

DIFERENCIACIÓN CELULAR EN EL SISTEMA NERVIOSO, EL CASO DE LAS CÉLULAS PRECURSORAS NEURO-GLIALES

CELLULAR DIFFERENTIATION IN THE NERVOUS SYSTEM: THE CASE OF NEURO-GLIAL PRECURSOR CELLS

Rojas Mayorquín AE¹, Ortuño Sahagún D²

¹Departamento de Investigación Básica, Instituto de Geriátria, Institutos Nacionales de Salud, Periférico Sur No. 2767,

Col. San Jerónimo Lídice, Del. Magdalena Contreras, C.P. 10200. México D.F.

²Laboratorio de Desarrollo y Regeneración Neural, Instituto de Neurobiología, Departamento de Biología Celular y Molecular, C.U.C.B.A, Universidad de Guadalajara, Apartado Postal 52-126, CP. 45021. Guadalajara, Jalisco, México.

Recibido: 20 de Diciembre de 2010.

Aceptado: 28 de Enero de 2011.

Resumen

A partir del descubrimiento de las células precursoras, se ha incrementado la cantidad de grupos de investigación que dedican sus esfuerzos a entender los fenómenos de la diferenciación celular en particular, así como el interés por la biología del desarrollo en general. El presente artículo revisa los términos y conceptos básicos y actualizados de la diferenciación celular, enfocándose en las células precursoras neurales, imprecisamente llamadas "células madre". Se comentan y se discuten los factores que pueden influir en la diferenciación celular neural, así como su potencial uso en la terapia clínica para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas. Las células precursoras se caracterizan por ser capaces de autorreplicarse, así como por generar diversos tipos celulares mediante un proceso denominado diferenciación. Los mecanismos moleculares que permiten regular esta diferenciación involucran factores extrínsecos e intrínsecos a la célula y es posible lograr dirigir, en el laboratorio, la diferenciación *in vitro* de precursores multipotenciales hacia fenotipos celulares determinados, dependiendo de las condicio-

nes del medio en el que se cultiven. Por ejemplo, a través de un análisis de perfiles de expresión génica, recientemente se ha demostrado que las células de la glía envolvente del bulbo olfatorio son capaces de inducir su propia diferenciación a partir de precursores neurales multipotenciales cultivados en un medio condicionado. Esta metodología permite la posibilidad de obtener *in vitro* células de un fenotipo que favorece la regeneración neural. Dicho proceso representa una promisorio estrategia de obtención de células diferenciadas a fenotipos específicos a partir de células precursoras multipotenciales, aplicable para la terapia de enfermedades degenerativas a través de transplantes.

Palabras clave: Células precursoras, diferenciación celular, sistema nervioso.

Abstract

Since the discovery of precursor cells, the number of research groups that dedicate their efforts to understand developmental bio-

Autor corresponsal:

Rojas Mayorquín AE, Departamento de Investigación Básica, Instituto de Geriátria, Institutos Nacionales de Salud, México, D.F., Tel. 01 (55) 5573 8686 / 01 (33) 36852038, Correo Electrónico: argelia.rojas@gmail.com

logy has increased, particularly those devoted to the phenomena of the cellular differentiation. The present article reviews and updates basic terms and concepts of cellular differentiation, with a focus on the neural precursor cells, commonly referred to as stem cells. Factors that can influence the neural cellular differentiation are commented and discussed, as well as their potential use in clinical therapy for the treatment of neurodegenerative diseases. A characteristic of precursor cells is that they are able to self-replicate; another is that they generate different cellular types by means of a process called differentiation. Molecular mechanisms that allow for a regularization of this differentiation involve factors that are intrinsic and extrinsic to the cell and it is possible to direct, in the laboratory, the *in vitro* differentiation of multi-potential precursor cells into certain cellular phenotypes, depending on the conditions and the medium in which they were cultivated. As an example, through an analysis of gene expression profile, recently it has been demonstrated that ensheathing glial cells from the olfactory bulb capable of inducing their own differentiation from multi-potential neural precursor cells cultivated in a conditioned way. This methodology allows the possibility to obtain *in vitro* cells of a phenotype that promotes neural regeneration. The above mentioned process represents a promissory strategy to obtain differentiated cells of specific phenotypes from multi-potential precursor cells, which could be applicable for the therapy of degenerative diseases by means of cells transplant.

Key words: Precursor cells, cellular differentiation, nervous system.

Introducción

Células precursoras y diferenciación celular

Al inicio de su ciclo de vida, un organismo se transforma a partir de una sola célula, el huevo fecundado, en un individuo adulto. A lo largo de ese trayecto, las células del organismo no sólo varían en cantidad, mediante proliferación, sino que también se diferencian

y se especializan, modificando sus fenotipos. Se denomina **diferenciación celular** al proceso mediante el cual una célula modifica su fenotipo hacia tipos celulares específicos con funciones definidas. Si posteriormente la célula diferenciada se compromete con una función y pierde su capacidad de proliferar, se convierte en una célula especializada (por ejemplo; las neuronas, los eritrocitos y las células musculares) (Kalthoff, 1996). Los mecanismos moleculares de la diferenciación celular son a menudo comunes entre diferentes organismos y, con ciertas variaciones, se utilizan en diversos tejidos de un mismo organismo.

En 1958, Leroy Stevens estableció el origen de teratomas de ratón en células germinales y denominó a estas células "**pluripotent embryonic stem cells; ESCs**" (células precursoras embrionarias pluripotenciales). Posteriormente, en la década de los ochenta, el mismo Stevens en forma conjunta con Gail Martin y Martin Evans, describen por vez primera a las células precursoras (*stem cells*) obtenidas a partir de la masa celular interna del embrión de ratón (Lewis, 2001). Ello abre la puerta a la caracterización de las células que originan los diferentes tipos de tejidos durante el desarrollo embrionario.

