y glía?, ya que ambas tienen un origen común.

3.2. La glía radial: El andamiaje del cerebro en el origen de las células neurogliales y su migración

Toda la corteza del sistema nervioso central, durante el desarrollo, está tapizada por unas células bipolares, que se comportan como células progenitoras y son capaces de generar neuronas, astrocitos y oligodendrocitos.

Además, la glía radial forma el andamiaje que permite la migración de las células hacia el interior de las estructuras cerebrales.

Histológicamente Golgi las describe y Cajal precisa que se parecen más a la glía que a las neuronas. Para nosotros es esencial que las humanas y de ratón presenten el marcador típico de glía, la proteína ácida fibrilar de glía, GFAP, y por lo tanto se caracterizan fácilmente en inmunohistoquímica con el anticuerpo fluorescente específico.

Uno de los investigadores que más aportaciones ha hecho al conocimiento de la glía radial es Magdalena Götz, a quien ya hemos citado en el epígrafe anterior. En su laboratorio se identificaron los marcadores de la glía radial que la situaban a medio camino entre glía y neuronas, y la tecnología por “cell sorting” que permitió separar los linajes de los progenitores neurales. Identificando además del Pax6, los factores de transcripción Neurogenina y Reelina, este último implicado en la maduración de la glía radial. Su artículo titulado “*Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glial fate.// Progenie neuronal o glial: diferencias regionales en el destino de la glía radial*” deja claramente establecido el papel generador de neuronas y glía, de la glía radial, y su importancia en el desarrollo cerebral. (Malatesta, *et al.* 2003; Götz, 2003).

La constatación de que las células de la glía radial pueden generar una amplia diversidad de células neurales incluidas las neuronas y astrocitos, junto con el desarrollo de nuevas tecnologías cambiaron la perspectiva de los modelos de generación de la diversidad de células neurales y el establecimiento de un nuevo paradigma en el desarrollo del sistema nervioso. Las células madre pluripotentes derivadas de la glía radial son intermediarios estables que pueden generar eficientemente los oligodendrocitos en humanos (Gorris, *et al.* 2015).

Durante la evolución de los mamíferos, las regiones cerebrales se adaptaron de modo dinámico mediante crecimiento selectivo y expansión que ha resultado específico de cada especie. Un ejemplo muy llamativo es el del neocórtex humano, con giros profundos y circunvoluciones que han permitido aumentar, en gran medida, el número de neuronas corticales en prácticamente todas las áreas cerebrales. La forma del cerebro humano es el resultado de una etapa de formación de giros que comienza a mitad de la gestación. Antes del sexto mes de desarrollo fetal la superficie cerebral es lisa. Los primeros surcos, aparecen durante el sexto mes y se alargan y ramifican hasta formar el patrón de giros y surcos que tenemos al nacer, aunque después del nacimiento todavía se forman algunos más. Estos plegamientos o circunvoluciones y giros implican un incremento de la extensión de la superficie

externa, el córtex, y el modo más conveniente de plegarla para que se adapte a la forma craneal. Esa expansión tangencial del córtex ha recibido mucha atención, tanto desde el punto de vista de la física, como de la neurobiología y han planteado numerosas preguntas (Tallinen, *et al.* 2016).

¿Cuáles son los mecanismos celulares y moleculares para incrementar los plegamientos del córtex en los mamíferos? Esta es la primera pregunta que necesitamos responder, pero no es la única. En efecto, sabemos que para hacer presión y plegar vamos a necesitar más células neurogliales y la pregunta es ¿si está involucrada la glía radial?

La respuesta, a las preguntas anteriormente formuladas, ha sido obtenida al identificar los genes que regulan la mayor o menor expansión del córtex cerebral de los mamíferos y sus plegamientos, demostrándose que estos plegamientos están bajo el control de la glía radial a través de un gen conocido como *Trnp1*, que produce una proteína asociada al DNA y cuyos niveles controlan el número de progenitores de la glía radial y la posterior expansión tangencial que da lugar a las circunvoluciones, giros y plegamientos del córtex. En animales genéticamente modificados con este gen bloqueado (*knockdown*) los cerebros carecen de giros y la superficie del cerebro es lisa. Como era previsible, en humanos los niveles de *Trnp1* son más altos que en el resto de los mamíferos estudiados (Sthahl, *et al.* 2013; Nonaka-Kinoshita, *et al.* 2013).

Puesto de manifiesto la importancia de la glía radial, necesitamos comprender en profundidad los pasos que llevan a su diferenciación para producir los linajes neurales y gliales. Por añadidura, debemos de profundizar entre el posible paralelismo, o las diferencias, si existen, entre la diferenciación, o neurogénesis en el cerebro en formación, y la correspondiente a las zonas neurogénicas del cerebro adulto. Pero antes haremos una pequeña parada en el virus del Zika pues puede darnos pistas de cómo alterar la formación del cerebro incidiendo sobre la glía radial.

3.3. Virus del Zika y la glía radial

Hemos visto que la glía radial es esencial para formar el córtex cerebral, y origina los progenitores primarios de neuronas y glía que posteriormente migrarán gracias a su andamiaje hasta los lugares adecuados. Por ello es lógico pensar que defectos en su función pueden alterar el desarrollo del cerebro, como hemos visto en el epígrafe anterior. Las causas de la lisencefalia, carencia de giros y aspecto liso del córtex, pueden tener muy diverso

origen: alteraciones genéticas, el gen *Lis1*, *Ndel* y otros posibles en el cromosoma X, 7 y 17. Además, las infecciones virales en el feto en etapas iniciales del desarrollo, o falta de aporte nutricional, con escasa sangre en el cerebro, también pueden originar la microcefalia y ausencia de circunvoluciones o giros.

Las infecciones por el virus del Zika y su relación con el nacimiento de niños con microcefalia, ha desencadenado una alarma mundial. Al mismo tiempo ha hecho plantearse, a los investigadores en biomedicina, la necesidad de estudiar en profundidad el problema para poder explicar el mecanismo de acción del virus y que vías de señalización utiliza para disminuir de modo tan drástico la producción de células neurogliales que resulta en la reducción del tamaño cerebral.

Es necesario destacar que después de una infección viral, sea cual sea el virus, activamos un mecanismo de respuesta inmune innata generalizado, en donde el interferón juega un papel relevante. Estos virus son reconocidos de modo poco específico, por un grupo de receptores que llevan a la activación de la *TANK-binding kinase 1* (TBK1). Este enzima es capaz de autofosforilarse, mediante trans-autofosforilación. Una vez fosforilada la TBK1 induce la expresión del interferón tipo I, a través de la fosforilación del factor de transcripción IRF3. En adultos este mecanismo de defensa es innato y muy corriente para muchos grupos de virus y no supone un grave riesgo, ¿pero, por qué en la infección con el virus del Zika el resultado es tan diferente en las etapas fetales?

