



Real Academia de Doctores de España

CONSTRUYENDO UN CEREBRO:
DE LAS BACTERIAS AL *HOMO SAPIENS*

DOCTORA D^a. MARÍA TERESA MIRAS PORTUGAL

Académica de Número de la Sección de Farmacia

Excmo. Sr. Presidente de la Real Academia de Doctores de España.

Excmos. Sres. Miembros de la Junta de Gobierno de esta Academia.

Excmas. Señoras Académicas, Excmos. Señores Académicos.

Distinguidas Autoridades.

Señoras y Señores.

Sean mis primeras palabras para agradecer sinceramente a la Junta de Gobierno de la Real Academia de Doctores de España y a mis compañeros Académicos de la Sección de Farmacia, su encargo para pronunciar el discurso inaugural del Curso 2019-2020.

Ciertamente es un gran honor y supone también un gran reto aceptar el encargo, tanto por los excelentes discursos de los compañeros Académicos que me han precedido, como la elección del tema, que siendo de mi área de conocimiento, discurra con los matices culturales comunes a todos los miembros de las distintas secciones, disfrutando así del conocimiento con un lenguaje común.

Después de muchas vueltas y dudas, mi cerebro tras poner en marcha la conexión de múltiples circuitos y tomando en consideración pasadas experiencias y conocimientos para elaborar el pensamiento final, decidió en un instante el título.

Generalmente el pensamiento lo expresamos hablando, pero somos una nueva “subespecie” de *homo sapiens* que ha conseguido leer y escribir y eso ha modificado nuestro cerebro. Independientemente de la edad en que se adquiera esa capacidad, la lectura refuerza la respuesta cerebral y activa toda la red del lenguaje hablado y las áreas occipitales de la visión. Aspectos tan sumamente complejos que necesitarán todavía años para ser comprendidos

en su totalidad. Al final, la descripción perfecta e intuitiva de este proceso la plasmó nuestro gran poeta Don Francisco de Quevedo:

...y a nuestra libre voluntad es dado numerosa elección, y transitoria...
(*El Parnaso*).

Sin duda a los poetas se les entiende siempre mucho mejor que a la mayoría de los científicos.

1. INTRODUCCIÓN

El tema escogido, por libre voluntad, lleva por título: Construyendo un cerebro: de las bacterias al *Homo Sapiens*.

Una de las características esenciales de nuestro cerebro es la posibilidad de comunicar sus diferentes áreas y núcleos mediante cableados por los que circulan las corrientes eléctricas que mueven, de modo altamente selectivo, los iones salinos, los mismos contenidos en el agua del mar y a concentraciones casi idénticas. Llevamos el mar dentro de nuestra piel protectora, pues ha sido nuestro hogar de partida. Ese logro evolutivo proviene de las membranas celulares que han incorporado canales iónicos. Dicho así, parece algo inalcanzable a la comprensión, pero si fraccionamos el problema, dejamos de considerarnos el centro de todo el universo y nos miramos con mucha humildad, veremos que formamos una unidad continua de la vida y que los organismos más simples son esenciales para comprender nuestros procesos más complejos.

Es difícil conocer cómo fue el origen de nuestro sistema nervioso, del cual el cerebro actual es aparentemente la parte más compleja, no tenemos un registro paleo-arqueológico ya que los tejidos blandos no fosilizan, o lo hacen en ambientes excepcionales. Pero es posible estudiar a los seres vivos más sencillos que muestran alguna de las propiedades de los tejidos nerviosos. Sirvan como ejemplo la presencia de los primeros canales iónicos en las

bacterias, los canales sensores de ácidos, que permiten a la bacteria alejarse de un entorno hostil. Curiosamente su estructura primitiva tiene gran semejanza con los receptores ionotrópicos de nucleótidos, los P2X, siendo sin duda sus homólogos en el sistema nervioso de aves y mamíferos. Se suman a ellos los más simples y arcaicos de los canales de potasio y el canal de sodio epitelial.

A los canales iónicos bacterianos hay que añadir otros muchos ejemplos, todos ellos demuestran que la incorporación al puzzle de nuestro genoma de una serie de genes esenciales para el funcionamiento cerebral, son procedentes de los primigenios organismos unicelulares. Uno de esos genes es el de la bacteriorodopsina, utilizada con los más diversos fines y que por ello merece un capítulo aparte.

Profundizaremos en los elementos, que desde lo más arcaico en el desarrollo de la vida en la tierra, son esenciales en el funcionamiento de nuestro sistema nervioso.

2. BACTERIORODOPSINA, FOTORECEPTORES, SIMIOS, LA SEPARACIÓN DE LOS CONTINENTES Y LA VIEIRA.

La bacteriorodopsina aparece en las bacterias más antiguas, las *Archea*. La presencia de esta proteína y sus homólogas es generalizable a todos los organismos vivos que detectan la luz. Todas ellas tienen en su estructura asociada una molécula de retinal que es el auténtico compuesto que cambia de conformación con los fotones lumínicos. El retinal, o su alcohol el retinol, Vitamina A, es un derivado de los carotenoides, que colorean nuestras frutas y hortalizas, desde el naranja al rojo y violáceo. Algunas de las familias bacterianas que capturan la energía luminosa gracias a esta proteína, son capaces de bombear protones a través de la membrana plasmática para crear un gradiente que posteriormente se convierte en energía química, cuyo representante más genuino y conocido es la adenosina trifosfato, ATP. Es un modesto prototipo de lo que luego serían nuestras mitocondrias y los cloroplastos que al realizar la fotosíntesis dan salud al planeta.

2.1. Bacteriorodopsina, opsinas y fotoreceptores.

La bacteriorodopsina es similar a las opsinas de los vertebrados. Estas proteínas están presentes en nuestro sistema visual, que contiene cuatro tipos diferentes. El primer tipo es el de la rodopsina que se encuentra en las células periféricas de la retina denominados bastoncillos, capta la luz de modo muy eficiente y convierte la energía luminosa de un fotón en un movimiento atómico. Las otras tres proteínas fotoreceptoras, son las opsinas presentes en los conos, son menos eficientes y tienen una localización más central en la retina, donde se recibe más luz. Recordar que la retina es parte de nuestro cerebro y la única parte que podemos ver.

La inmensa mayoría de los mamíferos tiene una visión en tonos sepia. En nuestro origen, durante la época de los dinosaurios y hasta su extinción, éramos omnívoros y carroñeros, parecidos a los pequeños roedores nocturnos. Actualmente, 60 millones de años más tarde, nosotros, los humanos, somos unos privilegiados, conjuntamente con gorilas, chimpancés, bononos y orangutanes. Somos los grandes simios, el grupo de monos sin cola capaces de ver el mundo en color, pues poseemos los tres ftopigmentos, opsinas, capaces de captar la luz con longitud de onda: azul, verde o rojo. Todos ellos tienen unido un derivado de la Vitamina-A, el retinal, que es el que realmente capta la luz y cambia de conformación (Brown L. S., 2013). El resto de monos y todos los demás mamíferos, carecen de la opsina fotoreceptora para captar el rojo.

2.2. Filogenia de los ftopigmentos: adaptación y evolución.

Actualmente conocemos la filogenia de los ftopigmentos, después de que más de mil opsinas hayan sido identificadas, y sus genes clonados y secuenciados (Koyanagi M. & Terakita A., 2014). Todos sin excepción tienen el mismo origen evolutivo, proceden de un gen bacteriano primigenio, perteneciendo a la inmensa familia de receptores de siete hélices transmembranares, también conocidos como receptores acoplados a proteínas G, GPCR. Las opsinas de los fotoreceptores presentan grandes variaciones en la longitud

de onda que capta su sistema visual, que depende del ambiente en que se desarrolla su vida. Podemos enumerar un amplio catálogo: ambientes marinos, más o menos profundos, o con turbidez, animales con actividad más o menos diurna o nocturna, en cada uno de esos ambientes el proceso evolutivo ha seleccionado a aquellos que se han adaptado y la capacidad de ver es un elemento esencial de la adaptación al medio (Hauser F. E. & Chang B. S., 2017).

Las proteínas fotoreceptoras, como todos los receptores acoplados a proteínas G, necesitan transmitir la señal que han captado y pasar la información a una amplia familia transductora de la señal que son las proteínas G: GT, Gi, Go, Gs, Gq. Estas proteínas a su vez interaccionan con otros elementos del sistema visual para abrir los canales iónicos que posteriormente producen la señal despolarizante que lleva a la transmisión de la corriente eléctrica. Este tipo de receptores son los sensores más abundantes que captan señales químicas y físicas. Son nuestros conectores con el medio ambiente del mundo en que crecemos, lo han sido de los mundos ya extintos y lo serán de los mundos por venir. Como farmacéuticos señalar que son las dianas terapéuticas de la gran mayoría de los fármacos recetados.

2.3. Mamíferos, grandes simios, otros animales y la separación de los continentes.

La retina es la parte del sistema nervioso que capta la luz en el ojo, órgano del que existe una gran diversidad de formas. Los humanos, chimpancés y gorilas, tenemos la rodopsina en los conos que ocupan la parte más externa de la retina, a la que llega menos intensidad de luz y los tres fotopigmentos para los colores dispuestos más centralmente en los respectivos conos. De este modo, envían señales separadas en los correspondientes haces nerviosos al córtex occipital. La integración de estas señales, nos permite ver en color. Los humanos y los grandes simios, no somos los seres vivos mejor dotados para la visión. Comparados con las aves, sirvan de ejemplo el águila o la paloma, tienen seis fotopigmentos, los nuestros y además otro duplicado del azul y uno más para el violeta. Es tal su capacidad visual de precisión y detalle que en el caso de las palomas y las águilas son consideradas como ojos con alas.

De todos modos nuestra ventaja evolutiva respecto a otros mamíferos y a nuestros parientes, los monos con cola, solamente se debe a que tenemos un fotopigmento adicional para el color rojo, del que ellos carecen. No obstante, este hecho singular bien merece un comentario que nos haga pensar sobre el cúmulo de casualidades que han permitido nuestra evolución. Generalmente, cuando ganamos algo valioso, puede suceder que perdamos, desde el punto de vista evolutivo, algo también valioso, pero que al utilizarlo menos ya no resulta tan esencial.

Hace unos 30-35 millones de años se produjo la separación definitiva de los continentes. En América los monos conservaron su cola prensil. En África y Eurasia, parte de los monos perdieron la cola y evolucionaron drásticamente, de modo que hace unos 10 millones de años, de un linaje común se separó el Gorila y hace seis millones de años se separaron el chimpancé y los humanos. La presencia de un nuevo fotoreceptor para el rojo y la gran analogía de secuencia que comparte con el fotopigmento para el verde, indica que este gen se duplicó en una fecha anterior a los 10 millones de años del antepasado común y después de la separación definitiva de los continentes, unos 35 millones de años antes. Nosotros los humanos y grandes simios tenemos ambos receptores localizados en el cromosoma X.

Se ha tratado de explicar la pérdida de capacidad olfativa en los humanos por la menor necesidad y dependencia de este sentido para la supervivencia, ya que habían adquirido el fotopigmento rojo que hacían más sensibles y más ricas las sensaciones visuales. Curiosamente, esta hipótesis se ha visto avalada por el hecho de que los monos americanos, que nunca perdieron su cola prensil, sólo tienen dos fotopigmentos, uno para el azul y otro para el verde, pero no para el rojo y conservan activos todos sus receptores olfativos, en número similar a los ratones y perros, que rondan los 1000 receptores olfativos plenamente funcionales. Mientras que, por ejemplo, en el gorila, el 50 por 100 de los genes de sus receptores olfativos no son funcionales, son pseudogenes, lo mismo que ocurre en el chimpancé. La máxima pérdida se alcanza en los humanos donde los genes olfativos funcionales alcanzan escasamente un 30%, es decir aproximadamente unos 300 receptores funcionales, siendo

el resto pseudogenes (Linda Buck y Richard Axel, discursos de Premios Nobel de Medicina, 2004; Buck L. & Axel R., 1991; Buck L., 2005; Chess et al., 1992; Gore et al., 2015; Hayden S. & Teeling E. C., 2014).

El gran poder de discriminación del sistema olfativo de las ratas hace que se las adiestre para detectar explosivos y agentes tóxicos, o drogas, lo mismo que a los perros. En una encantadora película de Disney, la ratita Remy sueña con ser un gran chef, y después de muchas vicisitudes, con su proverbial olfato, ayuda a su amigo Alfred carente de la mínima disposición para la cocina, y completamente anósmico, a preparar la más sabrosa “ratatouille”, es decir, un buen pisto manchego, que conquista al más exigente de los críticos culinarios de París. Es ficción, pero bien podría ser cierto... en un futuro.

2.4. Ojos de vieira y telescopios reflectores.

Los ojos de la mayoría de las criaturas en este planeta, incluyendo los humanos, usan lentes, para enfocar la luz. En nuestro caso esas lentes se llaman cornea y cristalino, y se encargan de enfocar la luz en nuestra retina. De esta manera funcionan nuestros ojos y vemos lo próximo y lo lejano. Nuestras capacidades visuales dentro del grupo de los mamíferos son bastante buenas. Pero todo es relativo y comparados con las aves, como he mencionado con anterioridad, somos poca cosa.

Nuestro compañero de la Real Academia Nacional de Farmacia, el Dr. Jesús Pintor, que nos ha dejado recientemente, era un gran experto en funcionamiento y patologías oculares y a él debo el conocimiento de este extraño caso que presentan los exquisitos bivalvos de nuestras costas gallegas, denominados vieiras, *Pecten maximus*. Sé que a él le hubiera gustado que lo compartiera con todos ustedes. Durante más de dos siglos, los científicos naturalistas estuvieron fascinados por la presencia de más de 200 ojos diminutos en el manto de cierre que bordea las conchas de las vieiras. Cada ojo tiene un diámetro aproximado de 1 mm, cada uno contiene un espejo cóncavo y carece de lente para enfocar la luz, ya que el agua actuará como tal. Estos espejos están formados por cristales de guanina, que es una base purínica, una de las

cuatro de nuestro ADN, que se sedimenta en forma de piezas cristalinas, en cuadrados perfectos, para formar el espejo. De este modo, puede reflejar las longitudes de onda de la luz que atraviesa los fondos marinos donde viven. El espejo forma imágenes sobre una retina sencilla de doble capa y así separa las imágenes más próximas de las periféricas. Curiosamente ese enlosado de guanina cristalizada que forma el espejo, es sorprendentemente parecido al sistema de espejos segmentados de un telescopio reflector (Palmer et al., 2017). Estructuras oculares similares se encuentran en los crustáceos y los peces de aguas profundas y abisales.

