

se pueden diferenciar técnicas en función de los cebadores empleados, como cebadores cortos de secuencia arbitraria (RAPDs), o cebadores más largos en combinación con temperaturas de

alineamiento más bajas (AP-PCR); o bien basados en la presencia natural de elementos repetitivos de DNA esparcidos por el genoma de gran parte de las bacterias, utilizándolas como molde para la amplificación del DNA genómico (rep-PCR), el uso de

tres familias de secuencias repetitivas cuya función exacta es desconocida: secuencias palindrómicas extragénicas repetitivas (REP), secuencias consenso repetitivas intergénicas de enterobacterias (ERIC) y el elemento BOX.

Todas estas técnicas, basadas en el uso de la técnica PCR, permiten la amplificación selectiva

de las distintas regiones genómicas localizadas entre ellas y que al resolverse electroforéticamente generan la huella dactilar del microorganismo, pudiendo detectarse diferencias genéticas incluso

entre cepas de la misma especie bacteriana (Figura 1). De esta manera se ha conseguido visualizar la huella dactilar de un microorganismo, de la misma manera que se usa un código de barras en los comercios.

A partir de este momento,

para localizar la presencia de una determinada especie o cepa, o bien para agrupar distintos microorganismos relacionados, sólo habrá que visualizar la huella dactilar de cada microorganismo. Ya ninguno tendrá escapatoria ... y todos serán reconocidos por los investigadores.

Familia	Genero	Especie	Subespecie	Cepa
Secuenciación del DNA				
Secuenciación del rDNA 16S				
ARDRA. tRNA-PCR				
RFLP. PFGE				
RAPDs. AP-PCR. rep-PCR				

Fig.1 Esquema comparativo del nivel de resolución filogenética de diversas técnicas moleculares.

## PROGENITORES CLONALES MULTIPOTENTES PARA LA REPARACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO

Ramón Muñoz-Chápuli

Probablemente uno de los temas científicos del año que acaba de empezar sea el de las investigaciones sobre la utilización de células madre con fines terapéuticos, un tema que no está libre de una fuerte polémica. Opiniones a favor y en contra se suceden en los medios de comunicación, pero lo que parece fuera de toda duda es la importancia de que sepamos explotar adecuadamente las propiedades de las células pluripotentes para solucionar graves problemas de salud. Por citar sólo un caso, el envejecimiento de la población en los países occidentales va a aumentar en los próximos años la incidencia de enfermedades neurodegenerativas, algunas de las cuales no tienen hoy por hoy tratamiento curativo.

En el debate sobre las células madre se olvida en ocasiones que existen alternativas a las células embrionarias que no deberían generar

inconvenientes desde el punto de vista ético. Una serie de descubrimientos recientes ilustran bien este punto, y vamos a referirnos a ellos en este artículo. Se trata de resultados espectaculares, aunque su auténtico alcance sólo podrá verificarse en los próximos años.

La historia comienza hace diez años. El grupo de Evan Snyder, en la Escuela Médica de Harvard, desarrolló una línea celular, denominada C17.2, inmortalizando células de la capa granular externa del cerebelo de ratones recién nacidos mediante transducción, mediada por retrovirus, del oncogén *v-Myc* [Snyder EY et al., *Cell* **68**:33-51 (1992)]. Este gen es el equivalente en aves del proto-oncogén *c-Myc*, que en mamíferos está implicado en el control de la proliferación y diferenciación celular. Las células C17.2 no son auténticas células-madre, aunque comparten con ellas la capacidad de generar

poblaciones celulares dotadas de una extraordinaria plasticidad. Por ello se habla de “progenitores clonales multipotentes”.

Las células C17.2 han mostrado propiedades sorprendentes en diferentes modelos desarrollados en ratón, tanto de enfermedades como de traumatismos del sistema nervioso central. Son capaces de migrar hacia la zona afectada, diferenciarse en neuronas o glía, liberar factores neurohumorales, conectar con otras células nerviosas y recibir conexiones. Vamos a describir algunos ejemplos antes de describir los dos descubrimientos más recientes y que han levantado las mayores expectativas.