El término de "**stem cell**" ha sido comúnmente traducido al español como "**célula madre**" o "**célula troncal**" e inclusive como "célula tallo" o "estaminal", lo cual corresponde a una traducción literal del vocablo inglés "*stem*". Sin embargo, estas traducciones generan confusión, puesto que no reflejan la función propia de dichas células. Por una parte, el denominarlas células madre, si bien podría considerarse como una alegoría de "una célula que da origen a otra", implica que la célula originadora continúe existiendo, como lo hace una madre generalmente, pero no es el caso. Cuando una célula se divide para originar a otra, deja de existir ella misma y genera al menos a dos células, que ya ni siquiera son iguales entre sí, aunque puedan ser muy parecidas y que presentan una identidad propia. Por lo tanto, "**célula madre**" es un término inadecua-

do para referirnos a una célula indiferenciada. Por otra parte, el denominarla célula troncal (o tallo), como traducción literal de “*stem*”, da la idea de relacionarla con un árbol, de cuyo tronco se generan las ramas. Es conveniente recordar que los árboles tienen generalmente un solo tronco (salvo excepciones que forman aglomerados) a partir del cual se generan las ramificaciones, primarias, secundarias y terciarias. En el proceso de diferenciación celular, durante el desarrollo embrionario, hay múltiples células indiferenciadas que darán lugar a muchas más células diferenciadas, no sólo a un tipo (como si fueran un tronco). Por lo que en este caso, también resulta desafortunada la referencia, pues habría que referirse a las “células troncales” como las originales y a las “células ramales” como sus derivadas.

Por lo anterior, el término más correcto, además de ser ampliamente utilizado y reconocido, es el de “**célula precursora**” (CP) para referirse simplemente a que se trata de una célula que precede a otra (o a otras), es decir, que va delante en tiempo, orden y lugar, lo cual coincide con gran precisión con la función de dichas células, tanto durante el desarrollo embrionario como en las etapas juveniles y adultas de la vida de un organismo: las células precursoras son las que generan a los diferentes linajes y tipos celulares.

Las CP se caracterizan por su capacidad de autorreplicación, así como por su capacidad para generar células diferenciadas. Funcionan en diversos tejidos para reemplazar, en determinadas condiciones, poblaciones de células maduras que no pueden dividirse y propagarse (Albert *et al.*, 2001). Uno de los principales problemas de la biología de las CP ha sido identificar los mecanismos por los cuales seleccionan una ruta particular para su diferenciación (Morrison *et al.*, 1997).

Las CP producen factores de transcripción que controlan su autorrenovación, así como su destino. Por otra parte, diversos agentes, como los factores de crecimiento y ciertas citocinas, pueden actuar directamen-

te sobre las CP e inducir su diferenciación hacia un linaje particular. Sin embargo, también se ha sugerido que las CP se comprometen con un linaje particular independientemente de la activación de citocinas (Metcalf, 1980; Metcalf, 1991), las cuales actúan posteriormente para promover la supervivencia y proliferación de los progenitores comprometidos (Suda *et al.*, 1984; Ogawa, 1989). Así, cada linaje se encuentra controlado por una combinación única de diversos factores, que pueden ser expresados individualmente según el linaje.

La plasticidad de las CP es definida como la capacidad de estas células para cruzar los límites entre los linajes celulares, es decir, la capacidad que presentan para poder diferenciarse en prácticamente cualquier tipo celular, ya sea *in vitro* o *in vivo* (Kalthoff, 1996; Raff, 2003; Jahagirdar *et al.*, 2005). El estudio de los procesos involucrados en la diferenciación celular y el estudio de los linajes celulares son dos de los muchos campos de interés que se han desarrollado a partir del conocimiento de las CP. Su estudio ha recibido recientemente gran atención debido a que es cada vez más evidente su capacidad de diferenciarse, tanto *in vitro* como *in vivo*, hacia distintos fenotipos celulares. Esto ha sido observado por diversos grupos de investigación gracias a la inducción del proceso de diferenciación al exponer a las CP a diferentes condiciones de cultivo, entre otras estrategias.

Es importante enfatizar que el solo estudio fenotípico de los linajes celulares no puede revelar el mecanismo por el cual una célula adquiere su fenotipo. Tanto los linajes variables como los invariables, se derivan de eventos inductores extrínsecos que actúan sobre las células multipotenciales. Sin embargo, la determinación genética es fundamental, lo que se ilustra en los estudios realizados en el nemátodo *C. elegans*, en el cual el patrón celular de los diferentes linajes es invariable de un espécimen a otro (McConnell, 1995). De tal forma que una CP sólo podrá originar a aquellos fenotipos celulares para los cuales contenga la información ge-

nética correspondiente, pero la regulación fina de las diferentes etapas de diferenciación se realizará con base en las señales que reciba de su entorno.

Tipos de CP y niveles de potencialidad

A fin de ser definidas como tales, las CP deben de ser células indiferenciadas y deben de poder dividirse durante una gran parte de la vida del organismo. Se considera también que las CP embrionarias tienen una mayor capacidad de división que las CP posnatales (Vaziri *et al.*, 1994; Bodnar *et al.*, 1998). Cuando una CP se divide, cada célula hija puede mantenerse indiferenciada como otra CP o bien puede diferenciarse. Las CP pueden presentarse en diferentes estadios de diferenciación intermedios a lo largo de un linaje celular (Fraichard, 1995).

En el proceso de diferenciación celular, intervienen fundamentalmente dos factores: 1) la información genética que la célula posea, que constituye la potencia celular, es decir, lo que una célula tiene capacidad de hacer y 2) las señales que recibe del entorno, los determinantes citoplasmáticos, que a nivel de su citoplasma se manifiestan como moléculas, las cuales están distribuidas de manera heterogénea en el citoplasma y son capaces de influir en el destino celular, es decir, en lo que una célula va a llegar a ser, luego de dividirse y diferenciarse. De la interacción de ambos factores, podemos establecer en general los diferentes niveles o grados de indiferenciación o potencialidad celular.

La potencialidad celular está delimitada por la información genética y extracromosómica que posea una célula. Sin embargo, durante el desarrollo del organismo, esta potencialidad se va modulando por la acción de los determinantes citoplasmáticos, que responden a las señales recibidas del medio y producidas por otras células. De esta forma, aunque las células mantienen, en teoría, la capacidad de diferenciarse hacia cualquier tipo celular, en realidad la manifestación de

esta capacidad depende de la modulación de la expresión génica. Por lo que el resultado es una disminución progresiva de su potencialidad, a medida que las células se van dividiendo y diferenciándose, con lo cual se acotan cada vez más los diferentes linajes celulares así como el destino celular. De tal forma que podemos considerar a grandes rasgos los siguientes tipos de CP:

Células totipotenciales – Son el cigoto y los primeros blastómeros, son células capaces de dar lugar a todos los tipos celulares de un organismo. Constituyen las CP por excelencia o las, imprecisamente denominadas, células madre.