2.5. *Optogenética, inicio de la técnica del futuro para controlar el sistema nervioso.*

Como discutimos anteriormente, la Bacteriorodopsina presente en las *Archea*, es posiblemente el más antiguo prototipo para captar la luz, con la molécula de retinal, y utilizar su energía de diversos modos. Durante décadas, algunos investigadores de las áreas de ingeniería genética y microbiología, habían experimentado con genes homólogos, derivados de algas y otros microorganismos. Las algas contienen proteínas sensibles a la luz, análogas a la bacteriorodopsina (opsinas), que actúan como pequeños canales, regulando el flujo de iones cargados a través de las membranas celulares. Por ejemplo, la Channelrhodopsin-2, procedente de las algas verdes como la *Chlamydomonas reinhardtii*, responde a la luz azul, permite la entrada de iones positivos, sobre todo Na^+ activando la célula, en su caso incrementando la motilidad y fotoorientación hacia la luz. Se considera como un “proto ojo” bacteriano.

Otra proteína, la Halorhodopsin, es también una bomba iónica que se abre por la luz y en este caso bombea iones negativos, como el Cloruro, Cl^- . Existen varias isoformas de la proteína en las diferentes especies de Arqueas, incluyendo *Halobacterium salinarum*, y *Natronobacterium pharaonis*, llamada así por haber sido encontrada en las momias egipcias, ya que las técnicas de embalsamamiento empleaban altas concentraciones de carbonato sódico, que junto con la exposición al sol, permitían deshidratar el cuerpo, y alcanzar la momificación. Después de la Bacteriorodopsina, la Halorhodopsina

es quizás la opsina microbiana más estudiada, conociéndose perfectamente su estructura cristalina.

La Halorhodopsina se emplea en optogenética para hiperpolarizar, por lo tanto inhibir, las neuronas específicas donde se exprese, ya que permite que entren los iones negativos, Cl⁻, en respuesta a la luz amarilla, silenciando la célula.

¿La cuestión es cómo incluir estas proteínas sensibles a la luz en las neuronas? Gracias a los trabajos de muchos pioneros y el gran esfuerzo y éxito final de Karl Deisseroth, de la Universidad de Stanford, sabemos hoy día que estos genes se pueden incorporar a un virus y ser inyectados directamente en el cerebro del animal. De este modo las neuronas del entorno cercano de las neuronas son sensibles a la luz. La unión de fragmentos de ADN llamados etiquetas promotoras garantiza que los genes solo se activen dentro de los tipos deseados de células, de modo que solamente respondan al tipo de luz del cable de fibra óptica. A esta técnica se la conoce con el nombre de optogenética (Ferenczi E., Deisseroth K., 2016; Zhang et al., 2006).

En la VIII edición del Premio Fronteras del Conocimiento del BBVA, en 2016, se concedió el premio en Biología y Medicina a los neurocientíficos Edward Boyden del Instituto Tecnológico de Massachusetts (MIT), Karl Deisseroth de la Universidad de Stanford y Gero Miesenböck de la Universidad de Oxford, galardonados por desarrollar la optogenética, que usa la luz para conocer el funcionamiento del cerebro y modificarlo.

La función cerebral depende de las interacciones de grupos específicos de neuronas interconectadas, en cierto modo similar a los circuitos electrónicos. Desde hace tiempo se sabía que para comprender la función de los circuitos cerebrales sería preciso el desarrollo de una tecnología que hiciese posible controlar selectivamente neuronas individuales sin afectar la actividad de otras neuronas. La optogenética es precisamente esta tecnología, pues permite activar e inactivar neuronas de animales vivos y, en conse-

cuencia, se puede emplear para establecer lazos causales entre la función de circuitos neuronales específicos y comportamientos distintivos.

Gero Miesenböck utilizó originalmente una combinación de tres proteínas de la mosca de la fruta para posibilitar la excitación con luz de neuronas de vertebrados. Aunque este sistema tenía limitaciones, representa el avance conceptual que lanzó el uso de la optogenética para obtener información acerca de circuitos neuronales.

Edward Boyden y Karl Deisseroth fueron pioneros en el uso de una familia distinta de proteínas sensibles a la luz, las canalrodopsinas derivadas de las algas, para manipular la actividad de las neuronas. Este sistema, y sus posteriores modificaciones, han revolucionado el estudio de la función cerebral y actualmente es empleado por neurocientíficos de todo el mundo. ¿Cómo pueden los ingenieros ayudar a inventar nuevas técnicas necesarias para el desarrollo de la neurociencia? Son muchas las intersecciones entre la gran tecnología y los ingenieros que la crean, las ciencias de la vida y la biomedicina de alto nivel necesita de su ayuda para avanzar. Esto implica también una cierta responsabilidad y la necesidad de ciertas reflexiones morales, que no han pasado desapercibidas. En una reciente publicación del mes de mayo de 2019, Edward Boyden plantea una serie de posibilidades para una más estrecha colaboración entre los ingenieros poseedores de una poderosa tecnología y su posible adaptación a la nano escala del funcionamiento cerebral, es un reto, pero previsiblemente es el futuro, y no exento de riesgos (Boyden, E. S. & Marblestone A. H., 2019; Pesch, U., 2015).

3. UNA MIRADA A LOS ANIMALES MÁS PRIMITIVOS: LUCES, SOMBRAS, FLUORESCENCIA, EL CEREBRO ARCOÍRIS Y CLARITY.

Echando una mirada retrospectiva a un único ejemplo, el de la respuesta a la luz, hemos constatado lo mucho que debemos a las bacterias, desde las más antiguas hasta las actuales. Ahora veremos unos cuantos ejemplos

de nuestra deuda con los animales más primitivos en la rama evolutiva, las esponjas, las medusas y otros.

3.1. Las esponjas sin sistema nervioso, pero propagando el impulso eléctrico.

En el caso de las esponjas, señalar que carecen de sistema nervioso, aunque alguna de sus variedades, como la gran familia de esponjas de cristal, que tienen un endoesqueleto silíceo, son capaces de propagar impulsos eléctricos. Son de gran belleza y entre ellas se encuentra la variedad conocida como “canastilla de flores de venus”. A cualquier arquitecto o artista le hubiera gustado imaginarla. Es especialmente frágil y le gusta el frío, por ello habitan en los fondos marinos del Océano Ártico y tardan muchos años en crecer por su metabolismo muy lento debido, justamente, al frío. Actualmente están en peligro por los coleccionistas y el cambio climático. Las células de las esponjas, aunque pueden realizar diferentes funciones, son todas ellas totipotentes. Esto significa que pueden transformarse de unas a otras y originar un nuevo individuo completo de una célula cualquiera del animal. Su origen se remonta posiblemente a unos 700 millones de años y existen fósiles en rocas datadas en 580 millones de años, de la era Paleozoica del Cámbrico. Su estudio está proporcionando claves para entender los aspectos evolutivos de la diferenciación celular y su reversibilidad, absolutamente necesarios para comprender los procesos del desarrollo embrionario y la neurogénesis del adulto, en mamíferos.

3.2. Las poderosas medusas, la tecnología de la fluorescencia y el cerebro arcoíris.

Habría que esperar al *filum de los cnidarios* que son los animales más simples que presentan células nerviosas y órganos de los sentidos. Tienen simetría radial y su plan corporal es en forma de saco. Existen al menos 10.000 especies y son generalmente gelatinosos. Son un grupo antiguo, con una larga historia fósil que se remonta, probablemente, alrededor de 600 millones de años atrás. Dentro de este grupo están las medusas, las anémonas, los pólipos o los corales. No todos los grupos aparecen evolutivamente al mismo tiempo y el estudio de sus mitocondrias revela que algunos ya aparecieron hace unos

750 millones de años. Actualmente el cambio climático, la eutrofización de las aguas y la pesca excesiva de sus depredadores, como los atunes, está favoreciendo su presencia y desarrollo, alterando los ecosistemas marinos. Una posible solución es hacer como los habitantes del sudeste asiático, comérmolos, en esas latitudes los palitos de medusa son una delicatesen.

No todo es negativo en las medusas y las anémonas, para los investigadores de ciencias de la vida y sobre todo del sistema nervioso, algunas de estas medusas se han convertido en la piedra roseta para su comprensión. En el año 2008 fueron galardonados con el Premio Nobel de Química, por «su descubrimiento y desarrollo de la proteína verde fluorescente», los norteamericanos Roger Tsien y Martin Chalfie, y el japonés Osamu Shimomura. Esta proteína verde fluorescente, o por sus siglas inglesas GFP (Green Fluorescent Protein), es producida por la medusa *Aequorea victoria*, aunque otras medusas, corales y anémonas marinas también producen compuestos similares. Esta proteína, y otras análogas modificadas por Roger Tsien, pueden emitir fluorescencia de distintas longitudes de onda y cubrir todo el espectro de emisión. Sus genes han sido clonados y unidos a otros genes, cuyo producto proteico resulta importante en ciencias básicas o biomédicas, se emplean como genes reporteros, o chivatos, para detectar directamente la expresión de las proteínas en células aisladas, o en animales modificados genéticamente, conocidos como animales transgénicos. Los más conocidos y espectaculares por el momento son los ratones con cerebro arcoíris, conocido como *Brainbow*, que han permitido identificar haces de fibras y sus trayectorias en cerebro con una gran precisión. Señalar que Roger Tsien falleció de un infarto en 2015, dejando tras de sí una tecnología que nos ha hecho avanzar con zancadas de gigante en la comprensión del Sistema Nervioso. Tampoco quisiera olvidar que dio un gran impulso a la nueva tecnología de la optogenética (Zhang J. et al., 2002; Tsien R. Y., 2005; Nguyen Q. T. & Tsien R. Y., 2013).

Nuevos diseños de proteínas fluorescentes, basadas en la proteína verde fluorescente de la medusa (GFP), han permitido que estas sean fluorescentes, solamente cuando su grupo cromóforo es activado. Lo que puede depen-

der de la asociación con algún factor, solamente en el contexto de las células vivas. Estas proteínas abrirían la puerta a nuevas posibilidades tecnológicas para comprender el funcionamiento de las células vivas (Dou, J. et al., 2018).

El desarrollo de un atlas cerebral fue una idea pionera de Paul Allen, en el año 2003, creando en Seattle un instituto independiente sin ánimo de lucro: The Allen Institute for Brain Science, siendo financiado en sus inicios por Microsoft y el filántropo Paul Allen. En este instituto con la tecnología más avanzada se han creado una serie de bases de datos de libre acceso, que facilitan en gran modo la investigación cerebral. El proyecto inaugural fue el mapeo del cerebro de ratón, conociendo actualmente la expresión de los 21.000 genes del ratón denominado “Allen Mouse Brain Atlas”. Esto requiere que de modo sistemático solamente se marque con el reportero uno de los genes. El animal modificado genéticamente es sacrificado y de su cerebro se hacen cortes seriados ultrafinos, para poder conseguir un mapa tridimensional. La gran ventaja es que las proteínas son de por sí fluorescentes y no necesitan tinciones previas, como ocurría con las preparaciones histológicas de Cajal. En nuestro laboratorio hemos tenido la suerte de contar con el ratón generado para el estudio del receptor ionotrópico de nucleótidos de tipo P2X7, cedido amablemente por los investigadores Maiken Nedergaard y Jeff Litchman, profesores de las universidades de Rochester y Harvard respectivamente (Díaz-Hernández M. et al., 2008).

3.3. CLARITY, la fluorescencia cuando el cerebro es transparente.

No podríamos dar por cerrado el apartado de la importancia de las proteínas marcadas fluorescentemente, sin mencionar, al menos, su aplicación a la técnica del CLARITY, que consiste en transformar un tejido intacto en otro ópticamente transparente y permeable. De este modo se pueden realizar estudios del cerebro de animales pequeños, o porciones cerebrales del humano, en tres dimensiones. Si este cerebro es de un ratón modificado genéticamente, con un marcador para neuronas específicas, se verá su localización en tres dimensiones. La técnica fue desarrollada en la universidad de Stanford en el laboratorio de Karl Deisseroth. Ya lo hemos citado con

los comienzos de la optogenética y volveremos a citarlo con más detalle en sucesivos capítulos, pues este Bioquímico, Neurocientífico, Ingeniero y Psiquiatra, es Profesor de “Bioengineering and of Psychiatry and of Behavioral Sciences” (Bioingeniería, Psiquiatría y Ciencias del Comportamiento) en la Universidad de Stanford y está en el origen de las revoluciones tecnológicas que nos llevarán a comprender el origen de las enfermedades mentales, siendo esto según sus palabras “el único modo de acercarnos a su tratamiento eficaz” (Zhang F. et al., 2006; Deisseroth K., 2016), (<https://neuroscience.stanford.edu/people/karl-deisseroth>).

Como profesora de bioquímica durante muchos años, no quiero dejar pasar la oportunidad de explicar el proceso de CLARITY. ¿Cómo volver transparente un tejido o un órgano? Ya que hay tecnologías que cualquiera de nosotros podía haber desarrollado, y no es falsa modestia. Es el cerebro el mejor tejido para volverlo transparente, pues tiene mucha grasa envolviendo todas las estructuras. Si utilizamos compuestos bifuncionales capaces de reaccionar con los grupos residuales amino de las proteínas, las lisinas, podemos hacer una malla con las proteínas, que impedirá que la estructura se altere. Los bioquímico/enzimólogos hemos empleado estos compuestos bifuncionales, para estudiar si los enzimas u otras proteínas contenían subunidades, o estaban formando grandes complejos funcionales.

Nada nuevo bajo el sol, pero decidirse a plantear cómo se podría hacer lo mismo en tejidos complejos, donde es necesario eliminar las bicapas lipídicas, manteniendo la inmensa red de las proteínas, requería osadía y arriesgarse. Y, sin duda, salir de la zona de confort tecnológico. Los cerebros son inmersos rápidamente en un hidrogel que permea todas las estructuras, durante tres días y después se produce la hibridación con las proteínas a 37° otros tres días. Pasado este tiempo se trata con un detergente aniónico, potente, el SDS (sodio dodecil sulfato, también conocido como lauril sulfato) que elimina los lípidos en forma de micelas y las separa durante 5 a 9 días, las micelas cargadas negativamente se dirigen al polo

positivo, al cátodo. De este modo toda la compleja red de haces nerviosos y estructuras cerebrales es accesible y visible, ya que el cerebro es transparente. Solamente era necesario pensar...

4. ¿PARA QUÉ SIRVE EL “CEREBRO”? UNA RESPUESTA INICIAL PROPORCIONADA POR LA CAMISA DE MAR, *Ciona intestinalis*.

Hemos sobrevolado por diferentes proteínas y técnicas que nos permiten aproximarnos a una función cerebral compleja, pero la pregunta que subyace es: ¿El cerebro, para qué? ¿Cuándo han necesitado un coordinador funcional, o cerebro, los organismos primitivos? Veremos uno de los primeros ejemplos, el de un pariente lejano de los vertebrados, que pertenece a la clase de las ascidias.