El grupo del profesor Sestan en la Universidad de Yale, ha descubierto el mecanismo de actuación del virus del Zika y lo detalla con precisión en un reciente y brillante trabajo (Onorati, *et al.* septiembre de 2016). Estos autores mediante cultivos de células progenitoras neurales y de sus homólogas fetales, las células de la glía radial, a las que han infectado con el virus del Zika, han encontrado que este virus infecta las células progenitoras del neuroepitelio, NES, y también la glía radial, alterando la mitosis y como resultado la duplicación y supervivencia de las células infectadas. El mecanismo molecular implica que las células neurales progenitoras y las de la glía radial en contacto con el virus del Zika sufren una depleción centrosomal ya que se produce un secuestro mitocondrial de la proteína TBK1-fosforilada durante la mitosis. Cuando se produce la infección viral la proteína TBK1-fosforilada se emplea fundamentalmente en fosforilar el factor de transcripción IRF3, que es esencial para activar la transcripción de proteínas necesarias para la respuesta inmune innata en el núcleo. Entre las proteínas inducibles está la del interferón que participa en la defensa

antivírica inespecífica. En adultos, este efecto es generalmente beneficioso, pero en el cerebro en desarrollo del feto de pocas semanas, la duplicación del DNA de la célula previa a la mitosis no puede organizarse correctamente para dar lugar a una mitosis completa, ya que el centrosoma no está fosforilado e impide la migración de las cromátidas hijas hacia cada polo de la célula. El resultado final es de todos conocido, menos células y menos desarrollo del córtex cerebral (Lui, *et al.* 2011; Liu, *et al.* 2015; Li, *et al.* 2016; Onorati, *et al.* 2016).

Una nueva tecnología para aproximarse al estudio del virus del Zika es mediante el empleo de organoides que asemejan la estructura del cerebro, conocidos como “*minibrains*”. Los resultados infectando los organoides en desarrollo con la cepa Africana o Asiática del virus del Zika, ha proporcionado el mismo patrón en el modelo de organogénesis in vitro. En ambos casos, se reduce notablemente la proliferación de las células madre pluripotentes, lo que resulta en unos organoides de tamaño reducido y asimilable a la microcefalia. El estudio es potencialmente muy importante desde el conocimiento básico del desarrollo cerebral, pero sobre todo para el estudio de fármacos que se puedan utilizar en tratamientos tras la infección (Quian, *et al.* 2016).

3.4. *Generación de neuronas y glía y su regulación durante el desarrollo embrionario*

En los primeros estudios histológicos del desarrollo del sistema nervioso realizados por Cajal, llama poderosamente la atención su descripción de las células germinales y cómo evolucionan. En el Capítulo XLVII, del libro titulado *Textura del Sistema Nervioso del Hombre y los Vertebrados*, que está dedicado a la Histogénesis de la corteza cerebral, se puede observar en la figura 855 un corte de la corteza fetal humana con sus células progenitoras y la organización rudimentaria de la glía radial. Sería difícil hoy día poder realizar los mismos estudios de desarrollo del cerebro en humanos. En su defecto, los estudios en ratón nos han aportado datos muy valiosos y estructurados del desarrollo del sistema nervioso en mamíferos.

En las etapas tempranas del desarrollo, las células progenitoras se sitúan en la zona ventricular del tubo neural y proliferan rápidamente. Estas células podrían ser asimiladas a lo que llamamos células madre, con capacidad de dividirse para auto renovarse, u otro tipo de división que va a dar lugar a las progenies neural y glial mediante diferenciación. Esta proliferación celular procede mediante divisiones que se realizan de modo pautado e influenciado

por los factores de crecimiento del entorno y de los factores de transcripción que se expresan en cada zona del túbulo neural.

Morfológicamente la glía radial es el primer tipo celular que adquiere identidad propia y diferenciable dentro del primigenio epitelio neural. Sus cuerpos celulares están localizados en la zona ventricular y emiten una larga prolongación que alcanza la superficie pial, o zona externa del túbulo neural. De este modo conecta el interior de los ventrículos con las membranas externas piales. La idea de que la glía radial tenía una simple función de guía o andamiaje para que las neuronas generadas migraran hacia zonas más externas, se ha enriquecido y vuelto más compleja. En efecto, la glía radial es capaz de dividirse simétricamente y mantener su tipo celular y asimétricamente, dando lugar a la mayor parte de las neuronas y astrocitos, por lo tanto, puede generar neuronas postmitóticas y astrocitos. Es importante dejar claro que en la etapa adulta del cerebro puede servir como progenitora de neuronas y oligodendrocitos. Estos estudios se realizaron con células marcadas con virus fluorescentes que permitían estudiar las progenies específicas (Namba, *et al.* 2005).

Es importante recordar que las células endimarias, de donde se diferencia la glía radial, revisten los ventrículos del encéfalo y del conducto endimario de la médula espinal que contiene el líquido cefalorraquídeo LCR. Una variante de las células endimarias son los tanicitos que están en contacto con el líquido del tercer ventrículo y el sistema porta hipofisario.

El hecho de que la glía radial fuera capaz de diferenciarse a neuronas y astrocitos, plantea saber cómo lo consigue: ¿Cuáles son las señales externas y que factores de transcripción necesita activar? Los estudios en la mosca del vinagre, *Drosophila*, demostraron la necesidad de los receptores Notch y Delta, que han sido conservados en los tejidos neurales de vertebrados (Mehler, 2002).

En mamíferos, la activación de Notch y su señalización impulsa la formación de la glía radial, facilitando la expresión de diversos factores de transcripción. Entre estos se encuentran Hes1 y Hes5, que mantienen el fenotipo de glía radial. En una etapa posterior Notch induce la expresión del factor de transcripción STAT3, que recluta entre otros a una serina treonina quinasa, la JAK2, controlando la expresión de los genes específicos de astrocitos, y en general de glía, como la proteína fibrilar ácida de glía, la GFAP, así como la producción de factores de crecimiento y componentes de la matriz extracelular (Pollen, *et al.* 2015).

La diversificación a oligodendrocitos requiere la señalización mediada por Notch y además de dos factores conocidos como Olig1 y Olig2, cuya acción es necesaria tanto en la etapa embrionaria como en etapas postnatales (Liu and Rao, 2004).

La diversificación a neuronas requiere que las células precursoras eviten la exposición a la señalización de Notch, lo que consigue a través de una proteína citoplásmica que antagoniza la señal de Notch. Esta proteína conocida como Numb determina el destino neuronal. El papel de Numb en la neurogénesis fue descubierto en *Drosophila* y determina el destino neural de las células hijas, una vez que los progenitores se dividen asimétricamente (Fishell and Kriegstein, 2003; Rasin, *et al.* 2007).

La migración neural guiada por la glía radial es la que establece la organización cerebral del córtex en capas y se relaciona con cada remesa de divisiones asimétricas y la migración de las neuronas hijas que se quedan más rezagadas conforme avanza la maduración. Además de la migración guiada por la glía y conocida por ese término de “migración radial”, las neuronas pueden realizar una “migración tangencial” y para ello se guían por los haces de axones, migración que se observa claramente en los ganglios basales. Una reciente revisión clarifica mediante el andamiaje de la glía dos etapas en el desarrollo del córtex cerebral (Nowakowski, *et al.* 2016).