Células pluripotenciales – Células que pueden dar origen a diversos linajes o estirpes celulares. Como las células de los tejidos embrionarios fundamentales durante el desarrollo embrionario: ectodermo, endodermo y mesodermo. Operativamente, para considerarse célula pluripotencial es preciso demostrar la funcionalidad *in vitro* e *in vivo* de las células a las que dan lugar y que se produzca un asentamiento claro y persistente de estas células en el tejido diana, tanto en presencia como en ausencia de daño en los tejidos en los cuales se injerta (Jiang *et al.*, 2002). Las CP de embriones proliferan indefinidamente y pueden diferenciarse espontáneamente, dependiendo de las condiciones en las que se encuentren, hacia casi cualquier tipo de tejido, lo que evidencia su gran pluripotencialidad (Mitchell *et al.*, 2002). En el transcurso de su diferenciación, generan tipos de células que si bien están aún indiferenciadas, mantienen su capacidad de generar diferentes tipos celulares y que denominamos CP en general.

Células multipotenciales – Células precursoras que pueden originar diversos fenotipos de células, generalmente dentro de un mismo linaje y que denominaremos células precursoras multipotenciales (CPM). Algunos autores consideran otro tipo de CP: las unipotenciales, si dan lugar únicamente a un tipo celular (Raff, 2003; McGraw-Hill, 2005).

Las CP pueden encontrarse en diferentes estadios del desarrollo fetal y están presentes en diversos tejidos de organismos adultos. Muchos de los vocablos utilizados para denominar a las CP se basan en sus orígenes y en el tipo celular de su progenie. En etapas posnatales, las CP pueden encontrarse en algunos tejidos maduros y su habilidad para proliferar y auto-renovarse puede mantenerse a lo largo de toda la vida del organismo. Residen en tejidos y órganos específicos, que incluyen la médula ósea, sangre, piel, tracto gastro-intestinal, pulpa dental, retina, músculo esquelético, hígado, páncreas y el cerebro, entre otros. Sin embargo, a diferencia de las CP embrionarias, las CP del adulto son más difíciles de mantener en cultivo *in vitro*. Las CP del adulto son multipotenciales, debido a que su posibilidad de acción está generalmente limita-

da a uno o dos linajes exclusivamente. Sin embargo, en la médula ósea se puede localizar un tipo especial denominado CP del mesénquima, capaz de producir tipos celulares de diversos tejidos como: hueso, cartílago, sangre, grasa y tejidos conectivos. A pesar de estar presentes en muy pequeñas cantidades, las CP del mesénquima son responsables del mantenimiento de ciertos tejidos especializados, mediante el reemplazo, a través de divisiones asimétricas, de las células perdidas.

Diferenciación del linaje neuro-gliol

La formación del sistema nervioso en vertebrados comienza durante el desarrollo embrionario con la neurulación, a partir de la formación de la placa neural. Las células neuroepiteliales originadas del ectodermo

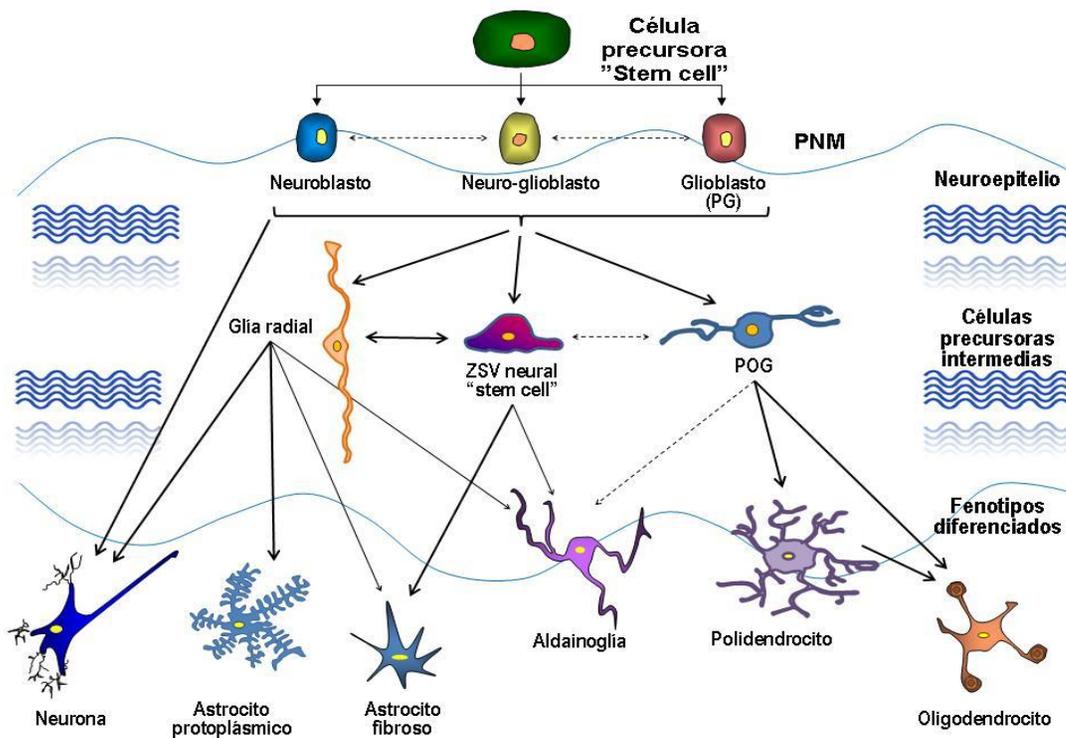


Figura 1. Cruzando el río de la diferenciación. Los linajes están indicados de la siguiente forma: generalmente aceptado (línea gruesa), reconocido por algunos autores (línea continua), relaciones hipotéticas (línea discontinua). PNM – precursor neural multipotencial, PG – precursor glial, POG – precursor oligodendroglial, ZSV – zona subventricular (Tomado de Ortuño Sahagún *et al.*, 2011).

dan lugar a las células precursoras neurales multipotenciales (PNM), que constituyen las primeras células precursoras propiamente neurales y son capaces de autogenerarse y diferenciarse, dando lugar tanto a neuronas como a células gliales (McKay, 1997; Gage, 2000; Temple, 2003). Las PNM incluyen tanto precursores bipotenciales neuro-gliales, como neuroblastos y glioblastos indiferenciados (Sun, 2003) (Figura 1). La mayor parte de los glioblastos son formados por las células neuroepiteliales cuando ha cesado la producción de neuroblastos. De los glioblastos derivan principalmente astrocitos, oligodendrocitos y otras células macrogliales. Cuando las células neuroepiteliales dejan de producir neuroblastos y glioblastos, se diferencian por último en células endimarias (Langman *et al.*, 1994).