4.1. *La camisa de mar, Ciona intestinalis, y su metamorfosis.*

La camisa de mar, *Ciona intestinalis* es un pariente lejano de los vertebrados, una especie de urocordado que pertenece a la clase de las ascidias. Es un animal marino que se alimenta filtrando el agua, con aspecto de tripa traslúcida, como indica su nombre latino. Cuando es adulta se une normalmente a las rocas, pero puede hacerlo al casco de los barcos, viajando por todo el mundo. Actualmente es considerada una especie invasora (Blum J. C. et al., 2007). Es hermafrodita, de fertilización cruzada, y dos días después de fertilizados los huevos, eclosionan unas pequeñas larvas que contienen 2.500 células y el tamaño entre 1 y 2 mm que se desarrollan y nadan libremente para alimentarse. Es en esta etapa cuando realmente necesitan un sistema nervioso para coordinar el movimiento. Tras 10 o 12 días las larvas sufren un proceso de metamorfosis y buscan un lugar donde fijarse, algún hueco libre, al que se anclan con unas papilas adhesivas que poseen en su parte anterior.

Resulta sorprendente que en su fase larvaria el aspecto de la camisa de mar recuerda a un renacuajo. Con un tubo neural y notocorda, ambas

estructuras son más gruesas en la parte cefálica, lo que se considera un “protocerebro”, controlan la corriente de agua por un sifón inhalante, que se filtra en la cesta braquial donde quedan retenidas las bacterias y otros organismos marinos que van al estómago, el agua filtrada pasa a través del intestino y sale por un sifón de expulsión. Por esta razón también se está tratando de utilizar su capacidad de filtración para purificar el agua marina, reteniendo todo tipo de metales pesados y organismos patogénicos.

Fue Aleksander Kovalevsky, (Alexander Onufrievich Kovalevsky), naturalista y embriólogo, de nacionalidad polaca y ciudadano ruso, quien en la segunda mitad del siglo XIX, estudió las larvas de *Ciona intestinalis*. Reseñó que presentaban una notocorda y que sobre ella también presentaban el tubo neural, lo que le permitió clasificar a estos animales entre los cordados. Pero lo que más le sorprendió es que cuando finalizaban su etapa larvaria y se anclaban definitivamente, perdían ese sistema nervioso incipiente y lo primero que hacían era digerirlo. La razón era muy simple, si ya no lo necesita para moverse y comer, pues es superfluo y lo elimina. La naturaleza suele actuar con una lógica aplastante y se deshace de lo que no utiliza.

Estas observaciones no pasaron desapercibidas a Charles Darwin, quien en 1874 escribe lo siguiente: “*Mr. Kovalevsky has lately [in 1866] observed that the larvae of ascidians are related to the Vertebrata, in their manner of development, in the relative position of the nervous system, and in possessing a structure closely like the chorda dorsalis of vertebrate animals; ... Thus, if we may rely on embryology, ever the safest guide in classification, it seems that we have at last gained a clue to the source whence the Vertebrata were originated.*” (Charles Darwin, 1874)

“*El Señor Kovalevsky ha observado últimamente [en 1866] que las larvas de las ascidias están relacionadas con los Vertebrados, en su forma de desarrollo, en la posición relativa del sistema nervioso, y en posesión de una estructura semejante a la corda dorsalis de los animales vertebrados; ... Por lo tanto, si podemos confiar en la embriología, que es siempre la guía más segura de clasificación, posiblemente hayamos por fin conseguido la clave esencial para acceder a la fuente donde se han originado los vertebrados*” (Charles Darwin, 1874).

Alexander Kovalewsky y su hermano Vladimir, que era paleontólogo, fueron miembros de Número de la Academia de Ciencias de San Petersburgo.

Los científicos ingleses, que suelen tener un fino y sarcástico sentido del humor, han comparado a este humilde y rudimentario vertebrado con los empleados públicos de la época, me imagino que ingleses, pero que posteriormente se extendió a todos los funcionarios europeos. Los cuales se pueden considerar homólogos de este pequeño tunicado ya que necesitan sus neuronas para vivir, estudiar y trabajar hasta conseguir situarse, pero que una vez con la plaza de funcionario en propiedad ya no necesitan ni moverse ni dar “un palo al agua”, explicado en Román paladino.

4.2. *El genoma de C. intestinalis, genes Hox*

Las ciencias avanzan y con las nuevas tecnologías, en el año 2002 se secuenció el genoma completo de *Ciona intestinalis*, convirtiéndose en un modelo de referencia para el estudio de la biología del desarrollo (Dehal et al., consortium, 2002). Tiene un genoma relativamente pequeño, unos 160 millones de pares de bases, 14 pares de cromosomas y unos 16.000 genes. Habida cuenta de que nosotros tenemos 3.200 millones de pares de bases, lo que supone 20 veces más; tenemos 23 pares de cromosomas, que son escasamente el doble y entre 20.000-25.000 genes que no llegan al doble de los contenidos en el genoma de *Ciona Intestinalis*, hay que reconocer que tiene su genoma muy bien aprovechado (Sato N., 2003; Suzuki M. et al., 2005; Putnam N. H. et al., 2008).

El genoma de *Ciona intestinalis*, indica una organización segmentada, como todos los vertebrados poseyendo 9 genes Hox, implicados en el desarrollo, con distribuciones singulares entre los cromosomas y que van a dirigir la formación de los segmentos de su cuerpo. Estos genes ancestrales son los homólogos de todos los genes Hox que codifican proteínas que actúan como factores de transcripción por lo que van a regular la expresión de

genes específicos en la formación del organismo en todos los vertebrados, incluidos nosotros los mamíferos (Ikuta, T. & Hidetoshi S., 2005).

4.3. *Ciona* y los receptores de cannabinoides.

La secuenciación del genoma y su estudio comparativo con el de otros vertebrados, dejó algunas sorpresas, entre ellas la presencia en *Ciona intestinalis* de dos genes diferentes para los receptores de cannabinoides, CB1 y CB2. Lo que claramente indica que la presencia de receptores para cannabinoides es anterior a la evolución de los vertebrados y avala su antigüedad filogenética. Estos receptores se localizan fundamentalmente en los axones emitidos por el tubo neural y todo parece indicar que ejercen un papel temprano como reguladores de la señalización neuronal. La activación de los CB1 y CB2 de los mamíferos requiere la presencia de endocannabinoides, el 2-arachidonoylglycerol (2-AG) o la anandamida, el ácido graso contenido en ambos agonistas endógenos es el ácido araquidónico, un ácido graso de 20 átomos de carbono poliinsaturado, que necesitamos ingerir en la alimentación, pues no lo sintetizamos. Los enzimas implicados en la síntesis y la inactivación de los agonistas existen en todos los representantes del reino animal estudiados. Es de suponer que la síntesis postsináptica de los compuestos 2-AG y anandamida, es un fenómeno ampliamente distribuido en la evolución y que del mismo modo algunos receptores han evolucionado para señalar a través de las moléculas de los cannabinoides endógenos (McPartland et al., 2006; Anday J. K. & Mercier R. W., 2005; Elphick, M. R., 2012).

El nemátodo *C. elegans* sigue siendo un poderoso modelo para comprender las funciones de los ácidos grasos de cadena larga de 20 carbonos y poliinsaturados omega-3 y omega-6 que este gusano es capaz de sintetizar directamente a partir del ácido graso mediante el enzima FAT-1 omega-3 de-saturasa cuyos productos serian importantes ligandos para los receptores de cannabinoides. La inmensa mayoría de los mamíferos carecemos de este gen funcional. Quizás lo perdimos, ya que el aporte era muy abundante en

la dieta variada inicial, pero que ahora ingerimos en mucha menor cantidad. Estudios recientes asocian la depresión con esa carencia nutricional y la falta de ligandos endógenos para los receptores de cannabinoides, CB1 y CB2 (Watts J. L., 2016).

4.4. *Ciona* y los canales de funcionamiento neural.

El funcionamiento neural en todos los vertebrados necesita de la secuencia de apertura de canales dependientes de voltaje, de sodio y potasio entre otros. Todos ellos necesitan un sensor, y ahora se puede modificar la actividad de los haces nerviosos mediante las técnicas de optogenética. Hemos hecho amplia reseña de esta técnica en epígrafes anteriores, aquí solamente añadir que los arcaicos canales dependientes de voltaje de *C. intestinalis* han sido el punto de partida para clonar las secuencias de los genes responsables de la respuesta al voltaje. Los indicadores de voltaje genéticamente codificados, GEVI, son proteínas que pueden detectar el potencial de membrana de una célula y sufrir en consecuencia un cambio conformacional que permita la salida de iones y a menudo con una señal fluorescente. En su gran mayoría son proteínas que contienen la secuencia del dominio sensible de *C. intestinalis*. Esta herramienta de registro optogenético permite exportar señales electrofisiológicas de células cultivadas, animales vivos y, en última instancia, al cerebro humano y modificarlo (Ferenczi E, & Deisseroth K., 2016; Zhang F. et al., 2006; Adamantidis et al., 2015; Deisseroth K., 2016).

5. EL MODELO ANIMAL DE *CAENORHABDITIS ELEGANS*, UN GUSANO PARA ESTUDIAR CASI TODO.

En los años 70 del pasado siglo, el gran investigador sudafricano e inglés, Sydney Brenner, que recibió el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 2002, comenzó sus estudios con el gusano nematodo *C. elegans*. ¿Cuáles eran las ventajas de este gusano para tomar tal decisión?

5.1. *Ventajas del modelo de C. elegans*

Son muchos los investigadores que acuden al modelo de este gusano nematodo, debido al bajo coste de su mantenimiento, en esta época tan precaria. Pero hay otras muchas ventajas de índole científica que destacaremos: 1) que mide aproximadamente 1 mm de longitud y se cultiva fácilmente en placas, donde se alimenta de bacterias como el *Escherichia coli*. Son fundamentalmente hermafroditas, por lo que se pueden aislar y mantener individuos con mutaciones precisas. 2) Tiene simetría bilateral y como gusano pertenece al último antepasado común a todos los animales; a contraluz es transparente, lo que permite la observación de su desarrollo temprano bajo el microscopio, manteniendo esta cualidad durante toda su vida; se puede así estudiar la distribución de los distintos órganos, muchos de ellos comunes a los vertebrados. 3) Quizás lo más importante es que en fase adulta tiene un número de células somáticas constante, que son 959, de las cuales 302 son neuronas y un número de células germinales que varía entre 1000 y 2000.

5.2. *C. elegans el primer genoma de un organismo pluricelular secuenciado.*

Para nuestro propósito, es importante señalar que el primer organismo multicelular cuyo genoma fue secuenciado es el del nematodo *C. elegans*. Un primer esbozo avanzado de su secuencia se publicó en 1998 y la versión final totalmente corregida en octubre de 2002. La secuenciación fue llevada a cabo por un consorcio Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology (*C. elegans* Sequencing Consortium. *Science* 11 Dec 1998; Tabara et al., 1998).

El genoma del *C. elegans* posee cerca de 97 millones de pares de bases y más de 19.000 genes; de los cuales aproximadamente el 40% coinciden con los de otros organismos, incluyendo a humanos. Tiene un poco más de la mitad de pares de bases que *Ciona intestinalis* (160 millones), pero, a pesar de ello, tiene más genes, e incluso es más antiguo evolutivamente hablando. Su reducidísimo tamaño no es óbice para que su número de genes,

que ya hemos citado, 19.000, sea muy similar al de los mamíferos, 25.000, humanos entre ellos.

El estudio de su genoma, junto al de la mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster*, supusieron un gran avance para comprender los procesos de desarrollo temprano y diferenciación celular, y la presencia de genes maestros que controlan dicho proceso. Siendo el punto de partida para la secuenciación de genomas mucho más grandes, entre ellos el genoma humano.

5.3. ¿Qué datos nos aportó el conocimiento del genoma de *C. Elegans* respecto a su neurobiología?

El sistema nervioso de *C. elegans* tiene un conjunto sin precedentes de herramientas que están disponibles para su análisis: un linaje celular completo que revela el origen del desarrollo de cada neurona, un diagrama de cableado de micrografías electrónicas de secciones en serie, que describe todas las sinapsis entre las neuronas, y ahora la secuencia del genoma con todos los genes necesarios para construir el animal. El sistema nervioso contiene alrededor de un tercio de todas las células somáticas 302/956 en *C. elegans* y probablemente domina una porción comparable de los genes, pero cuando se secuenció solo se comprendió la función de unos pocos genes. La comparación de los genes *C. elegans* con otros del sistema nervioso de vertebrados revela muchos paralelismos y algunas diferencias sorprendentes. Los sistemas genéticos conservados incluyen neurotransmisores, sus enzimas de biosíntesis, proteínas que son necesarias para los mecanismos de liberación sináptica y receptores de neurotransmisores. Entre estos están los receptores metabotrópicos, acoplados a proteínas G heterotriméricas. Curiosamente acoplados a vías de señalización mediante mensajeros muy conservados entre el gusano *C. elegans* y los mamíferos. Una situación diferente ocurre con las proteínas de las uniones estrechas (GAP-junctions), entre células adyacentes, y los receptores quimio-sensoriales que tienen diferentes orígenes entre vertebrados y nematodos.

La mayoría de los canales iónicos son similares a los canales de los vertebrados. El genoma de *C. elegans* codifica al menos 80 canales de potasio y 90 receptores de neurotransmisores operados por ligandos, también unos 50 receptores para péptidos, y hasta 1000 receptores que son quimiorreceptores y con funciones sensoras del entorno, para alimentarse o reconocer lo que es nocivo. Para muchas de estas familias de genes hay poca homología de secuencia con otros genes y pueden dar pistas de nuevas funciones previamente desconocidas para estas familias de proteínas (C. I. Bargmann, 1998). Los RNA de interferencia (RNAi) se han empleado para identificar la función de un gran número de genes en *C. elegans*. Esta técnica había sido desarrollada y utilizada con gran éxito por el grupo de Craig Mello, permitiendo una nueva aproximación a la comprensión del envejecimiento y la inmunidad innata. Craig Mello recibió en 2006 el Premio Nobel, “*for their discovery of RNA interference - gene silencing by double-stranded RNA*”, “*por el descubrimiento del RNA de interferencia y silenciamiento de genes por RNA de doble cadena*”. (Tabara H. et al., 1998; Sinha Am & Rae R., 2016).

5.4. *C. elegans*, linaje celular y el primer animal fluorescente.