Un comportamiento inesperado de las células C17.2 es el de la “persecución” de los tumores. Cuando estas células fueron implantadas en el cerebro de ratones en los que se había desarrollado experimentalmente un glioma, las C17.2 migraron hasta rodear completamente los límites del tumor, acompañando a las células tumorales infiltrantes. Incluso cuando fueron inyectadas a distancia del glioma o en el torrente circulatorio, las células C17.2 se acabaron localizando preferentemente en la periferia del tumor [Aboody KS et al., *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:12846-12851 (2000)]. La idea que surge a partir de este trabajo es la de modificar genéticamente las células «acosadoras» de las células tumorales con objeto de que produzcan y suministren algún tipo de molécula terapéuticamente relevante que contribuya a detener el crecimiento de tumores especialmente agresivos y refractarios a otros tratamientos.

Otra situación en la que se han ensayado células neurales multipotentes ha sido en modelos de regeneración de médula espinal después de una sección traumática de la mitad de la misma, un procedimiento que resulta en parálisis de uno de los miembros posteriores. En este caso las células se aplicaron a la sección medular en el interior de una matriz sintética constituida por un biopolímero biodegradable (ácido poliglicólico). En los animales tratados, pero no en los controles, se observó una importante recuperación funcional en el miembro posterior afectado [Teng YD et al., *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:3024-3029 (2002)]. Aunque parte de la recuperación puede deberse a que el polímero redujo la inflamación y la cicatrización glial, diversas evidencias sugieren que la mejora se debió, en parte, a la regeneración parcial de fibras nerviosas que atravesaban la zona lesionada. En otro experimento, células C17.2 fueron inyectadas en el cerebro de ratones que habían sufrido, tres días antes, un daño cerebral traumático producido por un impacto. Los ratones fueron evaluados desde el punto de vista motor y cognitivo (aprendizaje) durante un periodo de 12 semanas. Aunque las

funciones cognitivas no mejoraron en los ratones inyectados con células C17.2, sí se observó en éstos una significativa recuperación motora respecto a los controles (Ries P et al., *Neurosurgery* **51**:1043-1052 (2002)).

Pero la más reciente contribución de las células C17.2 acaba de aparecer en dos artículos publicados en la revista *Nature Biotechnology*. En el primero de ellos se describe cómo estas células contribuyen a restablecer las funciones de las neuronas dopaminérgicas en un modelo animal de enfermedad de Parkinson [Ourednik et al., *Nature Biotech.* **20**:1103-1110 (2002)]. En este modelo los ratones son tratados con MPTP, una neurotoxina que inhibe la enzima tirosín-hidroxilasa, clave en la síntesis de dopamina. Ya se había intentado con anterioridad rescatar la función de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra mediante la implantación de células C17.2 modificadas genéticamente para producir GDNF, el factor de crecimiento derivado de células gliales [Akerud P et al., *JNeurosci.* **21**:8108-8118 (2001)]. La novedad del trabajo de Ourednik y colaboradores es que las células C17.2 no fueron en esta ocasión manipuladas genéticamente e incluso así se recuperó la capacidad de producir dopamina en la sustancia negra. La sorpresa consistió en que sólo algunas de las neuronas dopaminérgicas se diferenciaron a partir de las células multipotentes inyectadas; la mayoría fueron neuronas «rescatadas» que volvían a ser funcionales. Esto implica que las células C17.2 no sólo constituyen vectores para terapia génica y son capaces de reemplazar funcionalmente a otras neuronas, sino que además pueden desempeñar un papel trófico o neuroprotector que permite el restablecimiento de funciones en neuronas dañadas.

El segundo artículo del grupo de Snyder incide en la recuperación de lesiones cerebrales, producidas en este caso en un modelo de isquemia cerebral (ligación de la arteria carótida derecha seguida de atmósfera hipóxica) un tratamiento que causa una lesión cortical masiva. En la cavidad resultante del infarto cerebral se inyectaron células C17.2 embebidas en la matriz de ácido poliglicólico antes mencionada. En este ambiente las células se diferenciaron en neuronas y glía, promovieron el crecimiento de axones de las neuronas locales, establecieron y recibieron conexiones de éstas y adquirieron un cierto grado de citoarquitectura [Park et al., *Nature Biotech.* **20**:1113-1117 (2002)]. Al mismo tiempo el polímero promovió la revascularización de la zona infartada. Estos efectos no se produjeron cuando se inyectaron las células o el biopolímero de forma aislada.

Los resultados, como hemos dicho, son espectaculares pero es preciso ser muy prudentes

al respecto. Las células C17.2 son células de ratón y nos ilustran sobre las posibilidades de células no embrionarias manipuladas genéticamente para la adquisición de pluripotencialidad, pero obviamente no pueden ser aplicadas en humanos. Por otro lado, aunque las células C17.2 parecen diferenciarse rápidamente cuando son inyectadas en los tejidos,

no puede descartarse que puedan dar lugar a tumores, como hacen otras células transformadas que expresan oncogenes. En cualquier caso, las posibilidades abiertas por estos resultados para el tratamiento de patologías graves del sistema nervioso constituirán probablemente un tema del mayor interés en los próximos años.