Hasta hace dos décadas se consideraba que la formación de las neuronas y las células gliales en el sistema nervioso central (SNC) cesaba antes o poco tiempo después del nacimiento. Sin embargo, diversos estudios han reportado que tanto la neurogénesis como la gliogénesis ocurren también en individuos adultos a partir de las PNM (Weissman, 2000). Nuevas neuronas continúan formándose dentro del cerebro adulto de peces, ranas, reptiles, pájaros e inclusive de los mamíferos (Álvarez-Buylla *et al.*, 1995). En cuanto a las células gliales, los principales linajes de la glía central derivan de PNM, incluyendo a los astrocitos, los oligodendrocitos y a otros tipos gliales, como la glía radial y la glía envolvente (GE) en el bulbo olfatorio (BO) (Figura 1). La heterogeneidad de estos precursores así como su capacidad para interconvertirse de unos tipos en otros complica su estudio (Kondo *et al.*, 2000; Nieto, 2001; Morrow *et al.*, 2001; Campbell *et al.*, 2002).

En la última década, se han descrito poblaciones de PNM en diferentes regiones del SNC del mamífero adulto, principalmente en la zona subventricular (ZSV), el giro dentado del hipocampo, la retina y el canal central de la médula espinal (Álvarez-Buylla

et al., 2002a; Álvarez-Buylla *et al.*, 2002b). En la zona rostródorsal de la ZSV, próxima al estriado, surge la denominada vía de migración rostral (RMS, por sus siglas en inglés “*rostral migratory stream*”) hacia el BO, por la cual las células precursoras migran a través del complejo parénquima cerebral y se diferencian posteriormente en neuronas que maduran en el BO (Campbell *et al.*, 2002; Merkle *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 1996). En la posición más dorsal, la zona ventricular embrionaria se constituye como la principal zona germinativa en E19. Las células que se originan de esta región, desde E17 hasta P14, se destinan primordialmente a linajes gliales, astrocitos y oligodendrocitos, a la vez que dan origen a nuevas neuronas (Levison *et al.*, 1993; Zerlin *et al.*, 1995).

Las PNM están localizadas en la pared lateral de los ventrículos en ratas y ratones adultos, lo cual representa una fuente de precursores que pueden explicar cierta plasticidad del SNC (García-Verdugo *et al.*, 1998). También se ha observado que persisten en la ZSV de otros vertebrados adultos incluyendo perros (Blakemore *et al.*, 1972), primates (McDermott *et al.*, 1990) y humanos (Quiñones-Hinojosa *et al.*, 2006). Se ha propuesto que en la ZSV, la glía radial (células gliales inmaduras que guían la migración neuronal durante el desarrollo embrionario) cumple el papel de CP en el SNC del adulto (Álvarez-Buylla *et al.*, 2002b; Spassky *et al.*, 2005).

Por la presencia de PNM en el adulto, la ZSV y el BO constituyen dos sistemas experimentales modelo para el abordaje y estudio de los problemas de degeneración y regeneración neural del SNC (Álvarez-Buylla *et al.*, 2002a; Okano, 2002).

Regulación de la diferenciación celular neural

En el transcurso del desarrollo embrionario, la proliferación y diversificación de las PNM, así como la definición de su destino celular a lo largo del linaje neuroectodér-

mico, recae tanto en **factores intrínsecos** al tipo celular, mediante la activación de vías de señalización intracelular que culminan en el núcleo modulando la transcripción génica (Sauvageot *et al.*, 2002), como en **señales extracelulares**, que dependen de la localización espacio-temporal (Jessell *et al.*, 2000) y que incluyen: factores de crecimiento, moléculas de señalización y proteínas de matriz extracelular, que controlan en conjunto la proliferación y diferenciación de las PNM (Alvarez-Buylla *et al.*, 2002a; Cameron *et al.*, 1991; Fanarraga, 1999; Gritti *et al.*, 1999; Vaccarino *et al.*, 2001).

Por otro lado, las CP presentan una gran plasticidad y recientemente se ha demostrado que su transdiferenciación es posible, es decir, la capacidad de una célula de dar origen a otra de distinta capa embrionaria de la cual ella misma proviene. Lo anterior entró en franca oposición al concepto clásico de la especificidad celular, que consideraba que las células de un órgano estaban restringidas a producir únicamente los tipos celulares propios de determinado órgano o linaje celular.

Investigaciones recientes indican que las PNM pueden transdiferenciarse como precursores hematopoyéticos y viceversa (Josefson, 1999; Bjornson *et al.*, 1999; Vescovi *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2003; Udani VM, 2006; Montzka K *et al.*, 2009). Este hallazgo genera la posibilidad de que la diferenciación de las CP adultas pueda ser dirigida para favorecer la regeneración o reparación de diversos tejidos dañados, incluso para reconstituir sistemas completos, como el sistema inmune. Además, el problema del rechazo de los trasplantes podrá superarse si se emplean células precursoras del mismo individuo.

Las CP del adulto serían capaces, en teoría, de reconstituir el sistema inmune y neural embrionario. Sin embargo, las PNM, tanto embrionarias como del adulto, requieren mucho más tiempo para repoblar a la médula ósea que cuando se emplean pre-

cursores hematopoyéticos, lo cual refleja la dificultad de redefinirse y transdiferenciarse (Josefson, 1999). El fenómeno de la transdiferenciación se ha descrito en muy pocos casos aún, por lo que continuar con las investigaciones en este sentido despliega amplias perspectivas de terapia celular. Lo más difícil es conseguir la especificidad celular mediante la diferenciación inducida.

La forma en que las PNM traducen o interpretan la información que las lleva a su diferenciación aún no es clara, sin embargo se ha descrito cierta correspondencia con la temporalidad del desarrollo, ya que las capacidades neurogénicas o gliogénicas de las PNM varían a lo largo de las diferentes etapas del desarrollo (Qian *et al.*, 2000). Este proceso puede orquestarse de manera que se obtengan resultados diferentes, dependiendo de las señales que las células reciban. Así pues, la aparición secuencial de neuronas y células gliales en el SNC de vertebrados puede estar guiada por la competición entre vías de señalización activadas por factores tróficos, así como por la combinación de factores de transcripción que responden a los mismos (Sauvageot *et al.*, 2002). De ahí que, debido a la gran cantidad de factores involucrados así como a la complejidad de sus interacciones, resulte relevante y necesario realizar un abordaje integral que permita establecer estos factores en su conjunto.