En 1994, antes de secuenciar el genoma del *C. elegans*, Chalfie introdujo como marcador biológico la proteína verde fluorescente (GFP) que se convirtió desde entonces en un poderoso utensilio en muchas áreas de la biología. La utilizó como reportero por vez primera en la historia de la Ciencia, lo que pasado un cierto tiempo, en 2008, le supuso la concesión del premio Nobel, junto con Shimomura y Roger Tsien, como ya hemos visto en el apartado 1.2. Esta proteína fluorescente bajo un promotor adecuado puede ser expresada en células vivas y organismos complejos, frecuentemente la especificidad de expresión surge de la combinación de múltiples reguladores. A pesar de estas limitaciones Martin Chalfie pudo caracterizar cómo se genera cada linaje celular a lo largo del desarrollo de *C. elegans* y el del linaje neural desde el óvulo fecundado al embrión y adulto. El hecho de que la vida media del *C. elegans* sea de dos semanas le facilitó los experimentos, si lo comparamos con los casi dos años de vida del ratón (Chalfie et al., 1994).

Martin Chalfie se quejaba en sus primeros trabajos del poco interés que despertaban sus descubrimientos, cuando él sabía que eran de lo más original y creativo. Aquí aparece recogido el fragmento en el que describe con simplicidad lo que posteriormente sería una tecnología a la que concedieron el Premio Nobel. *“A complementary DNA for the Aequorea victoria green fluorescent protein (GFP) produces a fluorescent product when expressed in prokaryotic (Escherichia coli) or eukaryotic (Caenorhabditis elegans) cells. Because exogenous substrates and cofactors are not required for this fluorescence, GFP expression can be used to monitor gene expression and protein localization in living organisms”*. // *“Un DNA complementario para la Aequorea victoria proteína verde fluorescente (GFP), codifica una proteína fluorescente cuando se expresa en células procariotas (Escherichia coli) o en eucariotas (Caenorhabditis elegans). Debido a que los sustratos exógenos y cofactores no son necesarios para esta fluorescencia, la expresión de la GFP se puede utilizar para seguir la expresión génica y la localización de proteínas en organismos vivos”*. (Extracto de la publicación de Martin Chalfie en la revista Science en 1994).

Al iniciar la colaboración con Roger Tsien para marcar el cerebro de mamíferos, Chalfie comprendió que, según sus palabras: *“el cerebro de un gusano con 302 neuronas, interesa poco, aunque sea un paso obligatorio para conquistar nuestro cerebro y nuestra mente”...*

5.5. C. elegans y su empleo como modelo en la patología humana.

Este pequeño gusano presenta rutas metabólicas, que tienen muchos puntos en común con las de los mamíferos. Es el caso de los genes implicados en la regulación lipídica. Entre ellos los implicados en la regulación de la función intestinal, metabolismo y apetito. Estos genes pueden ser inactivados mediante ARN interferente (RNAi) y afectar el acumulo de lípidos. Por este motivo se ha empleado en el estudio de la obesidad que es un desorden multifactorial con gran prevalencia en el mundo desarrollado.

Una situación similar se produce en el estudio de la diabetes, ya que está estrechamente relacionada con la obesidad y el envejecimiento. La vía de

señalización de la insulina en *C. elegans* es similar a la humana y regula tanto el metabolismo como el desarrollo y la longevidad. Los mutantes de *C. elegans* con defectos metabólicos en esta vía de señalización permiten el estudio de compuestos capaces de controlar la vida media de este organismo y aumentarla o reducirla a voluntad. Las variantes genéticas en el metabolismo de la glucosa y en los implicados en el estrés oxidativo, junto con la restricción calórica, fueron las más significativas en la longevidad. Los trabajos de Cynthia Kenyon son reconocidos mundialmente en esta área de investigación, por su originalidad y conclusiones (Kenyon C. et al., 1993; Apfeld J. & Kenyon C., 1999; 2004; 2005; Arantes-Oliveira N. et al., 2003; Wei Y. & Kenyon C., 2016).

La relación entre obesidad, envejecimiento y enfermedad de Alzheimer, ha convertido de modo inesperado a *C. elegans* en un valioso modelo para evaluar el impacto de los alimentos bioactivos en el desarrollo de la enfermedad, ya que a este gusano se le pueden añadir o bloquear genes, e incluso convertirlos en transgénicos expresando genes alterados de distintas proteínas de acúmulo (Shen P. et al., 2018). Existen varios modelos de Alzheimer, los que insisten en la importancia de las placas de amiloide, con la producción en exceso del péptido amiloidogénico, A β -42 y el modelo de acúmulos de ovillos neurofibrilares en el interior de la neurona, conocida como Tauopatía. Las cuales se deben a alteraciones de la proteína Tau, o de sus vías de fosforilación que la regulan (Pir G. J. et al., 2017).

La disfunción mitocondrial y el metabolismo energético deteriorado son componentes importantes de la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer (AD). Sin embargo, las relaciones causales y temporales entre ellos y la patología de la AD siguen sin estar claras. Utilizando una nueva variante de *C. elegans*, que expresa específicamente de modo constitutivo el péptido A β -42 en las neuronas de este gusano, se observan defectos neuromusculares y disfunción conductual dependiente de la edad que recuerda la enfermedad familiar de Alzheimer. El déficit bioenergético mitocondrial, observado en estos modelos genéticamente modificados es un evento temprano en la patogénesis, antes de la disfunción de la cadena de transporte electrónica y los complejos que la constituyen en la membrana interna de la mitocondria, y la aparición de

la insuficiencia metabólica global. Estos resultados son consistentes con una visión emergente de que la enfermedad de Alzheimer puede ser una enfermedad neurodegenerativa metabólica. También, es importante incidir en que los efectos metabólicos y mitocondriales impulsados por A β -42 pueden reproducirse en organismos separados por grandes distancias evolutivas, como son el gusano nematodo y el homo sapiens (Fong S. et al., 2016).

6.- MODELANDO EL SISTEMA NERVIOSO, LOS GENES HOMEÓTICOS.

El sistema nervioso de todos los vertebrados contiene una amplia variedad de neuronas y de células gliales que se producen durante el desarrollo. Una vez el sistema nervioso ha alcanzado su madurez, se repiten las posiciones anatómicas de los distintos tipos de neuronas, su morfología, y las conexiones con neuronas diana establecidas. El sistema nervioso contiene mayor variedad de neuronas, que la diversidad celular que existe en cualquier otro órgano de los vertebrados. ¿Cómo explicar la gran variedad de neuronas, por ejemplo las docenas de diferentes interneuronas conocidas como células amacrinas en la retina; o los más de cien tipos neuronales de la medula espinal? Es un problema difícil, sobre todo si consideramos el conjunto del sistema nervioso central, en donde posiblemente los tipos de neuronas sobrepasen ampliamente los mil.

La amplia variedad neuronal, los patrones repetitivos de su localización y funciones, constituye la gran característica del sistema nervioso de los mamíferos. Por ello, el desarrollo del sistema nervioso y cómo a partir de una única célula, la del óvulo fecundado, se alcanza un sistema nervioso funcional y maduro, es el gran reto que impregna todo el esfuerzo de la neurociencia.

La convergencia de los estudios de biología del desarrollo y los de neurociencia sirvieron para apreciar que, a pesar de las diferencias entre los organismos, existían unos mecanismos comunes que habían sido conservados a través de la evolución. Los grandes avances se produjeron con los estudios genéticos en organismos sencillos, como la mosca del vinagre, *Drosophila me-*

lanogaster, y el gusano *Caenorhabditis elegans*, que hemos desarrollado ampliamente en el epígrafe 5.

La gran homología entre todos los genes homeóticos, desde los del organismo más primitivo, *Ciona intestinalis*, pasando por la mosca del vinagre hasta el ser humano, y su función conservada en todos ellos, orientando la formación del nuevo individuo, rostro caudal, en segmentos, convulsionó el mundo de la investigación biológica. Todos pensábamos que los genes que organizaban nuestro desarrollo y la formación de un individuo adulto, poco tenían que ver con los de otros seres vivos, exceptuando a los mamíferos. Hoy día, ya plenamente aceptado y con humildad, el reto está en comprender cómo funcionan esos genes Hox. La familia de genes Hox en el subgrupo humano consta de 39 genes y recordemos que *C. intestinalis* un tunicado, que es el más primitivo de los animales cordados tiene 9 genes Hox. Necesitamos comprender cómo se induce su transcripción para producir el RNA mensajero correspondiente y cómo se regulan sus niveles. Finalmente la traducción del RNA mensajero para producir la proteína funcional, que tiene la propiedad de ser un factor transcripcional. Son estos factores los que van a dirigir en cada segmento la organización del DNA y cuáles van a ser los genes específicamente expresados (Revisiones: Carne-secchi J. et al., 2018; Luo Z. et al., 2019).

6.1. El Desarrollo del Sistema nervioso en vertebrados.

En todos los vertebrados el sistema nervioso procede de la placa neural, zona del ectodermo que se pliega y da lugar al tubo neural. A lo largo de la embriogénesis bajo la influencia de diferentes factores transcripcionales conocidos como genes Hox, o genes homeóticos, se desarrollan de modo diferente, originando las distintas estructuras, más o menos complejas según la evolución de la propia especie. El estudio del cerebro en ratones, pollos, monos, etc., indica que las especies más evolucionadas tienden a preservar las estructuras responsables de los comportamientos básicos. En los humanos, el cerebro contiene la región posterior primitiva, al que la mayoría de los neurocientíficos denominan el cerebro protoreptiliano. Esta parte del cerebro,

que contiene el puente y el bulbo raquídeo, aloja funciones homeostáticas fundamentales y de ellos salen y llegan las fibras de los nervios craneales a sus respectivos núcleos. El cerebelo también se origina en este segmento del tubo neural, está conectado con diferentes regiones del sistema nervioso central, SCN. Funcionalmente, se le considera como parte del sistema motor. Es capaz de coordinar los grupos musculares individuales para producir movimientos suaves, voluntarios y sinérgicos. Está muy desarrollado en las aves y muy escaso en los reptiles.

El mesencéfalo y el tálamo aparecen evolutivamente 250 millones de años más tarde, están formados por agrupaciones de neuronas llamadas núcleos, que se conectan entre sí y a las neuronas de otros núcleos más lejanos mediante axones integrados en haces hasta su destino. Toda la información sensitiva que alcanza la corteza cerebral pasa por el tálamo y todo el control del movimiento también.

Hace unos 200 millones de años aparecen los hemisferios cerebrales, que son las áreas de origen más reciente del cerebro de los mamíferos y por lo tanto de los humanos, son la parte más visible y voluminosa, que presenta una arquitectura precisa. En todos los mamíferos, en la periferia exterior de la corteza cerebral, las neuronas se organizan en capas (cuyo número varía según la especie y la función) desde unos pocos milímetros de espesor. Hay axones que viajan entre las capas, pero la mayoría de la masa del axón está debajo de las neuronas y por lo tanto no tiene que competir por el espacio de la superficie. A esto se añade que la corteza puede originar pliegues lo que aumenta significativamente el número de neuronas que pueden alojarse en la superficie. Esto explica que nuestro cerebro limitado por la estructura ósea que lo protege pueda contener tan elevado número de neuronas en áreas bien definidas en sus circunvoluciones. Al mismo tiempo, estas neuronas no necesitan emitir grandes axones para poder conectarse con los núcleos e interconectarse a través del cuerpo calloso interhemisférico. La menor longitud de los axones necesaria para establecer esas conexiones interhemisféricas y otros núcleos resulta, al fin, en un menor gasto energético en la repolarización axónica, posterior a la comunicación interneuronal y un menor tiempo requerido

para la transmisión informativa. Las circunvoluciones cerebrales son generalmente más abundantes en las especies más evolucionadas, aumentando así el número de neuronas de la corteza cerebral.

Todas las estructuras de un cerebro embrionario y adulto están regidas por los factores de transcripción codificados en los genes Hox. Funcionan como elementos clave para disparar las cascadas morfogénicas que dirigen el destino de las células y son de las áreas más fértiles y competitivas en la neurobiología del desarrollo. Conocemos hoy día que los factores de transcripción Hox están implicados en diversas etapas de la expresión genética y que modifican la estructura de la cromatina para hacer más accesibles los promotores de los diferentes genes a la maquinaria de las RNA polimerasas, sobre todo a la que sintetiza los RNA mensajeros, la RNA-polimerasa-2. Adicionalmente, activan las maquinarias necesarias para la maduración de los RNAm en el espliceosoma.

Recientemente el grupo del Profesor Gomez-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). En los próximos años seguramente podremos conocer el relato completo de cómo los Factores Transcripcionales derivados de los genes Hox nos moldean y construyen (Revisiones: Carnesecci J. et al., 2018; Luo Z. et al., 2019).

6.2. Vertebrados versus invertebrados: Humanos y pulpos, los campeones cerebrales: los genes engrailed.

El cerebro de los mamíferos es el mejor desarrollado entre los vertebrados, siendo el humano el más complejo. Pero no olvidemos que los invertebrados son los animales más abundantes sobre la tierra y tienen sus

correspondientes ganglios neurales. Entre todos los invertebrados, los cefalópodos, son los de mayor tamaño, son animales marinos, entre ellos el calamar, la sepia y sobre todo el pulpo, al que podríamos considerar como el equivalente humano en cuanto a su capacidad cerebral, ya que tiene una relación peso corporal a peso cerebral convergente con la de los humanos. Tienen además otras características de las que carecemos: 1) Son capaces de regenerar sus tejidos o miembros dañados. 2) Conservan los mecanismos de expansión de las células madre, lo que aumenta su cerebro (Deryckere A. & Seuntjens E., 2018; Shigeno S. et al., 2018).

El pulpo posee un complejo sistema nervioso dividido en dos partes, por ello se dice que el pulpo tiene dos cerebros. El primer cerebro son los ganglios situados alrededor del esófago que controlan la ingesta y dirigen la visión, forman un auténtico cerebro, aunque este solo contiene un tercio del total de las neuronas y se le conoce como la porción cerebral o masa supraesofágica. El segundo cerebro o masa cerebral subesofágica, denominada así por su posición respecto al esófago aunque ambas partes están conectadas, contiene la mayor parte de las neuronas, que le permiten controlar los movimientos independientes de sus ocho tentáculos, sin enredarse jamás. Las neuronas de ambos cerebros se encuentran rodeadas por una masa viscosa o caja cartilaginosa, que es otro intento evolutivo para proteger el cerebro. Siendo animales marinos seguramente un cráneo óseo, o rígido era más una molestia en la flotación que una protección y rodearse de un gel viscoso y plástico, ha sido un notable hallazgo. Pero no olvidemos que un miembro ancestral de esta familia, el Nautilus, tiene una concha rígida y vive a grandes profundidades marinas, subiendo a la superficie y flotando gracias a la cámara de aire que aloja en su concha. Es decir, solucionó el problema de otro modo.

El pulpo ha fascinado a numerosos investigadores, más allá de ser un manjar culinario. Su inteligencia es superior a cualquier otro invertebrado, superando cantidad de test de inteligencia, como salidas del laberinto, abrir botes desenroscando las tapas y un largo etc.