3.5. Neurogénesis en el adulto, los progenitores gliales de la zona subventricular

“Pero la especialización funcional del cerebro impone a las neuronas dos grandes lagunas: la incapacidad proliferativa y la diferenciación intraprotoplásmica irreversible. Esa es la razón por la cual, una vez finalizado el desarrollado del sistema nervioso, las fuentes de crecimiento y regeneración de los axones y dendritas se secan irrevocablemente. En los centros adultos las vías nerviosas están ya fijas, acabadas e inmutables. Cualquiera de ellas puede morir, ninguna puede ser regenerada”.

Pero Ramón y Cajal era un gran científico, que confiaba en la valía y el esfuerzo de los que como él vendrían en tiempo futuro, y unos párrafos más adelante escribe:

“Sera para la ciencia del futuro cambiar, si es posible, este duro decreto. Inspirado con grandes ideales, se debe de trabajar para impedir o moderar el decaimiento gradual de las neuronas, para salvar la casi invencible rigidez de sus conexiones y para restablecer los caminos normales de los nervios, cuando la enfermedad ha cercenado los centros que estaban íntimamente asociados”.

Ramón y Cajal (1913). Estudios sobre la Degeneración y Regeneración del sistema nervioso.

He querido empezar este apartado con la tan conocida frase de Don Santiago, según la cual ninguna célula nerviosa puede ser regenerada en los centros del sistema nervioso. Esta frase existe, pero está al principio de un texto que finaliza con la esperanza y seguridad de que vendrán otros grandes científicos que serán capaces de trabajar y encontrar nuevas ideas y nuevas tecnologías capaces de revertir, o al menos paliar, las disfunciones por muerte celular en el cerebro.

La primera publicación que hacía referencia a la existencia de neurogénesis en los animales adultos proviene del grupo de Altman y se remonta a 1965. Tiene por título: *Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats* (Altman and Das, 1965). La demostración se basó en inyectar timidina- H^3 a ratas jóvenes y realizar estudios mediante autoradiogramas de la presencia de zonas marcadas radiactivamente en los cortes de cerebro. La timidina tritiada es una de las bases esenciales para, una vez transformada en deoxiribonucleótido de timina, ser incorporada la radioactividad al DNA duplicado en las nuevas neuronas. Los estudios histológicos mostraron que en las ratas jóvenes aparecía un intenso marcaje en las capas endodimal y subendodimal en los ventrículos laterales y el tercer ventrículo. La intensidad del marcaje radioactivo desaparecía con rapidez, mientras que en el giro dentado del hipocampo se mantenía durante más tiempo y coincidía con el incremento en las células granulares.

El trabajo de Altman tuvo escasa repercusión y permaneció ignorado durante mucho tiempo.

Sería necesario esperar a los trabajos del Profesor Arturo Álvarez-Buylla, mejicano, de origen asturiano y actualmente director del Departamento de Medicina Regenerativa de la Universidad de California, San Francisco, para demostrar fehacientemente y sin ningún género de dudas la neurogénesis en el adulto.

Resaltar que a Joseph Altman, Arturo Álvarez-Buylla y a Giacomo Rizzolatti les concedieron el Premio Príncipe de Asturias de Investigación Científica y Técnica, conjuntamente, en 2011. El acta de concesión establece que: *Estos tres científicos son considerados referentes mundiales de la neurología por haber proporcionado pruebas sólidas para la regeneración de las neuronas en cerebros adultos (neurogénesis) y por el descubrimiento de las llamadas neuronas espejo. Sus investigaciones han abierto esperanzadoras vías a una nueva generación de tratamientos para combatir enfermedades neurodegenerativas o asociadas al cerebro, como el Alzheimer, el Parkinson o el Autismo (Acta del Jurado del Premio Príncipe de Asturias de Ciencias y Tecnología del año 2011).*

Los primeros trabajos de Álvarez-Buylla sobre nuevas neuronas en cerebro datan de 1988 y 1990 y fueron hechos en aves, donde demostró que existía una migración de neuronas jóvenes en el cerebro de las aves adultas. Posteriormente define que es la zona ventricular del cerebro de las aves donde se producía la proliferación y migración que seguía un patrón de diferenciación radial (Alvarez-Buylla and Nottebohm, 1988; Alvarez-Buylla, *et al.* 1990). Unos años más tarde, en 1997, publicaron un interesante artículo, en los pájaros cantores, concretamente los canarios, demostrando que el aprendizaje del canto en la época del apareamiento, requiere de un incremento en la formación e incorporación de neuronas al centro de regulación del canto, que a su vez depende de los niveles de testosterona y es estacional (Alvarez-Buylla and Kirn, 1997).

Para estar seguro de que la neurogénesis del cerebro adulto no era un fenómeno restringido a las aves, Alvarez-Buylla, comienza los trabajos en mamíferos y confirma plenamente que existen zonas en el cerebro adulto que se pueden considerar como nichos neurogénicos. Así lo demuestra en su artículo titulado: *“Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia”*. Publicado en los Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, PNAS. Sería el primer artículo de una larga y valiosa lista de publicaciones de su grupo de trabajo, que en aquel momento era muy reducido y tenía su laboratorio en la Universidad Rockefeller de Nueva York (Lois and Álvarez-Buylla, 1993). Es importante resaltar que, desde las primeras publicaciones, describe los nichos neurogénicos del adulto con capacidad para generar neuronas y glía, así como la capacidad de migrar desde la zona de proliferación y diferenciación, zona subventricular, hasta el bulbo olfativo, en el caso del ratón y la rata. Por el camino, se van diferenciando y hay dos tipos de células especiales, los neuroblastos y una especie de células gliales que los van protegiendo durante la migración, hasta que alcanzan su localización definitiva en el bulbo olfativo, pero no parecen estar guiados por ninguna de las vías descritas en el cerebro en desarrollo, ya que no intervienen, ni la glía radial, ni los haces de axones (Lois and Alvarez-Buylla, 1994; Lois, *et al.* 1996).

Hasta hace poco uno de los dogmas en neurociencia ampliamente aceptado era el considerar a las células de glía como productos neurales de diferenciación especializada y como células soporte con un origen muy diferente del de las neuronas. Como todos los dogmas, este convencimiento estaba destinado a ser derribado y no solamente la glía radial da origen a las neuronas mediante división asimétrica, cómo ya hemos mencionado, sino también que

subpoblaciones específicas de astrocitos pueden funcionar como progenitores primarios de células madre neurales, una excelente revisión de Kriegstein y Alvarez-Buylla (2009) nos pone sobre aviso de que en el sistema nervioso existe la capacidad de generar una extraordinaria diversidad celular, pero no conocemos los mecanismos exactos para activarlos.

El estudio de los factores que pueden inducir la formación de linajes gliales y neurales, en el cerebro adulto, así como la capacidad de revertirlos, ha ocupado a grandes investigadores estos últimos años.