Se han identificado sistemas de regulación positivos y negativos que controlan el destino glial de las PNM. Los reguladores negativos mantienen a las PNM indiferenciadas, e incluyen principalmente a los componentes de la vía de señalización de Notch, así como algunos factores de crecimiento tales como el EGF y el FGF-básico (FGF-2) (Alvarez-Buylla *et al.*, 2002a; Fanarraga, 1999).

Los reguladores positivos, por su parte, diferencian a las PNM y las comprometen con un determinado destino; por ejemplo, la acción de gp130/JAK/Stat3 y la vía de señalización de las proteínas morfogénicas de hueso (BMP por sus siglas en in-

glés “*bone morphogenetic protein*”) inducen la diferenciación hacia astrocitos (Heins *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2001), mientras que el PDGF induce la diferenciación hacia oligodendrocitos. Es importante mencionar que las vías de señalización Notch y gp 130 están involucradas tanto en la regulación negativa como en la positiva de la diferenciación de los astrocitos. Así entonces, la diferenciación de las PNM está condicionada temporal y espacialmente con respecto al momento cronológico de la neurogénesis o gliogénesis, es decir, el microambiente *in situ* que los rodea (Fanarraga, 1999; Vaccarino *et al.*, 2001).

La diferenciación celular a partir de PNM resulta de gran importancia, ya que facilita la respuesta tisular, como por ejemplo la necesidad de producción de neuronas o células gliales ante cambios fisiológicos o bien ante lesiones. El conocimiento de los mecanismos celulares, activados por factores extracelulares en diferentes contextos, ayudará a lograr una mejor comprensión del control de la diferenciación celular, así como el desarrollo de métodos de intervención buscando dirigir la formación de ciertos tipos celulares particulares. Las PNM en el cerebro adulto pueden ser usadas como una fuente de células para el trasplante neuronal. Además, estas células podrían ser manipuladas *in vivo* o *in vitro* permitiendo la terapia génica. La neurogénesis y gliogénesis adulta ofrecen nuevas oportunidades experimentales de estudiar el origen neuronal y glial, la migración y diferenciación celular, así como explorar el posible tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Inducción de la diferenciación de PNM hacia células de fenotipo glial

En relación con los procesos involucrados en la diferenciación celular en el SNC, la identificación y el conocimiento de los mecanismos que median la diferenciación de neuronas y células gliales, proveerá la información necesaria para guiar la neurogénesis y la gliogénesis, tanto durante el desarrollo embrionario como en el organismo adulto, así

como para el tratamiento de padecimientos neurodegenerativos, como las enfermedades de Alzheimer, Parkinson, Huntington, la esclerosis múltiple e incluso el tratamiento de tumores, diabetes y embolias (McKay, 2004; Leker *et al.*, 2004; Lindvall *et al.*, 2004a; Lindvall *et al.*, 2004b; Lindvall *et al.*, 2004c).

Se suele estudiar el proceso de diferenciación neural con fines de reemplazo de las neuronas perdidas en las enfermedades neurodegenerativas, sin embargo, consideramos importante tomar en cuenta de igual forma el estudio de la diferenciación glial, ya que fenotipos como la GE del BO han demostrado su gran utilidad en los procesos de reparación neural (Raisman, 2007; Raisman *et al.*, 2007). La GE del BO es considerada el prototipo de un fenotipo glial que recién comienza a reconocerse: la aldainoglia, que se ha descrito como promotora de crecimiento neuronal (Gudiño-Cabrera *et al.*, 1999; Gudiño-Cabrera *et al.*, 2000). Durante el desarrollo embrionario, se reconoce que las células de GE del BO emergen de la placoda olfatoria. La placoda olfatoria desciende de una porción de células localizadas en la zona anterolateral de la lámina neural, de donde las GE tienen su origen (Langman *et al.*, 1994). En el BO adulto, las células precursoras presentan una migración a partir del estrato de células gliales granulares hacia el glomérulo, en donde se diferencian en neuronas (Raisman, 2001). Por otro lado, se ha demostrado que el BO presenta un constante reemplazo celular neuroglial (Altman, 1969; Graziadei *et al.*, 1978); ello podría deberse a la influencia de la GE, la cual podría estimular su propia diferenciación a partir de las CP presentes en el BO adulto.

Para estudiar el control de la diferenciación de la GE, recientemente hemos inducido este proceso *in vitro* en células PNM, obtenidas de embriones de rata, utilizando un medio de cultivo condicionado previamente por ésta glía (Figura 2) (Rojas-Mayorquín *et al.*, 2008; Rojas-Mayorquín *et al.*, 2010).

Hemos estudiado el perfil de la expresión génica entre las tres poblaciones celulares

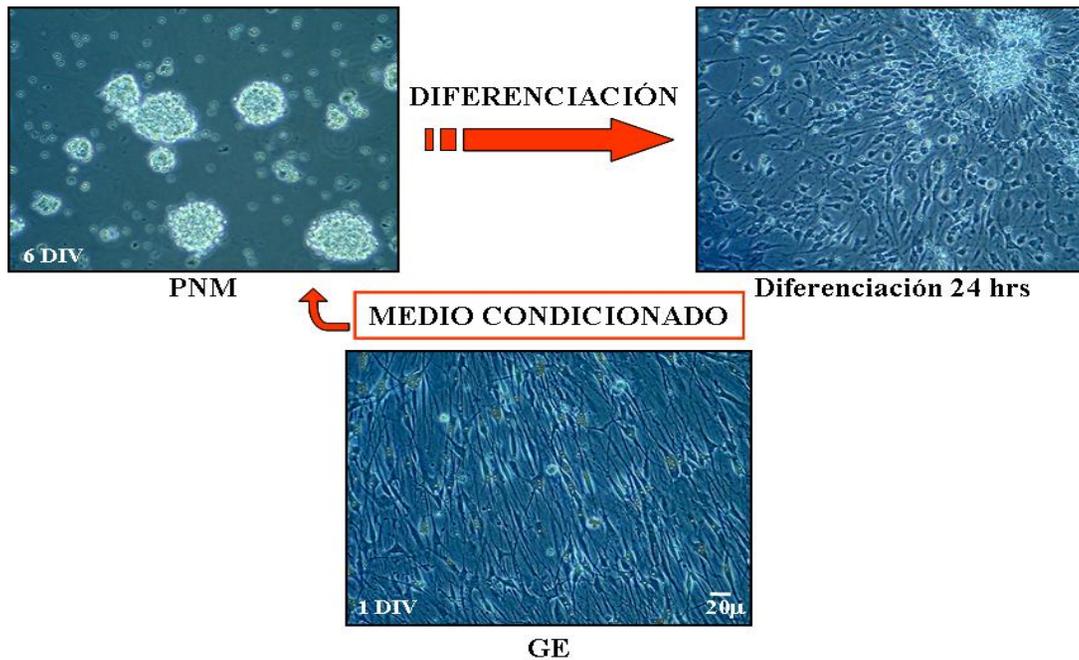


Figura 2. Modelo experimental para la inducción de la diferenciación de PNM *in vitro*. Se realizan cultivos de glía envolvente (GE) inmunopurificada, de los cuales se obtiene el medio condicionado, con el que posteriormente se induce la diferenciación de células precursoras neurales multipotenciales (PNM) embrionarias, cultivadas como neuroesferas. Después de 24 h la gran mayoría de las células presentan un fenotipo similar a la GE y co-expresan GFAP y p75 (Rojas-Mayorquín *et al.*, 2008; Rojas-Mayorquín *et al.*, 2010). DIV – días *in vitro*.