Los cefalópodos se separaron del resto de los moluscos hace unos 500 millones de años, dejando fósiles tan abundantes como los amonites. Tienen 9 genes Hox, como la *Ciona intestinalis*, que dirigen, durante su desarrollo embrionario al adulto, el eje rostro caudal y la formación de los tentáculos. Para poder bajar a zonas profundas perdieron la concha externa, o se quedaron con una muy pequeña. Con el gran cataclismo originado por el meteorito que impactó en la península de Yucatán que llevó a la extinción de los dinosaurios hace 65 millones de años, también se produjo una masiva extinción entre los cefalópodos, quedando dos estirpes de supervivientes, la del *nautilus*, un auténtico fósil viviente y los *neocoleoidea* que contiene prácticamente a todos los cefalópodos vivos actuales, a saber: las múltiples familias análogas a la sepia, las familias tan variadas de los calamares y finalmente las familias de los pulpos. Estos invertebrados que han dominado los mares cálidos en otras épocas geológicas, desde el Cámbrico, se ven en este momento favorecidos en su desarrollo por el cambio climático. No olvidemos que el pulpo es extraordinariamente hábil y además su cerebro puede seguir creciendo (Lee P. N. et al., 2003; Baratte S. et al., 2007).

El gen "*engrailed*" es un factor de transcripción requerido en numerosas especies para las principales etapas del desarrollo (neurogénesis, desarrollo de las extremidades y el establecimiento de los límites de cada homeodominio). Cuando se realizan estudios inmunohistoquímicos, estos genes aparecen con un patrón reproducible, como si fuera un diseño grabado para el desarrollo, de ahí el significado de su nombre (*engrailed*/grabado). Cada uno de esos límites marcados por la proteína se corresponde con la evolución del plan corporal del animal. Los cefalópodos exhiben numerosas peculiaridades morfológicas, como un desarrollo directo, un complejo sistema sensorial y nervioso (ojos, cerebro, axones gigantes), una capa reducida, un embudo y una corona braquial. La expresión de este gen durante la organogénesis, da lugar a patrones tempranos e inesperados en los brazos emergentes, embudo y vesículas ópticas y, posteriormente, en tentáculos y párpados.

En nuestro caso en particular y en los mamíferos en general los genes *engrailed* se expresan activamente durante el desarrollo cerebral, específicamente marcando la separación entre el cerebro medio, la protuberancia y el

bulbo. En particular el gen *engrailed* EN2, se expresa en el cerebelo, puente y la sustancia gris periaqueductal. Los ratones genéticamente modificados KO para este gen, sufren anomalías en la coordinación del movimiento, la capacidad social y tareas de memoria. El tamaño del cerebelo se reduce y tienen una compartimentalización alterada en los hemisferios cerebelares. Las mismas anomalías se observan en estudios neuroanatómicos e imágenes cerebrales de algunos pacientes con la enfermedad de Asperger (ASD) y en Autismo. El gen EN2 está localizado en el brazo corto del cromosoma humano, tiene dos exones y un intrón. Este gen no es solamente necesario para la segmentación en los vertebrados, sino también para reprimir la actividad de muchos otros factores de transcripción, para tener diferenciaciones específicas y equilibradas de las proteínas necesarias en la morfogénesis y desarrollo (Persico A. M., 2013; Persico A. M. & Napolioni V., 2013).

La evolución a la que rendimos culto por habernos puesto en la supuesta cúspide de la inteligencia, dispone de una gran cantidad de mecanismos y alternativas para destronarnos.

6.3. La evolución del cerebro humano.

La evolución humana se caracteriza por un rápido incremento del tamaño y complejidad del cerebro. El avance de las técnicas de secuenciación de restos fósiles ha permitido examinar las bases genéticas de la evolución del cerebro humano. Mediante la genómica comparativa se puede vislumbrar cuáles han sido los cambios genéticos que subyacen, desde el amplio rango de sustituciones de un único nucleótido a los cambios a gran escala del genoma. Las consecuencias funcionales de estos cambios varían ampliamente, incluyendo desde alteraciones en la secuencia de las proteínas, o de la expresión de otras, al alterar las zonas promotoras, con emergencia de nuevos genes y la extinción de otros existentes.

Un hito en la biología humana es el incremento de su capacidad cognitiva. Lo que le ha permitido acceder a la creación de utensilios con desarrollo y mejora constante de las técnicas utilizadas, ayudado por la mayor posibilidad

de comunicación al disponer del desarrollo paralelo del lenguaje, del mundo simbólico, del arte y finalmente la ciencia. Este desarrollo ha dirigido nuestra evolución cultural como especie, y la creación y diseminación del conocimiento que trasciende nuestros propios genes.

Desde que nos hemos separado del tronco común evolutivo con el chimpancé, hace aproximadamente 6 millones de años, nuestro cerebro ha triplicado su tamaño, y con respecto a los monos con cola del Nuevo Mundo, separados del tronco común hace unos 35 millones de años, el volumen de nuestro cerebro es ocho veces más grande. Este crecimiento cerebral no ha mantenido las relaciones de tamaño entre las diversas regiones cerebrales. El desarrollo del córtex cerebral es, con mucho, la estructura que más se ha desarrollado, proporcionalmente. Señalando que dentro de esta estructura la zona del córtex prefrontal es la que ha ganado mayor tamaño y complejidad.

La posibilidad de secuenciar los genes y posteriormente comparar las secuencias mediante los big-data de genómica comparativa, han permitido conocer los genes implicados en el desarrollo cerebral y la importancia de sus mutaciones en la evolución. La abundancia de datos y su procesamiento han incrementado de modo exponencial la comprensión de las bases genéticas de la neurobiología. Muchos de los genes que han resultado relevantes han permitido conocer su implicación en las funciones normales y en situaciones patológicas del cerebro. Sin olvidar que, también permiten comprender cómo la expresión más o menos aumentada o reducida de los genes entre especies puede aportar sólidas evidencias de cómo se ha producido la evolución de las propias estructuras cerebrales.

Entre los humanos y otros mamíferos hay numerosas diferencias entre las secuencias de sus proteínas. Incluso cuando nos comparamos con nuestro pariente más próximo, el chimpancé, la mayoría de las proteínas muestran por lo menos el cambio de un aminoácido. Muchas de estas diferencias no tienen consecuencias funcionales y por lo tanto no son relevantes para la evolución

del fenotipo humano. Sin embargo, algunos cambios sin duda tienen efectos funcionales importantes y un subconjunto de ellos podría contribuir a las características intrínsecas del cerebro humano.

6.3.1. La capacidad cerebral desde los monos al Homo Sapiens.

Desde los humanos, al más pequeño de los monos, todos tenemos el mismo número de genes, pero el volumen es muy diferente. El cerebro humano actual tiene un volumen entre 1129-1685 cm³, de media generalmente 1400 cm³, es decir, que no alcanza el litro y medio. En los millones de años desde que los humanos hemos compartido antepasado común con las diferentes especies de monos, hemos ido incrementando el volumen cerebral de modo muy acusado, pero no tanto las diferencias genéticas. Basten dos ejemplos extremos: 1) los monos del nuevo mundo, que se han separado hace como mínimo 35 millones de años del tronco evolutivo común, tienen un volumen cerebral entre 4 y 120 cm³, es decir entre 10 y 350 veces menor que el nuestro. Mientras que las diferencias genéticas en sus proteínas apenas alcanzan el 11%. 2) La relación con nuestro antepasado más próximo, el chimpancé, que se separó del tronco común hace solamente seis millones de años, tiene un volumen 4 veces menor, y sus diferencias genéticas apenas alcanzan el 1%.

Quizás lo que más nos ha atraído últimamente de la evolución ha sido el descubrimiento de restos antropológicos fósiles muy antiguos, desde los *Australopithecus* al *Homo Antecessor*, los *Denisovanos*, los *Neandertales* y finalmente el *Homo Sapiens*. Gracias a *Atapuerca* tenemos una ventana al pasado de la humanidad, quizás la más completa de todas las conocidas. Los restos fósiles de los homínidos allí rescatados han aportado y aportarán muchas de las claves que todavía desconocemos de nuestra evolución para llegar a humanos. El esfuerzo y tesón de los paleontólogos españoles liderados por *Arsuaga*, *Bermúdez de Castro* y *Carbonell*, han dado el ejemplo de cómo gestionar un patrimonio singular y único, sirvan estas líneas para dejar constancia de mi admiración (*Arsuaga J. L. et al., 1993; Bermúdez de Castro J. M. et al., 1999; Meyer M. et al., 2014*).

Los estudios de genética evolutiva fueron iniciados por el gran científico Svante Pääbo, que adaptó y creó técnicas genéticas para el estudio de las muestras fósiles, siendo actualmente director del Departamento de Genética del Instituto Max Planck de Antropología Evolutiva en Leipzig, Alemania. En 2014, el grupo de Arsuaga le proporcionó a Svante Pääbo muestras de individuos fósiles, homínin, de la Sierra de Atapuerca de unos 300.000 años de antigüedad. Los resultados del ADN mitocondrial fueron sorprendentes, pues no se correspondían con los Neandertales, más bien pertenecían a una especie anterior y relacionada que ocupó las llanuras de Eurasia, los Denisovanos, estos resultados fueron decisivos para interpretar la amplia distribución de otros homínin en Eurasia y sus parentescos (Meyer M. et al., 2014; Fu Q. et al., 2016). Anterior a esta colaboración, Svante Pääbo en febrero de 2009, anunció que en el Instituto Max Planck de Antropología Evolutiva se había completado el borrador de la primera versión del genoma del Neandertal, con más de 3.000 millones de pares de bases secuenciadas. En uno de sus artículos: *Genetic Time Travel. // Viaje en el Tiempo Genético* (Krause J., Pääbo S., 2016), Svante Pääbo hace la siguiente reflexión:

“At its core, genetics is a historical discipline. Mutations are passed on from generation to generation and accumulate as a result of chance as well as of selection within and between populations and species. However, until recently, geneticists were confined to the study of present-day genetic variation and could only indirectly make inferences about the historical processes that resulted in the variation in present-day gene pools. This “time trap” has now been overcome thanks to the ability to analyze DNA extracted from ancient remains, and this is about to revolutionize several aspects of genetics.”

“En esencia, la genética es una disciplina histórica. Las mutaciones se transmiten de generación en generación y se acumulan como resultado del azar, así como de la selección dentro y entre las poblaciones y especies. Sin embargo, hasta hace poco, los genetistas se limitaban al estudio de la variación genética actual y sólo podían indirectamente extraer conclusiones sobre los procesos históricos que resultaron en la variación de los grupos de genes actuales. Esta “trampa de tiempo” ha sido superada gracias a la capacidad de analizar el ADN extraído de restos antiguos, y esto está a punto de revolucionar múltiples aspectos de la genética”.

La historia genética de la edad del hielo en Europa, llevada a cabo por el grupo de Svante Pääbo ha demostrado que los actuales residentes llevamos un cierto porcentaje de Neandertal en nuestro ADN. Podemos afirmar que en la Europa prehistórica las migraciones y cambios rápidos de las poblaciones han sido una constante. Quizás este hecho nos sirva de reflexión para prever el futuro (Fu, Q. et al., 2016).

6.3.2. ¿Cómo se realiza físicamente la organización del cerebro? La glía radial: El andamiaje del cerebro en el origen de las células neurogliales y su migración.

En 1998 Magdalena Götz realizó un descubrimiento crucial, es el primero que hace referencia al descubrimiento de que el gen Pax6 (un gen homeótico, Hox) 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.

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 describe la glía radial 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.

Magdalena Götz y su grupo 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 factor transcripcional 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 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).

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).

6.3.3. La originalidad y poder del córtex cerebral humano. El mensaje del virus del Zika.

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. Tanto es así, que un consorcio internacional de Ingenieros de Harvard y Cambridge (Massachusetts), y de neurocientíficos anatomistas franceses y finlandeses participaron en el trabajo (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: ¿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 (Stahl 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.

Las causas de la lisencefalia, carencia de giros y aspecto liso del córtex, pueden tener muy diverso origen: alteraciones genéticas, el gen *Lis1*, *Nde1* 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 qué vías de señalización utiliza para disminuir de modo tan drástico la producción de células neurogliales que resulta en la reducción del tamaño cerebral. 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 y la duplicación del DNA celular previa a la mitosis no puede organizarse correctamente para dar lugar a una mitosis completa. 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).

6.4. *El gen del lenguaje: FOXP2.*

Pero, ¿qué cualidad nos hace humanos? Los filósofos, desde los más antiguos, hasta los más modernos han sido siempre seducidos por el lenguaje. ¿De qué depende nuestra capacidad de hablar? ¿Somos tan especiales como creemos? El gen FOXP2 nos dará muchas sorpresas y responderá algunas de nuestras preguntas.

El descubrimiento del gen FOXP2 fue obra del grupo de Simon Fisher en el *Centro Wellcome de Genética Humana* de la Universidad de Oxford. Curiosamente, lo que llevó a la búsqueda de este gen, fue la observación de que en una escuela de logoterapia existía un grupo de niños de la misma familia, originaria de Pakistán, la familia KE, que presentaban determinados defectos del habla. El estudio de toda la familia demostró que era hereditario de tipo mendeliano y dominante. El defecto estaba en un gen y se localizaba en el cromosoma 7, donde se encuentra el gen FOXP2. El gran avance para su identificación lo realizan en el año 2002, conjuntamente, el grupo de Fisher y el de Svante Pääbo, cuando secuencian el gen de la familia KE y otros con problemas de afasias (Enard W. et al., 2002). El descubrimiento de este gen está además en el núcleo de una apasionante historia genética y sociocultural de la familia KE. (Fisher S. E., 2019; Graham S. A., Fisher S. E., 2015; Marcus G. F. & Fisher S. E., 2003).

La proteína codificada en el gen FOXP2 es un factor de transcripción que regula la traducción de otros genes y formación de las correspondientes proteínas, controlando hasta 100 genes diferentes, muchos de ellos implicados en el desarrollo y organización del sistema nervioso. Entre ellos la expresión de proteínas que controlan la longitud de los axones y su interacción para

formar haces de conexión entre diferentes partes del hemisferio izquierdo y los músculos de la laringe, que controlan nuestro sistema fonador (Graham S. A. & Fisher S. E., 2015; Chen Y. C. et al., 2016).

La asignación de zonas cerebrales al lenguaje se inició con el estudio del cerebro *post mortem* de lesiones accidentales, así sucedió con el área de Broca localizada en la tercera circunvolución frontal del hemisferio izquierdo, relacionada con la articulación del lenguaje y muy próxima con las áreas del movimiento. Su lesión provoca una afasia, con escasa capacidad para articular palabras, conservando la comprensión de las frases. Esta zona se conecta mediante el fascículo arquato con el área de Wernicke, localizado en el córtex temporal, su lesión resulta en la ausencia de comprensión del lenguaje hablado. La persona habla, pero no sabe lo que dice.