Se consideraba la neurogénesis en el cerebro adulto como una mera continuación de la neurogénesis en las etapas embrionarias y fetales, pero los trabajos de estos últimos años demuestran su singularidad. Uno de los aspectos diferenciales más llamativos en la neurogénesis del adulto, es que ocurre en un entorno glial, y por lo tanto necesita de factores específicos adicionales y exclusivos para la diferenciación y mantenimiento. Las células madre neurales del adulto, NSCs, se parecen más a las células gliales, como los astrocitos maduros o las células endoteliales del cerebro adulto, mientras que las células madre neurales embrionarias se parecen más a las células de la glía radial Götz, *et al.* 2015a). No obstante algunos factores de transcripción y su regulación son comunes a la etapa embrionaria y adulta en la diferenciación. Es el caso de los factores Pax6, Gsx2 y Dlx, los cuales muestran diferencias notables en sus mecanismos de actuación a nivel molecular, comparando la etapa embrionaria y la adulta (Lopez-Juarez, *et al.* 2013).

Los factores externos, extrínsecos, que señalizan a través de receptores de membrana, también presentan analogías y diferencias en la neurogénesis fetal y la neurogénesis del adulto, citar solamente el efecto de la señalización por Wnt que se mantiene muy similar en ambos casos, mientras que la proteína morfogenética de hueso, BMP, se mantiene apagada y sin efecto en el cerebro adulto. Otros muchos factores de crecimiento tienen incidencias variables sobre la diferenciación de las células neurales progenitoras, ya sea en cerebro en desarrollo o en adulto (Götz, *et al.* 2015b).

Existe otra peculiaridad diferencial entre la neurogénesis en el cerebro en desarrollo y la del adulto, que no es otra que la propia actividad funcional del cerebro maduro con un gran número de neurotransmisores. En efecto, numerosos estudios han demostrado que los neurotransmisores tienen efectos sobre la diferenciación de las células. Entre los neurotransmisores destacan el GABA y glutamato. La neurotransmisión GABAérgica y sus receptores GABA_A inotrópicos y los GABA_B metabotrópicos ejercen un papel relevante, ya que existen interneuronas GABAérgicas que liberan el neurotransmisor

en el entorno de los nichos neurogénicos de la Zona subventricular, SVZ. La existencia de muy diversos receptores para este neurotransmisor explicaría que en las etapas de desarrollo se comporta generalmente como un inhibidor de la neurogénesis mientras que en el adulto incrementa la neurogenesis en la zona ventricular, pero la disminuye en la subventricular (Song, *et al.* 2012).

El glutamato es un neurotransmisor excitador por excelencia y el más abundante en el sistema nervioso, presenta también múltiples tipos de receptores inotrópicos incluidos en varias familias y receptores metabotrópico. Los receptores glutamatérgicos metabotrópicos ejercen un papel relevante en la proliferación celular de los progenitores neurales en el embrión y la ablación o *Knock down* del subtipo mGluR5 es uno de los más característicos, reduciendo significativamente el número de neuronas. Este efecto no es compartido por todos los miembros de la familia, que tienen en muchas ocasiones efectos opuestos. Por lo tanto se considera que esta puede ser un área interesante para desarrollar en el futuro, ya que dista mucho de ser comprensible (Götz, *et al.* 2015a).

Otro grupo de neurotransmisores relevantes, y menos conocidos, son los de nucleótidos, los denominados receptores purinérgicos, con dos familias, los P2X ionotrópicos y los P2Y metabotrópicos, cada una de ellas con sus respectivos subtipos. En trabajos recientes de nuestro grupo en la Universidad Complutense de Madrid, hemos constatado que están presentes en los nichos neurogénicos del giro dentado del hipocampo en las terminales de los axones dándoles direccionalidad y participando en procesos de reparación en el cerebro adulto (Díaz-Hernández, *et al.* 2012; Gómez-Villafuertes, *et al.* 2015; Miras-Portugal, *et al.* 2015; 2016).

Con las nuevas tecnologías de transfección, para sobre expresar, bloquear o marcar con proteínas fluorescentes los diferentes genes en células progenitoras, o en animales genéticamente modificados, se puede seguir con una cierta exactitud el devenir de las células madre de los nichos neurogénicos y sus progenies. Igualmente la técnica de producción de organoides, basados en progenitores embrionarios, o en linajes humanos de células transfectadas para convertirlas en pluripotentes inducidas iPSC, siguiendo la técnica de Shinya Yamanaka, reconocido con el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 2012 se puede conocer con bastante exactitud como proceden y actúan en la formación del sistema nervioso. El Dr. Felipe Ortega en su reciente incorporación al grupo de investigación purinérgico de la UCM, ha puesto a punto la técnica de transfección de células madre de la zona subventricular, que junto con la técnica de visualización de los cambios en tiempo real, mediante video imagen (*time lapse*), han permitido conocer con mucha más

precisión los receptores P2 implicados en la diferenciación en cerebro adulto mediados por nucleótidos. Basándose en la experiencia adquirida con otros factores transcripcionales, internos o extrínsecos, donde ha demostrado que de las células madre neurogenicas del adulto, el factor Prox1, es necesario para la diferenciación a oligodendrocitos. (Bunk et al. 2016; Ortega et al. 2013a, 2013b).

REFLEXIONES FINALES

Ahora somos conscientes de que los procesos de neurogénesis en el cerebro en desarrollo y en el adulto mantienen aspectos comunes, pero divergen en los estímulos y factores que necesitan para el proceso, ya que su función es esencialmente diferente: Formar de *novo*, o reparar en lo posible.

Tanto en el sistema nervioso en formación como en el adulto la neurogénesis se produce con un origen glial: La glía radial siendo esencial en la embriogénesis y las células progenitoras de los epitelios tapizantes de los ventrículos SEZ en los adultos. En las lesiones del cerebro adulto, o situaciones de hipoxia, la recuperación implica una fase de inflamación caracterizada por la astrogliosis, que consiste en la proliferación de los astrocitos reactivos.

Las células embrionarias NEC dan origen a todos los tipos de glía y neuronas. Las células SEZ del adulto dan lugar a todos los tipos de células neurales, excepto a la glía radial y los astrocitos reactivos pueden dar lugar a todo tipo de células neurales excepto a la glía radial. Esto es algo diferente a lo anteriormente aceptado, pues tendríamos una fuente inagotable de células madre en los astrocitos que son cinco veces más en número que las neuronas (Kleiderman, *et al.* 2016).

Las neuronas y la glía forman un tándem en perfecta armonía y no existirá función neural ni neurotransmisión sin su complicidad.

Ya no estamos limitados en la materia prima de las células madre progenitoras neurales embrionarias para reparar el cerebro. Analizando en profundidad el gran número y diversidad de células gliales que tenemos en nuestro cerebro adulto, solo nos queda comprender como utilizar todo su potencial.