así obtenidas; GE, PNM y PNM diferenciadas. Nuestros resultados muestran que el fenotipo de la GE del BO comparte su perfil de expresión génica con las células de Schwann, del sistema nervioso periférico y con los astrocitos del SNC, lo que las hace más parecidas entre sí que con los oligodendrocitos, aunque con estos también comparte la expresión de algunos genes. Por otro lado, siguiendo el proceso de diferenciación, observamos un incremento en la expresión de ciertos genes que sugieren que la vía de señalización Wnt se inactivaría durante el proceso de diferenciación inducida, en tanto que podría activarse una vía de señalización mediada por BMP (Figura 3) (Rojas-Mayorquín *et al.*, 2008; Rojas-Mayorquín *et al.*, 2010). Además, hemos propuesto cuatro genes; Tn-C, Igfbp-5, COX1 y CNPase, como característicos del fenotipo de la GE del BO y que

eventualmente podrían participar de manera específica en su proceso de diferenciación (Rojas-Mayorquín *et al.*, 2010).

Terapia celular para las enfermedades neurodegenerativas. Retos y perspectivas.

Las CP no constituyen actualmente una terapia común para las enfermedades neurodegenerativas y aún está en estudio su capacidad para repoblar tejidos. Sin embargo, las evidencias experimentales en modelos animales y los primeros ensayos clínicos prueban que es factible pensar en las CP como una alternativa terapéutica a mediano plazo (Rossant, 2004).

Las CP derivadas de embriones poseen un mayor potencial de crecimiento en

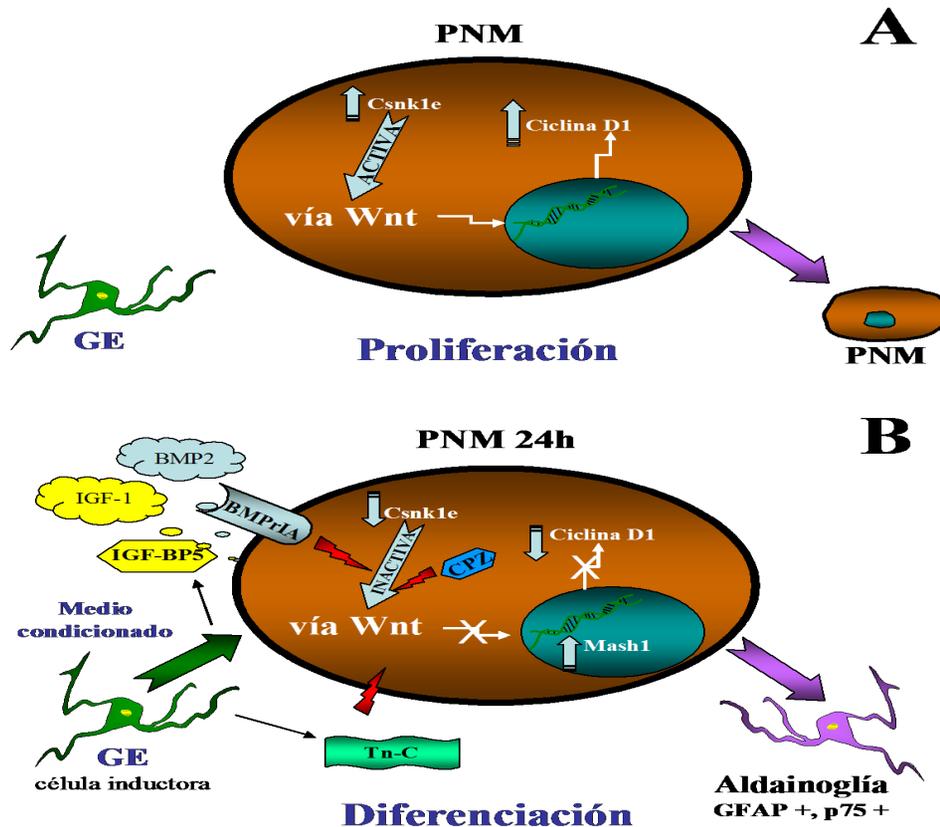


Figura 3. Modelo hipotético de la diferenciación inducida de PNM hacia células de fenotipo aldainoglial. A – Cuando la PNM está proliferando expresa niveles elevados de Csnk1e y de ciclina D1, lo cual puede indicar una activación de la vía de señalización de Wnt (Rojas Mayorquín *et al.*, 2008). B – El medio condicionado de la GE induce en las PNM la expresión de una isoforma de tenascina C (Tn-C), así como de IGF-BP5, además de inducir el incremento en la expresión de BMP1A y de la carboxipeptidasa Z (CPZ), todo lo cual puede inactivar la vía de Wnt. Por otra parte, induce el incremento en la expresión de Mash1, así como la disminución de la expresión de Csnk1e y de ciclina D1, lo cual puede dirigir la diferenciación de la PNM hacia una célula de fenotipo aldainoglial (Rojas-Mayorquín *et al.*, 2008; Rojas-Mayorquín *et al.*, 2010).

comparación con las derivadas de individuos adultos. Sin embargo, su estudio y manipulación continúan siendo muy controversiales. Es por ello que se ha incrementado la identificación y caracterización de las CP del adulto provenientes de diversos tejidos, como el hematopoyético, mesenquimal, epitelial, pancreático y de otros órganos (Sanberg *et al.*, 2005).