---

## NEUROANATOMÍA DEL MIEDO CONDICIONADO

---

Daniel Pineda Tenor

---

Todo está tranquilo ahora. La luz es tenue, hay un sutil aroma a pienso en el ambiente y el silencio reinante es sumamente relajante. Incluso el frío metal del suelo de mi jaula me resulta agradable. Mi nombre es Rt-915, y soy un ratón de laboratorio. Sí, sí, no se sorprendan tanto; los ratones solo guardan silencio cuando no tienen nada interesante que decir. Pero este no es mi caso, ya que hay algo que deseo compartir con todos vosotros: la esencia del **miedo**.

Mi historia se remonta varias semanas atrás, cuando fui trasladado desde mi cómoda jaula del estabulario principal a este lugar extraño al que llaman laboratorio. Desde entonces, de vez en cuando, la calma se ve rota por culpa de un agudo sonido, que precede a una fuerte descarga eléctrica. He de suponer que alguna entidad superior desconocida está experimentando conmigo, pues hace ya unos días en los que tan solo puedo percibir el sonido. Sin embargo, la simple presencia de este pitido me produce un terrible pavor. He intentado mentalizarme para eliminar este terror sin sentido, pero no lo he logrado. Sé que no me comprendéis, y que os parece algo ridículo, pero os aseguro que para mí es muy serio. Por ello voy a tratar de explicároslo.

El miedo es una reacción natural ante un estímulo adverso, muy útil por cierto desde un punto de vista evolutivo, pues permite a los organismos reaccionar de forma adecuada ante el peligro. Es interesante que seamos capaces de distinguir la existencia de dos tipos fundamentales de miedo. Por una parte tenemos un miedo al que podemos considerar innato, y que se corresponde con el instinto de conservación que manifiestan todos los animales desde el momento de su nacimiento. Este tipo de miedo instintivo se activa por ejemplo ante la visión de potenciales depredadores, o mediante la escucha de sonidos fuertes. El otro tipo de miedo se conoce con el nombre de miedo condicionado o aprendido, y resulta ser, con diferencia, el que tiene una mayor presencia en los individuos. Mi caso es un claro ejemplo de este miedo condicionado, en el que el

estímulo causante del miedo (consistente en una descarga eléctrica) recibe el nombre de “estímulo no condicionado”, mientras que el tono que lo acompaña, que inicialmente resultaba ser un estímulo neutro, se denomina ahora “estímulo condicionado”. La aplicación repetitiva de ambos estímulos tiene como consecuencia el establecimiento de una asociación, de tal manera que ante la sola presencia del estímulo condicionado tengan lugar las reacciones propias del miedo, que reciben en su conjunto el nombre de respuestas condicionadas, y entre las que se incluyen aumentos en el ritmo cardiaco, incrementos en la presión arterial, inmovilidad somatomotora (freezing) y dilatación pupilar.

Son múltiples las estructuras cerebrales implicadas en ambos tipos de miedo, teniendo una gran importancia regiones tanto corticales como subcorticales. La participación de las regiones corticales en el establecimiento del miedo innato es mínima, y tampoco resultan necesarias para el establecimiento del miedo condicionado, lo que nos indica que el fenómeno del miedo tiene principalmente una base inconsciente. Sin embargo, el papel regulador que muestran las regiones corticales en el proceso es de gran importancia, ya que actúan modulando las reacciones subcorticales, verdaderas promotoras de la sensación, pudiendo incrementar su intensidad o inhibir parcialmente su actividad. Además de las cortezas sensoriales responsables de la valoración del estímulo y la posterior modulación de la respuesta (corteza visual, olfatoria, auditiva, etc.) hemos de tener en consideración al hipocampo. Esta estructura se halla ubicada en el borde medial de la corteza cerebral, que al girar sobre sí misma en el lóbulo temporal medial adquiere una forma característica que recuerda a un caballito de mar (de ahí su nombre). El papel del hipocampo es fundamental, ya que resulta imprescindible en el establecimiento de la memoria. De esta forma, los individuos pueden retener situaciones, entornos o cualquier tipo de contexto en el que el peligro se halle presente en