Permítanme que finalice con la misma esperanza manifestada por Don Santiago Ramón y Cajal en su libro “Estudio sobre la degeneración y regeneración del sistema nervioso” 1923, que ya he citado anteriormente:

“Sera para la ciencia del futuro cambiar, si es posible, este duro decreto. Inspirado con grandes ideales, se debe de trabajar para impedir o moderar el decaimiento gradual de las neuronas, para salvar la casi invencible rigidez de sus conexiones y para restablecer los caminos normales de los nervios, cuando la enfermedad ha cercenado los centros que estaban íntimamente asociados”.

He dicho.

Madrid, 12 de enero de 2017.

BIBLIOGRAFIA.

- Acemel R.D., Tena J.J., Irastorza-Azcarate I., Marlétaz F., Gómez-Marín C., de la Calle-Mustienes E., Bertrand S., Diaz S.G., Aldea D., Aury J.M., Mangenot S., Holland P.W., Devos D.P., Maeso I., Escrivá H., Gómez-Skarmeta J.L. (2016). A single three-dimensional chromatin compartment in amphioxus indicates a stepwise evolution of vertebrate Hox bimodal regulation. *Nat Genet.*; 48(3): 336-41. doi: 10.1038/ng.3497. PMID: 26829752.
- Alcocer-Maldonado J.L. (2015). El cerebro en el libro *De Humani Corporis Fabrica*, de Andrés Vesalio. *Acta Médica grupo Ángeles*, Volumen 13, n.º 3, pags. 199-205.
- Altman J., Das GD. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124: 319-335.
- Araque A., Parpura V., Sanzgiri R.P., Haydon P. G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in neurosciences* 22 (5), 208-215.
- Araque A., Carmignoto G., Haydon P.G. (2001). Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annual Review of Physiology*. 63, 795-813.
- Alvarez-Buylla A., and Nottebohm F. (1988). Migration of young neurons in the adult avian brain. *Nature*, 335, 353-354.
- Alvarez-Buylla A., Theelen M., and Nottebohm F., (1990). Proliferation “hot spots” in adult avian ventricular zone reveal radial cell división. *Neuron*, 5: 101-109.
- Alvarez-Buylla A. and Kirn J.R. (1997). Birth, migration, incorporation, and death of vocal control neurons in adult songbirds. *J. Neurobiol* 33: 585-601.
- Back S.A., Luo N.L., Borenstein N.S., Levine J.M., Volpe J.J., Kinney H.C. (2001). Late oligodendrocyte progenitors coincide with the developmental window of vulnerability for human perinatal white matter injury. *J Neurosci.*; 21(4): 1302-12. PMID: 11160401.
- Beby F., Lamonerie T. (2013). The homeobox gene *Otx2* in development and disease. *Exp Eye Res*. 111:9-16. doi: 10.1016/j.exer.2013.03.007. Review. PMID: 23523800.
- Bunk E.C., Ertaylan G., Ortega F., Pavlou M.A., Gonzalez Cano L., Stergiopoulos A., Safaiyan S., Völs S., van Cann M., Politis P.K., Simons M., Berninger B., Del Sol A., Schwamborn J.C. (2016). *Prox1* Is Required for Oligodendrocyte Cell Identity in Adult Neural Stem Cells of the Subventricular Zone. *Stem Cells*. 34(8): 2115-29. doi: 10.1002/stem.2374. PMID:27068685.

- Burnstock G. (2007). Physiology and Pathophysiology of Purinergic Neurotransmission. *Physiological Reviews* Vol. 87 n.º 2, 659-797 DOI: 10.1152/physrev.00043.2006.
- Carrasquero L.M., E.G. Delicado E., Jimenez A. I., Perez-Sen R. and Miras-Portugal M.T. (2005). Cerebellar astrocytes co-express several ADP receptors. Presence of functional P2Y13 receptors. *Purinergic Signalling* 1, 153-159.
- Carrasquero LMG., Delicado E.G. Bustillo D., Gutierrez-Martín Y., Artalejo A.R., Miras-Portugal M.T. (2009). P2X7 and P2Y13 purinergic receptors mediate intracellular calcium responses to BzATP in rat cerebellar astrocytes. *J. Neurochem.*; 110(3): 879-89.
- Carreiras M., Seghier M.L., Baquero S., Estévez A., Lozano A., Devlin J.T., Price C.J. (2009). An anatomical signature for literacy. *Nature.*; 461(7266): 983-6. doi: 10.1038/nature08461. PMID:19829380.
- Chapouton P., Gärtner A. and Götz M. (1999). The role of Pax6 in restricting cell migration between developing cortex and basal ganglia. *Development* 126, 5569-5579.
- Cirelli C., Gutierrez C.M., Tononi G. (2004). Extensive and divergent effects of sleep and wakefulness on brain gene expression. *Neuron.*; 41(1): 35-43.
- Cotrina M.L., Nedergaard M. (2009). Physiological and pathological functions of P2X7 receptor in the spinal cord. *Purinergic Signal.* 2009 Jun; 5(2): 223-32. doi: 10.1007/s11302-009-9138-2.
- Del Rio-Hortega P. (1921). La glía de escasas radiaciones (oligodendroglía). *Bol. Real Soc. Esp. Hist. Nat.* 21, 63-92.
- Del Rio Hortega P. (1942). La neuroglia normal. Conceptos de neuroglioma y angioglioma. *Arch. Histol. Norm. Patol.* 1, 5-71.
- Delicado E., Jiménez A.I. Carrasquero L.M., Castro E. and Miras-Portugal M.T. (2005). Cross talk between EGF, AP5A and nucleotide receptors resulting in enhanced ATP Ca (2+) signaling involves extracellular kinase activation in cerebellar astrocytes. *Journal Neuroscience Research*, 81, 789-796.
- Diaz-Hernandez J.I., Gomez-Villafuertes R., León-Otegui M., Hontecillas-Prieto L., Del Puerto A., Trejo J.L., Lucas J.J., Garrido J.J., Gualix J., Miras-Portugal M.T., Diaz-Hernandez M. (2012). In vivo P2X7 inhibition reduces amyloid plaques in Alzheimer's disease through GSK3 β and secretases. *Neurobiol Aging.* 33(8): 1816-28. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.09.040. PMID 22048123.
- Domercq M., Perez-Samartin A., Aparicio D., Alberdi E., Pampliega O., Maturte C. (2010). P2X7 receptors mediate ischemic damage to oligodendrocytes. *Glia.* 58(6): 730-40. doi: 10.1002/glia.20958. PMID: 20029962.