Como ya mencionamos, en los mamíferos adultos las CP están presentes en diversos órganos, que incluyen la médula ósea, el músculo esquelético, intestino delgado, hígado, epidermis y retina, entre otros. Sin embargo, actualmente la disponibilidad

de CP de tejido neural en el humano es extremadamente limitada, debido a su difícil localización *in situ* y su aún más complicada obtención, ya que sólo puede obtenerse *posmortem*. De ahí que actualmente se estén desarrollando estrategias alternas para su obtención, como la diferenciación celular dirigida (Rojas-Mayorquín *et al.*, 2008; Rojas-Mayorquín *et al.*, 2010).

El uso potencial de las CP para la reparación funcional de tejidos lesionados incluye el trasplante para lograr recuperar poblaciones celulares específicas, o bien la activación de las CP endógenas para con-

seguir una auto-reparación. Sin embargo, los mecanismos que regulan su diferenciación endógena apenas comienzan a conocerse. La investigación de las CP y su posible uso en terapias va de la mano con el estudio de las patologías a las que se pueden aplicar, ya que por el momento, la mayor aspiración en el campo de la terapia celular, es paliar o reparar el daño local, mas no aún evitar la progresión de la enfermedad. Por ejemplo, en la enfermedad de Parkinson, en la que no es posible con un solo trasplante celular, reparar todas las conexiones que se hayan perdido.

Conclusiones

Para aspirar a estos logros, es importante superar la barrera de los modelos experimentales; desde los modelos *in vitro*, pasando por los modelos *in vivo* y posteriormente el reto es llevar esos resultados a la terapia humana. Justamente por esta razón deben conocerse, con la mayor precisión posible, los mecanismos de regulación de la diferenciación celular de las CP, pues solo así se podrá completar el conocimiento básico que derive en una futura y exitosa aplicación terapéutica.

Literatura Citada

- Albert MR, Foster RA, Voguel JC. Murine epidermal label-re-taining cells isolated by flow cytometry do not express the stem cell markers CD34, Sca-1, or Flk-1. *Journal of Investigative Dermatology* 2001; 117: 943-948.
- Altman J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *The Journal of Comparative Neurology* 1969; 137: 433-457.
- Álvarez-Buylla A, Lois C. Neuronal stem cells in the brain of adult vertebrates. *Stem Cells* 1995; 13: 263-272.
- Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM. Neurogenesis in adult subventricular zone. *The Journal of Neuroscience* 2002a; 22: 629-634.
- Álvarez-Buylla A, Seri B, Doetsch F. Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. *Brain Research Bulletin* 2002b; 57: 751-758.
- Bjornson C, Rietze R, Reynolds B, Magli MC, Vescovi AL. Turning Brain into Blood: A Hematopoietic Fate Adopted by Adult Neural Stem Cells *in Vivo*. *Science* 1999; 283: 534-537.
- Blakemore WF, Jolly RD. The subependymal plate and associated ependyma in the dog. An ultrastructural study. *Journal of Neurocytology* 1972; 1: 69-84.
- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB *et al*. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells (comment). *Science* 1998; 279: 349-352.
- Cameron RS, Rakic P. Glial cell lineage in the cerebral cortex: a review and synthesis. *Glia* 1991; 4: 124-137.
- Campbell K, Gotz M. Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends in Neurosciences* 2002; 25: 235-238.
- Fanarraga ML. Las neuroesferas como fuente celular para la reparación del sistema nervioso central. *Revista de Neurología* 1999; 28: 885-888.

- Fraichard A, Chassande O, Bilbaut G, Dehay C, Savatier P, Samarut J. *In vitro* differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. *Journal of Cell Science* 1995; 108: 3181-3188.
- Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science* 2000; 287: 1433-1438.
- Garcia-Verdugo JM, Doetsch F, Wichterle H, Lim DA, Álvarez-Buylla A. Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells. *Journal of Neurobiology* 1998; 36: 234-248.
- Graziadei PP, Monti Graziadei GA. The olfactory system: a model for the study of neurogenesis and axon regeneration in mammals. En: Cotman, C.W. (Ed.), *Neuronal Plasticity*, Raven Press, 1978, NY (USA).
- Gritti A, Frolichsthal-Schoeller P, Galli R, Parati EA, Cova L, Pagano SF *et al.* Epidermal and fibroblast growth factors behave as mitogeni regulators for a single multipotent stem cell-like population from the subventricular region of the adult mouse forebrain. *The Journal of Neuroscience* 1999; 19: 3287-3297.
- Gudiño-Cabrera G, Nieto-Sampedro M. Estrogen receptor immunoreactivity in schwann-like brain macroglia. *Journal of Neurobiology* 1999; 40: 458-470.
- Gudiño-Cabrera G, Nieto-Sampedro M. Schwann-like macroglia in adult rat brain. *Glia* 2000; 30: 49-63.
- Heins N, Cremisi F, Malatesta P, Gangemi RM, Corte G, Price J *et al.* *Emx2* promotes symmetric cell divisions and a multipotential fate in precursors from the cerebral cortex. *Molecular and Cellular Neuroscience* 2001; 18: 485-502.
- Hu H, Tomasiwicz H, Magnuson T, Rutishauser U. The role of polysialic acid in migration of olfactory bulb interneuron precursors in the subventricular zone. *Neuron* 1996; 16: 735-743.
- Jahagirdar BN, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cell and stem cell plasticity. *Stem Cell Reviews* 2005; 1: 53-59.
- Jessell TM, Sanes JR. Development. The decade of the developing brain. *Current Opinion in Neurobiology* 2000; 10: 599-611.
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418: 41-49.
- Josefson D. Adult stem cells may be redefinable. *British Medical Journal* 1999; 318: 282 B.
- Kalthoff K. Cell Differentiation (capítulo 19). En: *Analysis of biological development*. Mc Graw Hill, Texas University, Austin, 1996.
- Kondo T, Raff M. Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. *Science* 2000; 289: 1754-1757.
- Langman J, Sadler TW. *Embriología médica*, 6a edición. Ed. Panamericana 1994.