Los filósofos, desde los más antiguos, hasta los más modernos han sido siempre seducidos por el lenguaje, he aquí una pequeña muestra:

Aristóteles: ... Y es que la naturaleza no hace nada en vano, y entre los animales, el hombre es el único que posee la palabra.

Ludwig Wittgenstein: Una palabra nueva es como una semilla fresca que se arroja al terreno de la discusión.

Noam Chomsky: "When we study human language, we are approaching what some might call the 'human essence', the distinctive qualities of mind that are, so far as we know, unique to man".

El famoso filósofo y lingüista Noam Chomsky escribió: *"Cuando estudiamos el lenguaje humano, nos aproximamos a lo que podríamos llamar 'la esencia humana', las cualidades características de la mente, que hasta la fecha son exclusivas del ser humano".*

En el siglo XXI, ya no estamos tan seguros de ser los únicos. El lenguaje es una habilidad motora y viaja hacia los músculos por las vías de control

del movimiento. Pero sí podemos decir que somos la única especie que tiene un fenotipo del lenguaje.

6.4.1. Mapeando el gen FOXP2, dañado en la familia KE y de otros individuos y especies.

Los humanos tenemos 23 pares de cromosomas. El gen FOXP2 está en el brazo largo del cromosoma 7. Al comparar la secuencia del gen normal, con el de la familia KE, se demostró que solamente tenía cambiada una base (G>A) que originaba el cambio de un único aminoácido en la proteína, R553H, de una Arginina a una Histidina en el aminoácido 553 de la secuencia proteica. Es hereditaria y monogénica, aunque los humanos tenemos dos genes, alelos, uno de procedencia paterna y otro materno, basta la presencia de uno con el cambio, para que se produzcan las alteraciones del lenguaje.

¿Cómo explicar que una alteración tan simple, de un único aminoácido, produzca efectos tan precisos y devastadores en la articulación del lenguaje? En primer lugar este gen se expresa abundantemente durante la embriogénesis y durante el desarrollo de los axones en las etapas más tardías y adultas, en las fibras descendentes y núcleos del tracto corticobulbar importantes en la elaboración del lenguaje. Esto era lo esperable. Además resultó ser un miembro de la familia conocida como Forkhead box P2 (FOXP2). Todos ellos factores que regulan la transcripción.

Los humanos tenemos 43 genes FOX clasificados en familias y subfamilias. Los FOXP-1, FOXP-2 y FOXP-3 son esenciales en el desarrollo del cerebro humano desde las etapas embrionarias. Las proteínas codificadas en estos genes son factores de transcripción que regulan la expresión de un elevado número de genes. El gen anómalo en la familia KE es el FOXP2, cuyos niveles más altos se encuentran en la capa VI del córtex, estructuras subcorticales de la base del cerebro, muy próximas al cuerpo caloso: núcleos basales, tálamo, núcleos pontinos y cerebelo. FOXP2 codifica para una proteína que se une al DNA de nuestros cromosomas y controla la expresión de otros genes. La proteína FOXP2 controla múltiples genes, entre ellos algunos esen-

ciales en la formación de conectividades nerviosas desde el córtex motor del lenguaje hacia los núcleos basales que perfeccionan el movimiento y también alcanzan el cerebelo, para dar suavidad al lenguaje. Para organizar el lenguaje es necesario que la vía neural de señalización alcance de modo preciso los músculos de la laringe y de la lengua. La gran cantidad de genes que controla el FOXP2 en el cerebro lo confirman como un director de la orquesta genómica, en el desarrollo y mantenimiento cerebral. La secuenciación del genoma humano, y su bajo coste actual, ha permitido secuenciar el gen FOXP-2 humano en aquellas familias con disprasia y otras alteraciones del lenguaje o con otras relacionadas con autismo y dificultades de aprendizaje y motoras (Krause et al., 2007; Oswald F., 2017).

6.4.2. FOXP2 en Neandertales y otros parientes mamíferos.

El análisis de los diferentes grupos humanos actuales apuntaba a una aparición muy reciente, hacia 200.000 años atrás, del gen FOXP2, pero la secuenciación de genomas arcaicos nos ha dado otra visión de nosotros mismos.

Se ha discutido muchas veces si los Neandertales tenían, o no, la capacidad de hablar. Cuando Svante Pääbo consiguió secuenciar el genoma de los Neandertales, surgió la oportunidad única de comparar la secuencia del gen FOXP2, con el Homo Sapiens. Indicar que los estudios se hicieron con el ADN aislado de los Neandertales de la cueva asturiana del Sidrón y de Vindija en Croacia. La proteína codificada por este gen es idéntica, contiene 715 aminoácidos. Los estudios de la secuencia del gen indican que el gen FOXP2 ha aparecido hace mucho más tiempo... y que es idéntico al de los humanos “modernos”... ¡Ya veremos qué encontramos en Atapuerca! (Krause J, & Pääbo S., 2016; Krause et al., 2007).

¿Somos tan especiales los Humanos? En 6 millones de años de divergencia evolutiva las variaciones del gen “del lenguaje” FOXP2 entre el chimpancé y el humano son solamente de 2 aminoácidos. Considerando el ratón

tenemos tres variaciones. Los genes del chimpancé y el ratón, se parecen más entre sí que al humano. Respecto al número de aminoácidos los humanos tenemos 715 aminoácidos, los chimpancés 716 y el ratón 714.

¿Para qué sirve el gen del lenguaje FOXP2 en otros mamíferos? Empezando por el ratón, le sirve para organizar su desarrollo cerebral. Le permite emitir sonidos aprendidos de la madre (chit / chit). Le permite emitir ultrasonidos aprendidos también de la madre que nuestro oído no es capaz de percibir (solo cuando los humanos somos bebés podemos oírlo), que son una gran ventaja para evitar los depredadores. Perfeccionar el aprendizaje motor. En ratones genéticamente modificados a los que se les introduce el gen anómalo de la familia KE, disminuyen todas sus capacidades de aprendizaje motor, incluidos los del movimiento de los músculos para emitir sonidos.

¿Y qué pasa en el murciélago? A los murciélagos si se les bloquea la expresión del gen FOXP2, pierden la capacidad de ecolocalización y chocan con los obstáculos por la noche. No pueden emitir los ultrasonidos, que posteriormente capta su sistema auditivo y les evita chocar con obstáculos o les da información sobre sus presas. Esta especie de sonar es similar al de los delfines y cachalotes.

¿Y qué pasa en las aves? El gen de las aves estudiadas es muy similar al de los mamíferos. Pero nuestro interés se fija más en los pájaros cantores y las familias de los loros. Los pinzones y canarios necesitan este gen para aprender a cantar, lo que encierra una gran sorpresa.

6.4.3. El gen FOXP2, aves cantoras, y las primeras evidencias de neurogénesis en el cerebro adulto.

Pero las aves nos reservaban una gran sorpresa. 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.

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 (Álvarez-Buylla and Nottebohm, 1988; Álvarez-Buylla et al., 1990). Unos años más tarde, en 1997, publicaron un interesante artículo, sobre 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 (Álvarez-Buylla and Kirn, 1997).

El aprendizaje vocal es un rasgo filogenéticamente muy escaso y aparece en muy pocos linajes evolutivos, incluyendo humanos y algunas familias de aves. Estas aves, que incluyen pájaros cantores y loros, muestran algunas fases convergentes con los seres humanos, en su desarrollo de vías cerebrales para la comunicación vocal aprendida. Actualmente se hace hincapié en su valor como posibles modelos para investigar la base neuronal y genética del aprendizaje vocal. En los pájaros cantores los niveles de expresión del gen FOXP2, cambian durante el desarrollo y de modo muy acusado en los ganglios basales, más específicamente en el estriado donde está el Área X que es esencial para el aprendizaje del canto. Si silenciamos el gen FOXP2, los machos no pueden imitar los sonidos del canto, sin este gen no aprenden a cantar. En el periquito, no obstante, tanto los machos como las hembras conservan la habilidad de aprender nuevas palabras y llamadas de contacto en su etapa adulta. Tanto el gen FOXP2, como otro miembro de la familia, el FOXP1 se expresan en el núcleo de aprendizaje vocal del estriado, el *magnocellularis* y el estriado medio (Hara E. et al., 2015).

El lenguaje es una función lateralizada, fundamentalmente en el hemisferio izquierdo por eso, no hemos hablado de la emoción del lenguaje, del canto que nos hace vibrar, ni de otros Genes FOX, ni de autismo ni de la interacción en la tribu humana. No hemos nombrado el hemisferio derecho,

pero el lenguaje lleva otros parámetros de comunicación muy sutiles que requieren una modulación especial, una conexión con las vivencias previas, con nuestra historia como humanos singulares, y eso requiere conectar el hemisferio izquierdo con el derecho a través del cuerpo calloso que está especialmente desarrollado en las mujeres.

7. LA SINGULARIDAD Y EL PODER DE LA GLÍA HUMANA.

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). 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. Los investigadores se preguntaron durante mucho tiempo cuál 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).

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 acopladas a segundos

anticuerpos fluorescentes permiten una visualización perfecta del entramado glial del cerebro en microscopía 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). 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). Excelentes revisiones de su obra han sido realizadas recientemente por el grupo del profesor Carlos Matute (Pérez-Cerdá et al., 2015), y por el grupo del Profesor Kettenmann del Centro Max Delbrück de Medicina Molecular de Berlín, 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).

7.1. 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 endimarias. 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. Recientemente, se considera que la microglía participa intensamente en los procesos inflamatorios cerebrales y es uno de los elementos destacados en el origen y desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas.

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.

7.2. 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).

7.3. 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 *post mortem*, 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 *post mortem* 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, 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; 2002; 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 localizada entre las capas 5- 6, cuyas prolongaciones tienen va-

ricosidades, 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 qué ventajas supone la complejidad de la glía humana en el funcionamiento cerebral?

7.4. *Astroцитos: La sinapsis tripartita.*

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 si 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 astrogliar 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 exocítica 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 hidrolíticas y secuestrando 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 astrogliar de la sinapsis*”.

Esta estructura astrogliol 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 sináptico, 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 como 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: 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. El acceso al estudio del funcionamiento del cerebro “in vivo” mediante la microscopía 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.

7.5. *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., 2012). 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 neoestriado 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, la primera pregunta obligatoria es: ¿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 estos ratones 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. Estamos hablando de animales quiméricos y lo sorprendente es que esta técnica es real, reproducible, y permitirá comprender en mayor profundidad el cerebro, como demostró el grupo de Steven Goldman (Windrem et al., 2014).

7.6. 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 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 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 imáge-

nes 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 (Ullén, 2009; Scholtz et al., 2009; Carreiras et al., 2009; Fields, 2010).

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 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 que mantienen estimulada 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 nucleótido 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).

7.6.1. Oligodendrocitos, cuerpo calloso y el cerebro de Einstein

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 microscopia. 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, 76 años, cuando falleció.

7.7. Los trasplantes de oligodendrocitos, desórdenes neurológicos asociados y una CRISP para el futuro.

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, 2012). Los trasplantes de glía permitieron el estudio de una gran variedad de desórdenes neurológicos, ya que las células progenitoras de glía podrían 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, e impide a los oligodendrocitos aislar de modo conveniente los axones del sistema nervioso central.

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 plenamente los temblores continuados del animal, alar-

gando 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 proporcionar 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 una vez corregidos (Heindenreich and Zang, 2016).

8.- REFLEXIONES FINALES.

Espero haberles convencido de que nuestro cerebro es “humildemente portentoso” y que compartiendo todos los elementos con otros seres más o menos grandes, tiene mucho de viejo, algo de readaptado, algo original y mucho de incomprensible.

He querido mostrarles que nuestras habilidades más prodigiosas las hemos heredado de muy diversos seres que cubren todo el espectro evolutivo desde las bacterias más primitivas, las *Archeas*, que nos han enseñado a captar la luz. Su mecanismo con algo más de 1.000 (mil) millones de años sigue vivo en la retina de nuestros ojos. Y somos de los pocos mamíferos que vemos en

color, aunque las palomas y los pollos de corral nos superan en la captación de los colores, hasta el ultravioleta...

Las algas unicelulares, las bacterias de las salinas, y *C. intestinalis* nos han dado los canales iónicos, para enviar las corrientes por nuestros nervios y así movernos, bailar, y hasta pensar. También, junto con las medusas nos han proporcionado las tecnologías más poderosas para el estudio del cerebro y lo podemos hacer fluorescente en todos los colores.

Una pequeña larva de la camisa de mar (*Ciona intestinalis*), antepasado lejano de los vertebrados, nos dio pistas de cuál era la función de aquel primer esbozo de cerebro: moverte para comer y escapar. Nos enseñó el prototipo más primitivo y sencillo de los animales, cuyos planes hemos seguido, aumentando su complejidad, pero en esencia, casi lo mismo, somos un producto segmentado de los genes homeóticos, genes Hox, nosotros tenemos 39. La pequeña ciona tiene 9, es decir 4 veces menos. Nos sorprendió que al final de sus axones tuviera receptores para los cannabinoides. Por supuesto que no los utilizaría para fines lúdicos, pero nos hace reflexionar que posiblemente las plantas de cannabis sativa, han fabricado las moléculas de cannabinoides para defenderse de algunos gusanos o insectos que se las comían.

El gusano *Caenorhabditis elegans*, es una de nuestras estrellas, 302 neuronas numeradas, de las que sabemos todo, es un gusano en el que hemos desarrollado toda la tecnología. El primero en ser secuenciado por completo su genoma, el primero en donde estudiar las mutaciones precisas y hacer sus genes fluorescentes. Poner a punto el RNA de interferencia. Una gran ayuda en el estudio del envejecimiento, metabolismo y su relación con nuestras enfermedades degenerativas. Ha ayudado a excelentes investigadores a conseguir el premio Nobel.

Nuestra capacidad cerebral ha seguido creciendo desde los monos más primitivos, pero últimamente todo parece indicar que se frena y es más reducida que la del Neandertal. Es posible que con tanto ordenador no necesite-

mos almacenar tantos datos y situaciones de supervivencia en el cerebro. La cuestión es que no estaremos aquí para verlo.

Sin duda alguna nos seguimos preguntando ¿qué nos hace humanos? Antes era el lenguaje, considerado como una propiedad única de nuestra especie. ¿Quizás sean las circunvoluciones cerebrales? Que nos dan la inmensa capacidad neuronal de pensar y sentir. ¿Quizás hayan sido nuestras portentosas células gliales?, que envuelven y protegen nuestras neuronas, también nuestras sinapsis, que son capaces de colonizar o reparar otros cerebros.

Quizás tengamos que esperar mucho tiempo hasta llegar a comprender lo que supone tener un cerebro como el nuestro y la responsabilidad que entraña el vértigo de ser responsables de nuestro propio destino.