- Donkelaar H.J.T., Broman J., Neumann P.E., Puelles L., Riva A., Tubbs R.S., and Kachlik D. (2016). Towards a Terminologia Neuroanatomica. *Clinical Anatomy*. November 2016, DOI : 10.1002/ca.22809.
- Engel T., Gómez-Villafuertes R., Tanaka K., Mesuret G., Sanz-Rodríguez A., García-Huerta P., Miras-Portugal M.T., Henshall D.C., Díaz-Hernández M. (2012) Seizure suppression and neuroprotection by targeting the purinergic P2X7 receptor during status epilepticus in mice. *FASEB J.* 26(4): 1616-28. doi: 10.1096/fj.11-196089. PMID: 22198387.
- Fields R.D. (2010). Neuroscience. Change in the brain's white matter. *Science*. 2010, nov. 5; 330(6005): 768-9. doi: 10.1126/science.1199139.
- Fields R.D., Ni Y. (2010). Nonsynaptic communication through ATP release from volume-activated anion channels in axons. *Sci Signal.* 3(142):ra73. doi: 10.1126/scisignal.2001128.PMID: 20923934.
- Fishell G., Kriegstein A.R. (2003). Neurons from radial glia: the consequences of asymmetric inheritance. *Curr Opin Neurobiol.* 13(1): 34-41. Review. PMID: 12593980.
- Goldman S.A., Schanz S., Windrem M.S. (2008). Stem cell-based strategies for treating pediatric disorders of myelin. *Hum. Mol. Genet.* 17: R76-R83.
- Goldman S.A., Nedergaard M., Windrem M.S. (2012). Glial progenitor cell-based treatment and modelling of neurological disease. *Science* 338: 491-495.
- Goldman S.A., Nedergaard M., Windrem M.S. (2015). Modeling cognition and disease using human glial chimeric mice. *Glia.* 63(8): 1483-93. doi: 10.1002/glia.22862. Review.
- Golgi C. (1903). Opera Omnia. Hoepli, Milano.
- Gómez-Villafuertes R., García-Huerta P., Díaz-Hernández J.I., Miras-Portugal M.T. (2015). PI3K/Akt signaling pathway triggers P2X7 receptor expression as a pro-survival factor of neuroblastoma cells under limiting growth conditions. *Sci Rep.* 21;5:18417. doi: 10.1038/srep18417. PMID: 26687764.
- Gorris R., Fischer J., Erwes K.L., Kesavan J., Peterson D.A., Alexander M., Nöthen M.M., Peitz M., Quandt T., Karus M., Brüstle O. (2015). Pluripotent stem cell-derived radial glia-like cells as stable intermediate for efficient generation of human oligodendrocytes. *Glia.* 2015 Dec; 63(12): 2152-67. doi: 10.1002/glia.22882. PMID: 26123132.
- Götz M. (2003). Glial cells generate neurons--master control within CNS regions: developmental perspectives on neural stem cells. *Neuroscientist.* 9(5): 379-97. Review. PMID: 14580122.
- Götz M., Stoykova A. and Gruss P. (1998). Pax6 controls radial glia differentiation in the cerebral cortex. *Neuron* 21, 1031-1044.

- Götz M., Nakafuku M. and Petrik D. (2015a) Neurogenesis in the Developing and Adult Brain-Similarities and Key Differences. *CSH Perspectives*, 1-23.
- Götz M., Sirko S., Beckers J. and Irmeler M. (2015b). Reactive Astrocytes as neural stem or progenitor cells-in vivo lineage, in vitro potential, and genome-wide expression analysis. *Glia* 63, 1452-1468.
- Gutierrez-Carrasquero, Teresa Iglesias, Esmerilda G. Delicado and M.^a Teresa Miras-Portugal (2010). Mechanisms of protein Kinase D activation in response to P2Y2 and P2X7 receptors in primary astrocytes. *Glia*. 58(8): 984-95.
- Han X., Chen M., Wang F., Windrem M., Wang S., Shanz S., Xu Q., Oberheim N.A., Bekar L., Betstadt S., Silva A.J., Takano T., Goldman S.A., Nedergaard M. (2013). Forebrain engraftment by human glial progenitor cells enhances synaptic plasticity and learning in adult mice. *Cell Stem Cell*. 2013 Mar 7; 12(3): 342-53. doi: 10.1016/j.stem.2012.12.015.
- Heidenreich M., Zhang F. (2016). Applications of CRISPR-Cas systems in neuroscience. *Nat Rev Neurosci*. 17(1): 36-44. doi: 10.1038/nrn.2015.2. Review. PMID: 26656253.
- Heinrich C., Blum R., Tripathi P., Götz M. and Berninger B. (2010). Directing astroglia from the cerebral cortex into functional subtype-specific neurons. *PLOS Biol*. 8.
- Herculano-Houzel S. (2014). The glia/neuron ratio: How it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia*, 62, 1377-1391.
- Hipócrates: *Sobre la enfermedad Sagrada*, traducido por Francis Adams, Enciclopedia Británica Inc.) SMITH, C.U.M. *El cerebro*. Madrid, Alianza Editorial, 1972, pág. 23.
- Jiménez, E. Castro, D. Communi, J.-M., Boeynaems, E.G. Delicado, and M.T. Miras-Portugal. (2000). Coexpression of several types of metabotropic nucleotide receptors in single cerebellar astrocytes. *J. Neurochem*. 71, 2071-2079.
- Jiménez, E. Castro, Delicado E.G., and Miras-Portugal M.T. (2002). Specific diadenosine pentaphosphate receptor coupled to extracellular regulated kinases in cerebellar astrocytes. *J. Neurochem*. 83, 299-308.
- Kleiderman S., Gutbier S., Ugur Tufekci K., Ortega F., Sá J.V., Teixeira A.P., Brito C., Glaab E., Berninger B., Alves P.M., Leist M. (2016). Conversion of Nonproliferating Astrocytes into Neurogenic Neural Stem Cells: Control by FGF2 and Interferon- γ . *Stem Cells*. 34(12):2861-2874. doi: 10.1002/stem.2483. Epub 2016, sep. 23.

- Kriegstein, A.; Alvarez-Buylla, A. (2009). «The glial nature of embryonic and adult neural stem cells.». *Annual review of neuroscience* 32: 149-84.
- Li, C., Xu, D., Ye, Q., Hong, S., Jiang, Y., Liu, X., Zhang, N., Shi, L., Qin, C.-F., and Xu, Z. (2016). Zika virus disrupts neural progenitor development and leads to microcephaly in mice. *Cell Stem Cell* 19, 120-126.
- Job C., Tan S.S. (2003). Constructing the mammalian neocortex: the role of intrinsic factors. *Dev Biol.* 15; 257(2): 221-32. Review PMID:12729554.
- Liu Y., Rao M.S. (2004). Olig genes are expressed in a heterogeneous population of precursor cells in the developing spinal cord. *Glia.*; 45(1): 67-74. PMID: 14648547.
- Liu Y., Ma D., Ji C. (2015). Zinc fingers and homeoboxes family in human diseases. *Cancer Gene Ther.* 22(5):223-6. doi: 10.1038/cgt.2015.16. Review.PMID:25857360.
- Liu, S., Cai, X., Wu, J., Cong, Q., Chen, X., Li, T., Du, F., Ren, J., Wu, Y.-T., Grishin, N.V., and Chen, Z.J. (2015). Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation. *Science* 347, aaa2630.
- Lois C., and Alvarez-Buylla A. (1993). Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia, PNAS. 90: 2074-2077.
- Lois C., Alvarez-Buylla A.(1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain.*Science.* ;264(5162):1145-8. PMID: 8178174.
- Lois C., Garcia-Verdugo J.M. and Alvarez-Buylla A. (1996). Chain migration of neuronal precursors. *Science.* 271. 978-910.
- Lopez-Juarez A., Howard J., Ullom K., Howard L., Grande A., Pardo A., Waclaw R., Sun Y.Y., Yang D., Kuan C.Y., Campbell K., Nakafuku M. (2013). Gsx2 controls region-specific activation of neural stem cells and injury-induced neurogenesis in the adult subventricular zone. *Genes Dev.* 27(11):1272-87. doi: 10.1101/gad.217539.113.PMID: 23723414.
- Lui, J.H., Hansen, D.V., and Kriegstein, A.R. (2011). Development and evolution of the human neocortex. *Cell* 146, 18-36.
- Lenhossek M.V. (1891). Zur Kenntnis der neuroglia des menschlichen Rückenmarkes. *Verh. Anat. Ges.* 5, 193-221.
- Malatesta P., Hack M.A., Hartfuss E., Kettenmann H., Klinkert W., Kirchhoff F., Götz M. (2003). Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron.* (5): 751-64. PMID: 12628166.
- Martin R., Bajo-Graneras R., Moratalla R., Perea G., Araque A. (2015). Circuit-specific signalling in astrocyte-neuron networks in basal ganglia pathways. *Science* 349 730-732.