- Leker RR, McKay RD. Using endogenous neural stem cells to enhance recovery from ischemic brain injury. *Current Neurovascular Research* 2004; 1: 421-427.
- Levison SW, Chuang C, Abramson BJ, Goldman JE. The migrational patterns and developmental fates of glial precursors in the rat subventricular zone are temporally regulated. *Development* 1993; 119: 611-622.
- Lewis RA. *Discovery, windows of life science*. Malden MA. Blackwell Science 2001.
- Lindvall O, Bjorklund A. Cell therapy in Parkinson's disease. *NeuroRx* 2004a; 1: 382-393.
- Lindvall O, Kokaia Z. Recovery and rehabilitation in stroke: stem cells. *Stroke* 2004b; 35: 2691-2694.
- Lindvall O, Kokaia Z, Martinez-Serrano A. Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work. *Nature Medicine* 2004c; 10: S42-50.
- McConnell SK. Strategies for the generation of neuronal diversity in the developing central nervous system. *The Journal of Neuroscience* 1995; 75: 6987-6998.
- McDermott KW, Lantos PL. Cell proliferation in the subependymal layer of the postnatal marmoset, *Callithrix jacchus*. *Brain Research Developmental Brain Research* 1990; 57: 269-277.
- McGraw-Hill. *Concise Encyclopedia of Science and Technology*. 5th ed. NY (USA) McGraw- Hill Professional 2005: 2112-2113.
- McKay RD. Stem cell biology and neurodegenerative disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 2004; 359: 851-856.
- McKay RD. Stem cells in the central nervous system. *Science* 1997; 276: 66-71.
- Merkle FT, Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101: 17528-17532.
- Metcalf D. Clonal analysis of proliferation and differentiation of paired daughter cells: action of granulocyte-macrophage colony stimulating factor on granulocyte-macrophage precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1980; 77: 5327-5330.
- Metcalf D. Lineage commitment of hematopoietic progenitor cells in developing blast cells colonies: influence of colony-stimulating factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991; 88: 1131-1134.
- Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, Martin P, Davis D, Morales L *et al*. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and NRI. *Stem Cell* 2002; 21: 50-60.
- Montzka K, Lassonczyk N, Tschöke B, Neuss S, Führmann T, Franzen R *et al*. Neural differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: misleading marker gene expression. *BMC Neuroscience*. 2009; 10: 16.

- Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 1997; 88: 287-298.
- Morrow T, Song MR, Ghosh A. Sequential specification of neurons and glia by developmentally regulated extracellular factors. *Development* 2001; 128: 3585-3594.
- Nieto MA. The early steps of neural crest development. *Mechanisms Development* 2001; 105: 27-35
- Ogawa M. Hematopoietic stem cells. Stochastic differentiation and humoral control of proliferation. *Environmental Health Perspectives* 1989; 80: 199-207.
- Ortuño-Sahagún D, Rojas-Mayorquín AE, Camins A, Pallàs M. Embryonic neural stem cell differentiation to oligodendrocytes induced by olfactory ensheathing cell conditioned medium. En: *Embryonic stem cells: The hormonal regulation of pluripotency and embryogenesis*, Craig Atwood (Editor). ISBN 978-953-307-196-1. Editorial In Tech, 2011.
- Okano H. Neural stem cells: progression of basic research and perspective for clinical application. *The Keio Journal of Medicine* 2002; 51: 115-128.
- Qian X, Shen Q, Goderie SK, He W, Capela A, Davis AA *et al.* Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. *Neuron* 2000; 28: 69-80.
- Quiñones-Hinojosa A, Sanai N, Soriano-Navarro M, Gonzalez-Perez O, Mirzadeh Z, Gil-Perotin S *et al.* Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. *The Journal of Comparative Neurology* 2006; 494: 415-434.
- Raff M. Adult stem cell plasticity: fact or artifact? *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2003; 19: 1-21.
- Raisman G, Li Y. Repair of neural pathways by olfactory ensheathing cells. *Nature Reviews Neuroscience* 2007; 8: 312-319.
- Raisman G. Olfactory ensheathing cells-another miracle cure for spinal cord injury?. *Nature Reviews Neuroscience* 2001; 2: 369-374.
- Raisman G. Repair of spinal cord injury by transplantation of olfactory ensheathing cells. *Comptes Rendus Biologies* 2007; 330: 557-560.
- Rojas-Mayorquín AE, Torres-Ruiz NM, Gudiño-Cabrera G, Ortuño-Sahagún D. Subtractive hybridization identifies genes differentially expressed by olfactory ensheathing cells and neural stem cells. *International Journal of Developmental Neuroscience* 2010; 28: 75-82
- Rojas-Mayorquín AE, Torres-Ruiz NM, Ortuño-Sahagún D, Gudiño-Cabrera G. Microarray analysis of striatal embryonic stem cells induced to differentiate by ensheathing cell conditioned media. *Developmental Dynamics* 2008; 237: 979-994.
- Rossant, J. En: *Handbook of Stem Cells*. Eds. Elsevier Academic Press. London 2004.

- Sanberg PR, Willing AE, Garbuzova-Davis S, Saporta S, Liu G, Sanberg CD *et al.* Umbilical cord blood-derived stem cells and brain repair. *Annals of the New York Academy of Science* 2005; 1049: 67-83.
- Sauvageot CM y Stiles CD. Molecular mechanisms controlling cortical gliogenesis. *Current Opinion in Neurobiology* 2002; 12: 244-249.
- Spassky N, Merkle FT, Flames N, Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *The Journal of Neuroscience* 2005; 25: 10-18.
- Suda T, Suda J, Ogawa M. Disparate differentiation in mouse hematopoietic colonies derived from paired progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1984; 81: 2520-2524.
- Sun Y, Nadal-Vicens M, Misono S, Lin MZ, Zubiaga A, Hua X *et al.* Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell* 2001; 104: 365-376.
- Sun ZH, Lai YL, Zeng WW, Zhao D, Zuo HC, Xie ZP. Neural stem/progenitor cells survive and differentiate better in PD rats than in normal rats. *Acta Neurochirurgica Supplementum* 2003; 87: 169-174.
- Temple S. Embryonic stem cell self-renewal, analyzed. *Cell* 2003; 115: 247-248.
- Udani VM. The continuum of stem cell transdifferentiation: possibility of hematopoietic stem cell plasticity with concurrent CD45 expression. *Stem Cells and Development*. 2006; 15: 1-3.
- Vaccarino FM, Ganat Y, Zhang Y, Zheng W. Stem cells in neurodevelopment and plasticity. *Neuropsychopharmacol* 2001; 25: 805-815.
- Vaziri H, Dragowska W, Allsopp RC, Thomas TE, Harley CB, Lansdorp PM. Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994; 21: 9857-9860.
- Vescovi AL, Galli R, Gritti A. The neural stem cells and their transdifferentiation capacity. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2001; 55: 201-205.
- Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science* 2000; 287: 1442-1446.
- Zerlin M, Levison SW, Goldman JE. Early patterns of migration, morphogenesis, and intermediate filament expression of subventricular zone cells in the postnatal rat forebrain. *The Journal of Neuroscience* 1995; 15: 7238-7249.
- Zhao Y, Glesne D, Huberman E. A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; 100: 2426-2431.