9.- BIBLIOGRAFÍA

Acemel RD, Tena JJ, Irastorza-Azcarate I, Marlétaz F, Gómez-Marín C, de la Calle-Mustienes E, Bertrand S, Diaz SG, Aldea D, Aury JM, Mangenot S, Holland PW, Devos DP, Maeso I, Escrivá H, Gómez-Skarmeta JL. (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.

Adamantidis A, Arber S, Bains JS, Bamberg E, Bonci A, Buzsáki G, Cardin JA, Costa RM, Dan Y, Goda Y, Graybiel AM, Häusser M, Hegemann P, Huguenard JR, Insel TR, Janak PH, Johnston D, Josselyn SA, Koch C, Kreitzer AC, Lüscher C, Malenka RC, Miesenböck G, Nagel G, Roska B, Schnitzer MJ, Shenoy KV, Soltesz I, Sternson SM, Tsien RW, Tsien RY, Turrigiano GG, Tye KM, Wilson RI. (2015). Optogenetics: 10 years after ChR2 in neurons--views from the community. *Nat Neurosci.* 2015 Sep; 18(9):1202-12. doi: 10.1038/nn.4106. Review. PMID: 26308981

Altman J, Das GD. 1965. Autoradiographic and histological evidence of post-natal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124: 319–335.

Apfeld J, Kenyon C. (1999) Regulation of lifespan by sensory perception in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1999 Dec 16; 402 (6763) :804-9. PMID:10617200.

Anday J.K,& Mercier RW.(2005). Gene ancestry of the cannabinoid receptor family. *Pharmacol Res*. 2005 Dec; 52(6):463-6. Epub 2005 Aug 22. PMID :16118055.

Arantes-Oliveira N, Berman JR, Kenyon C. (2003). Healthy animals with extreme longevity. *Science*. 2003 Oct 24;302(5645):611. PMID: 14576426.

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.

Arsuaga JL, Martínez I, Gracia A, Carretero JM, Carbonell E. (1993). Three new human skulls from the Sima de los Huesos Middle Pleistocene site in Sierra de Atapuerca, Spain. *Nature*. 1993 Apr 8;362(6420):534-7. PMID: 8464493

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 JR (1997). Birth, migration, incorporation, and death of vocal control neurons in adult songbirds. *J. Neurobiol* 33: 585-601.

Back SA, Luo NL, Borenstein NS, Levine JM, Volpe JJ, Kinney HC. (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

Bargmann CI.(1998) Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* Genome. *Science* 11 Dec 1998 : 2028-2033.

Baratte S. Andouche A. Bonnaud L. (2007) Engrailed in cephalopods: a key gene related to the emergence of morphological novelties. *Development Genes and Evolution*, 217, pp 353–362 |

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

Bermúdez de Castro JM, Rosas A, Carbonell E, Nicolás ME, Rodríguez J, Arsuaga JL.(1999). A modern human pattern of dental development in lower pleistocene hominids from Atapuerca-TD6 (Spain). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Mar 30;96(7):4210-3. PMID: 10097189.

Blum, J.C.; Chang, AL.; Liljeström, M.; Schenk, M.E.; Steinberg, M.K.; Ruiz, G.M. (2007). “The non-native solitary ascidian *Ciona intestinalis* (L.) depresses species richness”. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.* 342: 5–14. doi:10.1016/j.jembe.2006.10.010.

Boyden ES, Marblestone AH. (2019) Architecting Discovery: A Model for How Engineers Can Help Invent Tools for Neuroscience. *Neuron.* 2019 May 8;102(3):523-525. doi: 10.1016/j.neuron.2019.03.023. PMID: 31071286

Brown LS. (2014) Eubacterial rhodopsins - unique photosensors and diverse ion pumps. *Biochim Biophys Acta.* 2014 May;1837(5):553-61. doi: 10.1016/j.bbabi.2013.05.006. Epub 2013 Jun 6. Review. PMID:23748216

Buck L & Axel R. (1991) A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*

Buck LB. (2006) Unraveling smell. *Harvey Lect.* 2005-2006;101:117-34. Review. PMID: 18030978.

Bunk EC, Ertaylan G, Ortega F, Pavlou MA, Gonzalez Cano L, Stergiopoulos A, Safaiyan S, Völs S, van Cann M, Politis PK, Simons M, Berninger B, Del Sol A, Schwamborn JC. (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 no. 2, 659-797 DOI: 10.1152/physrev.00043.2006.

Carneseccchi J, Pinto PB, Lohmann I. (2018). Hox transcription factors: an overview of multi-step regulators of gene expression. *Int J Dev Biol.* 2018;62(11-12):723-732. doi: 10.1387/ijdb.180294il.

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 MT. (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 ML, Baquero S, Estévez A, Lozano A, Devlin JT, Price CJ. (2009) An anatomical signature for literacy. *Nature.*;461(7266):983-6. doi: 10.1038/nature08461. PMID:19829380.

Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W., Prasher D.C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263 (1994), pp. 802-805

Chalfie M, Everly R.(2019). US national academies offer tools for human rights in science. *Nature*. 2019 Feb;566(7743):182. doi: 10.1038/d41586-019-00550-x. PMID:30755762

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.

Chen YC, Kuo HY, Bornschein U, Takahashi H, Chen SY, Lu KM, Yang HY, Chen GM, Lin JR, Lee YH, Chou YC, Cheng SJ, Chien CT, Enard W, Hevers W, Pääbo S, Graybiel AM, Liu FC. (2016). Foxp2 controls synaptic wiring of corticostriatal circuits and vocal communication by opposing Mef2c. *Nat Neurosci*. 2016 Nov;19(11):1513-1522. doi: 10.1038/nn.4380. Epub 2016 Sep 5. PMID: 27595386

Chess A, Buck L, Dowling MM, Axel R, Ngai J. (1992). Molecular biology of smell: expression of the multigene family encoding putative odorant receptors. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1992;57:505-16. Review. PMID:1339687.

Cirelli C, Gutierrez CM, Tononi G. (2004). Extensive and divergent effects of sleep and wakefulness on brain gene expression. *Neuron*;41(1):35-43.

Cotrina ML, 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.

Dehal P, et al. (n>100 investigadores) (2002). The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins. *Science*. 2002 Dec 13;298(5601):2157-67. PMID: 12481130.

Deisseroth K. (2016). A look inside the brain. *Scientific American*. Divulgación. 2016.

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.

Deryckere A. & Seuntjens E. (2018) The Cephalopod Large Brain Enigma: Are Conserved Mechanisms of Stem Cell Expansion the Key? *Frontiers in Physiology*. Published on 21 Aug 2018: Open acces.

Díaz-Hernandez JI, Gomez-Villafuertes R, León-Otegui M, Hontecillas-Prieto L, Del Puerto A, Trejo JL, Lucas JJ, Garrido JJ, Gualix J, Miras-Portugal MT, Díaz-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.

Díaz-Hernandez M, del Puerto A, Díaz-Hernandez JI, Díez-Zaera M, Lucas JJ, Garrido JJ, Miras-Portugal MT. (2008). Inhibition of the ATP-gated P2X7 receptor promotes axonal growth and branching in cultured hippocampal neurons. *J Cell Sci*. 2008 Nov 15;121(Pt 22):3717-28. doi: 10.1242/jcs.034082. PMID: 18987356.

Domercq M, Perez-Samartin A, Aparicio D, Alberdi E, Pampliega O, Matute C. (2010). P2X7 receptors mediate ischemic damage to oligodendrocytes. *Glia*. 58(6):730-40. doi: 10.1002/glia.20958. PMID: 20029962.

Donkelaar HJT, Broman J, Neumann PE, Puelles L, Riva A, Tubbs RS, and Kachlik D. (2016). Towards a Terminologia Neuroanatomica. *Clinical Anatomy*. November 2016, DOI : 10.1002/ca.22809.

Dou J, Vorobieva AA, Sheffler W, Doyle LA, Park H, Bick MJ, Mao B, Foight GW, Lee MY, Gagnon LA, Carter L, Sankaran B, Ovchinnikov S, Marcos E, Huang PS, Vaughan JC, Stoddard BL, Baker D. (2018). De novo design of a fluorescence-activating β -barrel. *Nature*. 2018. Sep; 561(7724):485-491. doi: 10.1038/s41586-018-0509-0. Epub 2018 Sep 12. PMID:30209393

Elphick, MR. (2012). “The evolution and comparative neurobiology of endocannabinoid signalling”. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 367 (1607): 3201–3215. doi:10.1098/rstb.2011.0394 *Nature Neuroscience*. 2016.

Enard W, Przeworski M, Fisher SE, Lai CS, Wiebe V, Kitano T, Monaco AP, Pääbo S. (2002). Molecular evolution of FOXP2, a gene involved in speech and language. *Nature*. 2002 Aug 22;418(6900):869-72. Epub 2002 Aug 14. PMID: 12192408.

Engel T, Gomez-Villafuertes R, Tanaka K, Mesuret G, Sanz-Rodriguez A, Garcia-Huerta P, Miras-Portugal MT, Henshall DC, Diaz-Hernandez 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 RD (2010). *Neuroscience. Change in the brain's white matter. Science*. 2010 Nov 5;330(6005):768-9. doi: 10.1126/science.1199139.

Fields RD, 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 AR. (2003). Neurons from radial glia: the consequences of asymmetric inheritance. *Curr Opin Neurobiol.* 13(1):34-41. Review. PMID: 12593980.

Fisher SE. (2019). Human Genetics: The Evolving Story of FOXP2. *Curr Biol.* 2019 Jan 21;29(2):R65-R67. doi: 10.1016/j.cub.2018.11.047. PMID: 30668952.

Fong S, Teo E, Ng LF, Chen CB, Lakshmanan LN, Tsoi SY, Moore PK, Inoue T, Halliwell B, Gruber J. (2016). Energy crisis precedes global metabolic failure in a novel *Caenorhabditis elegans* Alzheimer Disease model. *Sci Rep.* 2016 Sep 22;6:33781. doi: 10.1038/srep33781.PMID: 27653553

Fu Q, et al., Krause J, Pääbo S, Reich D. (2016). The genetic history of Ice Age Europe. *Nature.* 2016 Jun 9;534(7606):200-5. doi: 10.1038/nature17993. Epub 2016 May 2. PMID: 27135931.

Goldman SA, Schanz S, Windrem M.S (2008) Stem cell-based strategies for treating pediatric disorders of myelin. *Hum. Mol. Genet.* 17: R76-R83.

Goldman SA, Nedergaard M, Windrem MS (2012) Glial progenitor cell-based treatment and modelling of neurological disease. *Science* 338: 491-495.

Goldman SA, Nedergaard M, Windrem MS. (2015). Modeling cognition and disease using human glial chimeric mice. *Glia.* 63(8):1483-93. doi: 10.1002/glia.22862. Review.

Gómez-Villafuertes R, García-Huerta P, Díaz-Hernández JI, Miras-Portugal MT. (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.

Gore F, Schwartz EC, Brangers BC, Aladi S, Stujenske JM, Likhnik E, Russo MJ, Gordon JA, Salzman CD, Axel R. (2015) Neural Representations of

Unconditioned Stimuli in Basolateral Amygdala Mediate Innate and Learned Responses. *Cell*. 2015 Jul 2;162(1):134-45. doi: 10.1016/j.cell.2015.06.027.

Gorris R, Fischer J, Erwes KL, Kesavan J, Peterson DA, Alexander M, Nöthen MM, Peitz M, Quandel 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.

Graham SA, Fisher SE. (2015). Understanding Language from a Genomic Perspective. *Annu Rev Genet*. 2015;49:131-60. doi: 10.1146/annurev-genet-120213-092236. Epub 2015 Oct 5. Review. PMID: 26442845

Gutierrez-Carrasquero, Teresa Iglesias, Esmerilda G. Delicado and 1M^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 NA, Bekar L, Betstadt S, Silva AJ, Takano T, Goldman SA, 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.

Hara E, Perez JM, Whitney O, Chen Q, White SA, Wright TF. (2015). Neural FoxP2 and FoxP1 expression in the budgerigar, an avian species with adult vocal learning. *Behav Brain Res*. 2015 Apr 15;283:22-9. doi: 10.1016/j.bbr.2015.01.017. Epub 2015 Jan 16. PMID: 25601574.

Hauser FE, Chang BS. (2017). Insights into visual pigment adaptation and diversity from model ecological and evolutionary systems. *Curr Opin Genet Dev*. 2017 Dec;47:110-120. doi: 10.1016/j.gde.2017.09.005. Epub 2017 Nov 3. Review.PMID: 29102895.

Hayden S, Teeling EC. (2014) The molecular biology of vertebrate olfaction. *Anat Rec (Hoboken)*. 2014 Nov;297(11):2216-26. doi: 10.1002/ar.23031. Review. PMID:25312375.

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.

Ikuta, Tetsuro, and Hidetoshi Saiga. "Organization of Hox genes in ascidians: Present, past, and future." *Developmental Dynamics* 233.2 (2005): 382-89.

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.

Job C, Tan SS. (2003) Constructing the mammalian neocortex: the role of intrinsic factors. *Dev Biol.* 15;257(2):221-32. Review PMID:12729554.

Jorgenson LA, Newsome WT, Anderson DJ, Bargmann CI, Brown EN, Deisseroth K, Donoghue JP, Hudson KL, Ling GS, MacLeish PR, Marder E, Normann RA, Sanes JR, Schnitzer MJ, Sejnowski TJ, Tank DW, Tsien RY, Ugurbil K, Wingfield JC. (2015). The BRAIN Initiative: developing technology to catalyse neuroscience discovery. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2015 May 19;370(1668). pii: 20140164. doi: 10.1098/rstb.2014.0164. Review. PMID:25823863.

Kenyon C. (2005) My adventures with genes from the fountain of youth. *Harvey Lect.* 2004-2005;100:29-70. Review. PMID:16970174

Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R.(1993). A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature.* 1993 Dec 2;366(6454):461-4. PMID :8247153.

Kleiderman S, Gutbier S, Ugur Tufekci K, Ortega F, Sá JV, Teixeira AP, Brito C, Glaab E, Berninger B, Alves PM, 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.

Koyanagi M, Terakita A. (2014). Diversity of animal opsin-based pigments and their optogenetic potential. *Biochim Biophys Acta*. 2014 ;1837(5):710-6. doi: 10.1016/j.bbabbio.2013.09.003. Epub 2013 Sep 13. Review. PMID: 24041647.

Krause J, Lalueza-Fox C, Orlando L, Enard W, Green RE, Burbano HA, Hublin JJ, Hänni C, Fortea J, de la Rasilla M, Bertranpetit J, Rosas A, Pääbo S. (2007). The derived FOXP2 variant of modern humans was shared with Neandertals. *Curr Biol*. 2007 Nov 6;17(21):1908-12. Epub 2007 Oct 18. PMID: 17949978.