- Matute C., Alberdi E., Domercq M., Pérez-Cerdá F., Pérez-Samartín A., Sánchez-Gómez M.V. (2001). The link between excitotoxic oligodendroglial death and demyelinating diseases. *Trends Neurosci.* 24(4): 224-30. Review.
- Matute C., Alberdi E., Domercq M., Sánchez-Gómez M.V., Pérez-Samartín A., Rodríguez-Antigüedad A., Pérez-Cerdá F. (2007). Excitotoxic damage to white matter. *J Anat.* 210(6): 693-702. Review. PMID: 17504270.
- Men W., Falk D., Sun T., Chen W., Li J., Yin D., Zang L., Fan M. (2014). The corpus callosum of Albert Einstein's brain: another clue to his high intelligence? *Brain.* 137(Pt 4): e268. doi: 10.1093/brain/awt252.
- Mehler M.F. (2002). Mechanisms regulating lineage diversity during mammalian cerebral cortical neurogenesis and gliogenesis. *Results Probl Cell Differ.* 2002; 39: 27-52. Review. PMID: 12357985.
- Miras-Portugal M.T., Diaz-Hernandez J.I., Gómez-Villafuertes R., Díaz-Hernández M., Artalejo A.R., Gualix J. (2015). Role of P2X7 and P2Y2 receptors on α -secretase-dependent APP processing: Control of amyloid plaques formation "in vivo" by P2X7 receptor. *Comput Struct Biotechnol J.*; 13: 176-81. doi: 10.1016/j.csbj.2015.02.005. Review. PMID:25848496.
- Miras-Portugal M.T., Gómez-Villafuertes R., Gualix J., Díaz-Hernández J.I., Artalejo A.R., Ortega F., Delicado E.G., Perez-Sen R. (2016). Nucleotides in neuroregeneration and neuroprotection. *Neuropharmacology.* 104: 243-54. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.09.002. Review. PMID: 26359530.
- Munji R.N., Choe Y., Li G., Siegenthaler J.A., Pleasure S.J. (2011). Wnt signaling regulates neuronal differentiation of cortical intermediate progenitors. *J Neurosci.*, 31(5):1676-87. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5404-10. PMID: 21289176.
- Namba T., Mochizuki H., Onodera M., Mizuno Y., Namiki H., Seki T. (2005). The fate of neural progenitor cells expressing astrocytic and radial glial markers in the postnatal rat dentate gyrus. *Eur J Neurosci.* 22(8): 1928-41. PMID: 16262632.
- Navarrete M., and Araque A. (2014). The Cajal school and the physiological role of astrocytes: a way of thinking. *Frontiers in neuroanatomy* 8, 33-66.
- Nedergaard M. (1994). Direct signalling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. *Science*, 263(5154): 1768-71.
- Nedergaard M., and Verkhratsky A. (2012). Artifact versus reality- How astrocytes contribute to synaptic events. *Glia* 60, 1013-1023.
- Nowakowski T.J., Pollen A.A., Sandoval-Espinosa C., Kriegstein A.R. (2016). Transformation of the Radial Glia Scaffold Demarcates Two Stages of Human Cerebral Cortex Development. *Neuron.* 21; 91(6): 1219-27. doi: 10.1016/j.neuron.2016.09.005. PMID: 27657449.

- Oberheim N.A., Takano T., Han X., He W., Lin J.H., Wang F., Xu Q., Wyatt J.D., Pilcher W., Ojemann J.G., Ransom B.R., Goldman S.A., Nedergaard M. (2009). Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *J Neurosci.* 2009; 293276-87.
- Onorati M., Li Z., Liu F., Sousa A.M., Nakagawa N., Li M., Dell'Anno M.T., Gulden F.O., Pochareddy S., Tebbenkamp A.T., Han W., Pleitikos M., Gao T., Zhu Y., Bichsel C., Varela L., Szigeti-Buck K., Lisgo S., Zhang Y., Testen A., Gao X.B., Mlakar J., Popovic M., Flamand M., Strittmatter S.M., Kaczmarek L.K., Anton E.S., Horvath T.L., Lindenbach B.D., Sestan N. (2016). Zika Virus Disrupts Phospho-TBK1 Localization and Mitosis in Human Neuroepithelial Stem Cells and Radial Glia. *Cell Rep.*; 16(10): 2576-92. doi: 10.1016/j.celrep. 2016.08.038. PMID: 27568284.
- Ortega F., Berninger B., Costa M.R. (2013). Primary culture and live imaging of adult neural stem cells and their progeny. *Methods Mol Biol.* 1052:1-11. doi: 10.1007/7651_2013_22.PMID: 23640252.
- Ortega F., Gascón S., Masserdotti G., Deshpande A., Simon C., Fischer J., Dimou L., Chichung Lie D., Schroeder T., Berninger B. (2013). Oligodendroglial and neurogenic adult subependymal zone neural stem cells constitute distinct lineages and exhibit differential responsiveness to Wnt signalling. *Nat Cell Biol.*;15(6):602-13. doi: 10.1038/ncb2736. PMID: 23644466.
- Parpura V., Basarsky T.A., Liu F., Jefinija K., Jefinija S., Haydon P.G. (1994). Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature.*; 369 (6483): 744-747.
- Parpura V., Heneka M.T., Montana V., Olier S.H., Schousboe A., Haydon P.G., Stout R.F. Jr., Spray D.C., Reichenbach A., Pannicke T., Pekny M., Pekna M., Zorec R., Verkhratsky A. (2012). Glial cells in (patho) physiology. Review. *J. Neurochem.* (2012) 121, 4-27.
- Perea G., Araque A. (2007). Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science* 317777, 1083-1086.
- Pérez-Cerdá F, Sánchez-Gómez and Matute C. (2015) Pío del Río Hortega and the Discovery of the Oligodendrocytes. *Front. Neuroanat.* 9, 92/ doi: 10.3389.
- Pollen A.A., Nowakowski T.J., Chen J., Retallack H., Sandoval-Espinosa C., Nicholas C.R., Shuga J., Liu S.J., Oldham M.C., Díaz A., Lim D.A., Leyrat A.A., West J.A., Kriegstein A.R. (2015). Molecular identity of human outer radial glia during cortical development. *Cell.* 163(1): 55-67. doi: 10.1016/j.cell.2015.09.004. PMID: 26406371.