Krause J, & Pääbo S. (2016). Genetic Time Travel. *Genetics*. 2016 May;203(1):9-12. doi: 10.1534/genetics.116.187856. PMID: 27183562

Kriegstein, A; Alvarez-Buylla, A (2009). «The glial nature of embryonic and adult neural stem cells.». *Annual review of neuroscience* 32: 149-84.

Lee NP, Callaerts P, de Couet GH. & Martindale MQ (2003). Cephalopod Hox genes and the origin of morphological novelties. *Nature*, 424, pages1061–1065.

Liu Y, Rao MS. (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. 2018.

Lui, J.H., Hansen, D.V., and Kriegstein, A.R. (2011). Development and evolution of the human neocortex. *Cell* 146, 18–36.

Luo Z., Rhie SK., Farnham PJ. (2019). The Enigmatic HOX Genes: Can We Crack Their Code? *Cancers (Basel)*. 2019 Mar 7;11(3). pii: E323. doi: 10.3390/cancers11030323.

Malatesta P, Hack MA, 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.

Marcus, GF & Fisher SE., (2003). FOXP2 in focus: what can genes tell us about speech and language? *Trends Cogn Sci*. 2003 Jun;7(6):257-262. PMID: 12804692.

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 MV. (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 MV, Pérez-Samartín A, Rodríguez-Antigüedad A, Pérez-Cerdá F. (2007) Excitotoxic damage to white matter. *J Anat*. 210(6): 693-702. Review. PMID: 17504270.

McPartland JM, Matias I, Di Marzo V, Glass M. (2006). Evolutionary origins of the endocannabinoid system. *Gene*. 2006 Mar 29;370:64-74. Epub 2006 Jan 23. PMID: 16434153

Mehler MF. (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 MT, Diaz-Hernandez JI, Gomez-Villafuertes R, Diaz-Hernandez M, Artalejo AR, 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 MT, Gomez-Villafuertes R, Gualix J, Diaz-Hernandez JI, Artalejo AR, Ortega F, Delicado EG, Perez-Sen R. (2016) Nucleotides in neuroregeneration and neuroprotection. *Neuropharmacology.* 104:243-54. doi: 0.1016/j.neuropharm. 2015.09.002. Review. PMID: 26359530.

Meyer M, Fu Q, Aximu-Petri A, Glocke I, Nickel B, Arsuaga JL, Martínez I, Gracia A, de Castro JM, Carbonell E, Pääbo S. (2014). A mitochondrial genome sequence of a hominin from Sima de los Huesos. *Nature.* 2014 Jan 16;505(7483):403-6. doi: 10.1038/nature12788. Epub 2013 Dec 4. PMID:24305051

Moreno-Jiménez EP, Flor-García M, Terreros-Roncal J, Rábano A, Cafini F, Pallas-Bazarra N, Ávila J, Llorens-Martín M. (2019). Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer’s disease. *Nat Med.* 2019 Apr;25(4):554-560.

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.

Nguyen QT & Tsien RY. (2013). Fluorescence-guided surgery with live molecular navigation--a new cutting edge. *Nat Rev Cancer.* 2013 Sep;13(9):653-62. doi: 10.1038/nrc3566. Epub 2013 Aug 8. Review. PMID:23924645.

Nowakowski TJ, Pollen AA, Sandoval-Espinosa C, Kriegstein AR. (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 NA, Takano T, Han X, He W, Lin JH, Wang F, Xu Q, Wyatt JD, Pilcher W, Ojemann JG, Ransom BR, Goldman SA, Nedergaard M. (2009). Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *J Neurosci*. 2009; 29:276-87.

Onorati M, Li Z, Liu F, Sousa AM, Nakagawa N, Li M, Dell'Anno MT, Gulden FO, Pochareddy S, Tebbenkamp AT, Han W, Pletikos M, Gao T, Zhu Y, Bichsel C, Varela L, Szigeti-Buck K, Lisgo S, Zhang Y, Testen A, Gao XB, Mlakar J, Popovic M, Flamand M, Strittmatter SM, Kaczmarek LK, Anton ES, Horvath TL, Lindenbach BD, 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 MR. (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: 2364446.

Oswald F, Klöble P, Ruland A, Rosenkranz D, Hinz B, Butter F, Ramljak S, Zechner U, Herlyn H. (2017). The FOXP2-Driven Network in Developmental Disorders and Neurodegeneration. *Front Cell Neurosci*. 2017 Jul 6;11:212. doi: 10.3389/fncel.2017.00212. eCollection 2017. PMID: 28798667.

Palmer BA., Taylor GJ., Brumfeld V., Gur D., Shemesh M., Elad N., Osherov A., Oron D., Weiner S., Addadi L. (2017) BIOLOGICAL OPTICS. The image-forming mirror in the eye of the scallop, *Science*, 358, 1172–1175 (2017).

Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jęftinija K, Jęftinija S, Haydon PG. (1994). Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature*;369 (6483):744-747.

Parpura V, Heneka MT, Montana V, Olie SH, Schousboe A, Haydon PG, Stout RF Jr, Spray DC, 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.

Persico AM,(2013). in *Neural Circuit Development and Function in the Brain*, 2013. 34.4.6. The Engrailed 2 Gene.

Persico AM, Napolioni V. (2013). Autism genetics. *Behav Brain Res.* 2013 Aug 15;251:95-112. doi: 10.1016/j.bbr.2013.06.012. Epub 2013 Jun 13. Review. PMID: 23769996

Pérez-Cerdá F, Sánchez-Gómez and Matute C. (2015) Pío del Río Horta and the Discovery of the Oligodendrocytes. *Front. Neuroanat.* 9, 92/ doi: 10.3389.

Pesch, U. (2015). Engineers and Active Responsibility. *Science and Engineering Ethics*. August 2015, Volume 21, Issue 4, pp 925–939 |

Pir GJ, Choudhary B, Mandelkow E. (2017). *Caenorhabditis elegans* models of tauopathy. *FASEB J.* 2017 Dec;31(12):5137-5148. doi: 10.1096 /fj.201701007. Review.PMID:29191965

Puelles L, and Rubenstein JL. (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 JL. (2003) Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends Neurosci.* 26: 469-76.

Putnam, NH; Butts T; Ferrier DE; Furlong RF; Fellsten U; et al. (2008). “The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype”. *Nature.* 453 (7198): 1064–71. doi:10.1038/nature06967. PMID 18563158.

Qian X, Nguyen HN, Song MM, Hadiono C, Ogden SC, Hammack C, Yao B, Hamersky GR, Jacob F, Zhong C, Yoon KJ, Jeang W, Lin L, Li Y, Thakor J, Berg DA, Zhang C, Kang E, Chickering M, Nauen D, Ho CY, Wen Z, Christian KM, Shi PY, Maher BJ, Wu H, Jin P, Tang H, Song H, Ming GL. (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 (1913-c). Estudios sobre la Degeneración y Regeneración del sistema nervioso.

Rubenstein JLR; Martinez S, Shimamura K, and Puelles L. (1994). The embryonic vertebrate forebrain: The prosomeric model. *Science*, 266: 578-580.

Satoh, N. (2003). “The ascidian tadpole larva: comparative molecular development and genomics”. *Nature Reviews Genetics*. 4 (4): 285–295. doi:10.1038/nrg1042. PMID 12671659.

Scholz J, Klein MC, Behrens TE, Johansen-Berg H. (2009) Training induces changes in white-matter architecture. *Nat Neurosci*. 12(11):1370-1. doi: 10.1038/nn.2412.

Shen P, Yue Y, Zheng J, Park Y. (2018). *Caenorhabditis elegans*: A Convenient In Vivo Model for Assessing the Impact of Food Bioactive Compounds on Obesity, Aging, and Alzheimer’s Disease. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2018 Mar 25;9:1-22. doi: 10.1146/annurev-food-030117-012709. Epub 2017 Dec 20. PMID: 29261338

Shigeno S., Andrews PL., Ponte G., Fiorito G. (2018). Cephalopod Brains: An Overview of Current Knowledge to Facilitate Comparison with Vertebrates. Published on 20 July 2018 *Front. Physiol* doi: 10.3389/fphys.2018.00952

Sinha A, & Rae R. (2016). Genome-Wide RNAi Screens in *C. elegans* to Identify Genes Influencing Lifespan and Innate Immunity. *Methods Mol Biol*. 2016;1470:171-82. doi: 10.1007/978-1-4939-6337-9_14.

Sierra A, de Castro F, del Río-Hortega J, Iglesias-Rozas JJ, Garrosa M, and Kettenmann H. (2016) The “Big-Bang” for Modern Glial Biology: Transla-

tion and Comments on Pío del Río-Hortega 1919. Series of Papers on Microglia (Special Article). *Glia*; 64:1801–1840.

Song J, Zhong C, Bonaguidi MA, Sun GJ, Hsu D, Gu Y, Meletis K, Huang ZJ, Ge S, Enikolopov G, Deisseroth K, Luscher B, Christian KM, Ming GL, 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 RD. (1998). Control of myelination by specific patterns of neural impulses. *J Neurosci*. 18(22):9303-11.

Stevens B, Porta S, Haak LL, Gallo V, Fields RD (2002) Adenosine: a neuronal transmitter promoting myelination in the CNS in response to action potentials. *Neuron*. 2002 Dec 5;36(5):855-68.

Suzuki MM., Nishikawa T., Bird A. (2005) Genomic approaches reveal unexpected genetic divergence within *Ciona intestinalis*. *J Mol Evol*. 2005 Nov;61(5):627-35. Epub 2005 Oct 4.

Tabara, H.; Grishok, A. Mello, CG. (1998) RNAi in *C. elegans*: Soaking in the Genome Sequence. *Science* 16 Oct 1998: Vol. 282, Issue 5388, pp. 430-431. DOI: 10.1126/science.282.5388.430.

Tallinen T, Chung JY, Rousseau F, Girard N, Lefèvre J and Mahadevan L (2016) On the growth and form of cortical convolutions. *Nature Physics*, 12, 588-593.

Tsien RY. (2005). Building and breeding molecules to spy on cells and tumors. *FEBS Lett.* 2005 Feb 7;579(4):927-32. Review. PMID: 15680976.

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 no. 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.

Watts JL. (2016). Using *Caenorhabditis elegans* to Uncover Conserved Functions of Omega-3 and Omega-6 Fatty Acids. *J Clin Med.* 2016 Feb 2;5(2). pii: E19. doi: 10.3390/jcm5020019. Review. PMID: 26848697.

Wei Y, Kenyon C. (2016). Roles for ROS and hydrogen sulfide in the longevity response to germline loss in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 May 17;113(20):E2832-41. doi:10.1073/pnas.1524727113. Epub 2016 May 2. PMID:27140632.

Zhang J, Campbell RE, Ting AY, Tsien RY. (2002). Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 Dec;3(12):906-18. Review. PMID:12461557.

Zhang F, Wang LP, Boyden ES, Deisseroth K. (2006) Channelrhodopsin-2 and optical control of excitable cells. *Nat Methods.* 2006 Oct; 3(10):785-92.

ÍNDICE

1. Introducción	34
2. Bacteriorodopsina, fotoreceptores, simios, la separación de los continentes y la vieira	35
2.1. Bacteriorodopsina, opsinas y fotoreceptores	36
2.2. Filogenia de los fotopigmentos: adaptación y evolución	36
2.3. Mamíferos, grandes simios, otros animales y la separación de los continentes	37
2.4. Ojos de vieira y telescopios reflectores	39
2.5. Optogenética, inicio de la técnica del futuro para controlar el sistema nervioso	40
3. Una mirada a los animales más primitivos: luces, sombras, fluorescencia, el cerebro arcoíris y CLARITY	42
3.1. Las esponjas sin sistema nervioso, pero propagando el impulso eléctrico	43
3.2. Las poderosas medusas, la tecnología de la fluorescencia y el cerebro arcoíris ..	43
3.3. CLARITY, la fluorescencia cuando el cerebro es transparente	45
4. ¿Para qué sirve el “cerebro”? Una respuesta inicial proporcionada por la camisa de mar, <i>Ciona intestinalis</i>	47
4.1. La camisa de mar, <i>Ciona intestinalis</i> , y su metamorfosis	47
4.2. El genoma de <i>C. intestinalis</i> , genes Hox	49
4.3. <i>Ciona</i> y los receptores de cannabinoides	50
4.4. <i>Ciona</i> y los canales de funcionamiento neural	51
5. El modelo animal de <i>Caenorhabditis elegans</i> , un gusano para estudiar casi todo	51
5.1. Ventajas del modelo de <i>C. elegans</i>	52
5.2. <i>C. elegans</i> el primer genoma de un organismo pluricelular secuenciado	52
5.3. ¿Qué datos nos aportó el conocimiento del genoma de <i>C. elegans</i> respecto a su neurobiología?	53
5.4. <i>C. elegans</i> , linaje celular y el primer animal fluorescente	54
5.5. <i>C. elegans</i> y su empleo como modelo en la patología humana.	55

6.- Modelando el sistema nervioso, los genes homeóticos	57
6.1. El Desarrollo del Sistema nervioso en vertebrados.	58
6.2. Vertebrados versus invertebrados: Humanos y pulpos, los campeones cerebrales: los genes engrailed	60
6.3. La evolución del cerebro humano.	63
6.3.1. La capacidad cerebral desde los monos al Homo Sapiens.	65
6.3.2. ¿Cómo se realiza físicamente la organización del cerebro? La glía radial: El andamiaje del cerebro en el origen de las células neurogliales y su migración	67
6.3.3. La originalidad y poder del cortex cerebral humano. El mensaje del virus del Zika	68
6.4. El gen del lenguaje: FOXP2	71
6.4.1. Mapeando el gen FOXP2, dañado en la familia KE y de otros individuos y especies	73
6.4.2. FOXP2 en Neandertales y otros parientes mamíferos	74
6.4.3. El gen FOXP2, aves cantoras, y las primeras evidencias de neuro- génesis en el cerebro adulto	75
7. La singularidad y el poder de la Glia Humana	77
7.1. Las células gliales: diversidad y funciones	78
7.2. Los astrocitos generalidades	79
7.3. Astrocitos humanos versus astrocitos de roedores	79
7.4. Astrocitos: La sinapsis tripartita	82
7.5. Los trasplantes de glía humana: ¿Una anécdota o una posibilidad?	85
7. 6. Los oligodendrocitos: mielinización del sistema nervioso central y aprendizaje	86
7.6.1. Oligodendrocitos, cuerpo calloso y el cerebro de Einstein	89
7.7. Los trasplantes de oligodendrocitos, desórdenes neurológicos asociados y una CRISP para el futuro	90
8.- Reflexiones finales	91
9.- Bibliografía	93