- Puelles L., and Rubenstein J.L. (1993). Expression patterns of homeobox and other putative regulatory genes in the embryonic mouse forebrain suggest a neuromeric organization. *Trends Neurosci.* 16: 472-479.
- Puelles L., and Rubenstein J.L. (2003). Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends Neurosci.* 26: 469-76.
- Qian X., Nguyen H.N., Song M.M., Hadiono C., Ogden S.C., Hammack C., Yao B., Hamersky G.R., Jacob F., Zhong C., Yoon K.J., Jeang W., Lin L., Li Y., Thakor J., Berg D.A., Zhang C., Kang E., Chickering M., Nauen D., Ho C.Y., Wen Z., Christian K.M., Shi P.Y., Maher B.J., Wu H., Jin P., Tang H., Song H., Ming G.L. (2016). Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-bioreactors for Modeling ZIKV Exposure. *Cell.* 19;165(5): 1238-54. Doi: 10.1016/j.cell. 2016.04.032. PMID: 27118425.
- Ramón y Cajal, S. (1895). Algunas conjeturas sobre el mecanismo anatómico de la ideación, asociación y atención. *Rev. Med. Cirug. Pr. c.* 36, 3-14.
- Ramón y Cajal, S.(1897). Algo sobre la significación fisiológica de la neuroglia. *Revista Trimestral Micrografía* 1, 3-47.
- Ramón y Cajal, S. (1899). *Textura del Sistema Nervioso del Hombre y de los Vertebrados*. Tomo I: Imprenta y Librería de Nicolás Moya (Publicado en su primera edición en francés).
- Ramón y Cajal, S. (1913-a) Sobre un nuevo proceder de impregnación de la neuroglia y sus resultados en los centros nervioso del hombre y animales. *Trab. Lab. Invest. Biol. Univ. Madrid* 11, 219-237.
- Ramón y Cajal, S. (1913-b). Contribución al conocimiento de la neuroglia del cerebro humano. *Trab. Lab. Invest. Biol.* XI, 225-315.
- Ramón y Cajal, S. (1913-c). Estudios sobre la Degeneración y Regeneración del sistema nervioso.
- Rasin M.R., Gazula V.R., Breunig J.J., Kwan K.Y., Johnson M.B., Liu-Chen S., Li H.S., Jan L.Y., Jan Y.N., Rakic P., Sestan N. (2007). Numb and Numbl are required for maintenance of cadherin-based adhesion and polarity of neural progenitors. *Nat Neurosci.*; 10(7): 819-27. PMID: 17589506.
- Reiner O., Karzbrun E., Kshirsagar A., Kaibuchi K. (2013). Regulation of neuronal migration, an emerging topic in autism spectrum disorders. *J. Neurochem.* 136(3):440-56. doi: 10.1111/jnc.13403. Review. PMID: 26485324.
- Rubenstein J.L.R.; Martinez S., Shimamura K., and Puelles L. (1994). The embryonic vertebrate forebrain: The prosomeric model. *Science*, 266: 578-580.
- Scholz J., Klein M.C., Behrens T.E., Johansen-Berg H. (2009). Training induces changes in white-matter architecture. *Nat Neurosci.* 12(11): 1370-1. doi: 10.1038/nn.2412.

- Sierra A., de Castro F., del Río-Hortega J., Iglesias-Rozas J.J., Garrosa M., and Kettenmann H. (2016). The “Big-Bang” for Modern Glial Biology: Translation and Comments on Pío del Río-Hortega 1919. Series of Papers on Microglia (Special Article). *Glia*; 64:1801-1840.
- Song J., Zhong C., Bonaguidi M.A., Sun G.J., Hsu D., Gu Y., Meletis K., Huang Z.J., Ge S., Enikolopov G., Deisseroth K., Luscher B., Christian K.M., Ming G.L., Song H. (2012). Neuronal circuitry mechanism regulating adult quiescent neural stem-cell fate decision. *Nature*. 489 (7414): 150-4. doi: 10.1038/nature11306. PMID: 22842902.
- Stahl R., Walcher T., De Juan Romeo C., Pilz G.A., Cappello S., Irmeler M., Sanz Anquela J.M., Beckers J., Blum R., Borrell V. and Götz M. (2013). *Trnp1* regulates expansion and folding of the mammalian cerebral cortex by control of radial glial fate. *Cell* 153, 535-49.
- Stevens B., Tanner S., Fields R.D. (1998). Control of myelination by specific patterns of neural impulses. *J Neurosci*. 18(22): 9303-11.
- Stevens B., Porta S., Haak L.L., Gallo V., Fields R.D. (2002). Adenosine: a neuron-glia transmitter promoting myelination in the CNS in response to action potentials. *Neuron*. 2002 Dec 5; 36(5): 855-68.
- Tallinen T., Chung J.Y., Rousseau F., Girard N., Lefèvre J., and Mahadevan L. (2016). On the growth and form of cortical convolutions. *Nature Physics*, 12, 588-593.
- Tessier-Lavigne M. (2007). Ferrier Price Lecture. Royal Society London.
- Ullén F. (2009). Is activity regulation of late myelination a plastic mechanism in the human nervous system? *Neuron Glia Biol*. 5, 29-34.
- Verkhratsky A., Orkand R. K., Kettenmann H. (1988). Glial Calcium: Homeostasis and Signaling Function *Physiological Reviews* 1998, vol. 78 n.º 1, 99-141.
- Verkhratsky A., and Nedergaard M. (2014) Astroglial cradle in the life of the synapse. *Phil. Trans. R. Soc. B* 369: 20130595.
- Verkhratsky A., Nedergaard M., Hertz L. (2015). Why are astrocytes important. *Neurochem Res*;40(2):389-401. doi: 10.1007/s11064-014-1403-2. Review.
- Vesalio Andrés (1543). “*De Humani Corporis Fabrica*”, reproducción exacta copia del original, 1991. Biblioteca de la Real Academia Nacional de Farmacia, Madrid.
- Viganò F., Möbius W., Götz M., Dimou L. (2013). Transplantation reveals regional differences in oligodendrocyte differentiation in the adult brain. *Nat Neurosci*. 16(10): 1370-2. doi: 10.1038/nn.3503. PMID: 23995069.

Windrem M.S., Schanz S.J., Morrow C., Munir J., Chandler-Militello D., Wang S., Goldman S.A. (2014). A competitive advantage by neonatally engrafted human glial progenitors yields mice whose brains are chimeric for human glia. *J Neurosci.* 2014, nov. 26; 34(48): 16153-61. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1510-14.2014.

