

4. Células madre neurales, neurogénesis y neuroprotección

FLORA DE PABLO DÁVILA

RESUMEN

La medicina regenerativa aspira a utilizar terapias innovadoras, basadas en células, endógenas o implantadas, o bien en factores de protección y estímulo celular administrados por procedimientos avanzados, incluyendo vectores génicos. En el Sistema Nervioso (SN), la investigación actual sobre la presencia e identidad de células madre y de precursores neurales incluye: su localización en el cerebro embrionario y adulto, las formas de aislamiento y caracterización, el estudio de los factores de crecimiento que están implicados en su expansión, mantenimiento y diferenciación controlada en cultivo y, el fin último, su activación en el cerebro lesionado. Aquí se resumen los recientes avances en este área, especialmente los que permiten definir con precisión la caracterización de las células madre del cerebro adulto de ratón, y el estado actual de posibles abordajes de terapia celular en casos de enfermedad degenerativa del SN en humanos. Junto a ello, comentaremos la contribución de nuestro laboratorio a la caracterización de la neurogénesis en el bulbo olfatorio y algunos progresos en la neuroprotección de la neurorretina.

ABSTRACT

Regenerative medicine's goal is to use innovative therapies, based either on endogenous or implanted cells or on factors that stimulate or protect cells and which are administered by advanced procedures, inclu-

ding genetic vectors. In the Nervous System, the recent research on the presence and identity of Neural Stem and precursor cells, includes their localization in the embryonic and adult brain, the isolation and characterization procedures, the study of growth factors implicated in the maintenance, expansion, controlled differentiation in culture and, the ultimate goal, their activation in the diseased brain. Here we will present the recent advances in this field, especially those verifying precisely the presence of neural stem cells in the adult mouse brain and possible approaches that could use cell therapy in the case of neurodegenerative diseases in humans. Additionally, we will summarize the contribution of our laboratory to the characterization of neurogenesis in the olfactory bulb and some progress in neuroprotection of the neuroretina.

INTRODUCCIÓN

La esperanza de vida de la especie humana se ha duplicado en el último siglo en el mundo occidental y, según Naciones Unidas, en el año 2035 la población mundial mayor de 65 años habrá aumentado en un 135%. Como consecuencia del envejecimiento de la población, las enfermedades degenerativas han sufrido un incremento notable, y continuarán en aumento. Las terapias convencionales farmacológicas no logran detener o recuperar muchas de las disfunciones de órganos, debidas a la muerte celular por daño crónico o degeneración, especialmente en tejidos con limitada capacidad autorreparadora como el corazón, el riñón, el páncreas o el cerebro. Sin embargo, mientras que en los tres primeros se puede recurrir al trasplante del órgano, cuando el fallo funcional amenaza la vida, hoy no podemos siquiera imaginar (fuera de la ciencia-ficción) un trasplante completo de cerebro.

Esta situación hace que las investigaciones en posibles recursos terapéuticos basados en células directamente reparadoras del sistema nervioso, o indirectamente estimulantes de su regeneración, hayan experimentado un impulso espectacular en los últimos años.

El concepto de renovación tisular en la etapa adulta de un organismo ha comenzado a ser comprendido recientemente en toda su amplitud, y tejidos que se creía eran fijos «de por vida» tras completar el desarrollo embrionario, han resultado ser mucho más dinámicos. Así, el grupo de

Frisén (1, 2) ha hecho un interesante análisis sobre la edad de las células en el organismo humano (aprovechando la contaminación radiactiva del ambiente y tratamientos con BrdU). Llama la atención que el intestino recambie sus células completamente cada 10.7 años, y el músculo cada 15.1 años. Dada la sensibilidad limitada de este original estudio, no se encontró un recambio significativo de neuronas (en el cortex occipital y el neocortex analizados), lo que sustentaría el «dogma biológico» mantenido durante la mayor parte del siglo pasado, de que en el Sistema Nervioso Central (SNC) la producción de nuevas neuronas en mamíferos se restringía a la vida embrionaria y neonatal. Estos estudios no analizaron otras zonas del cerebro, y aquí revisaremos los descubrimientos recientes sobre la biología de las células madre y los precursores/progenitores neurales, que han confirmado la capacidad de generación de nuevas neuronas en mamíferos adultos, incluida la especie humana (en localizaciones precisas como la zona subventricular o el hipocampo). Vamos a centrarnos en el SNC, especialmente en el cerebro, e incluiremos la neurorretina. Repasaremos primero algunos datos históricos relevantes y clarificaremos la terminología a utilizar.

Santiago Ramón y Cajal obtuvo el premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1906 por su extraordinaria y documentada *teoría neuronal* de la organización anatómica del Sistema Nervioso. Inició la era moderna de las neurociencias, definió claramente el concepto de *neurotrofismo* e incluso sospechó la existencia de células *germinales* neurales más allá del periodo fetal (3,4). Sus descripciones meticulosas e interpretaciones precisas del desarrollo embrionario del Sistema Nervioso tienen hoy total vigencia (Figura 1). No es cierto, sin embargo, que no se generen nuevas neuronas tras completar el desarrollo en vertebrados, como sostuvo Cajal.

Llevó más de 50 años abrir el camino que nos va a permitir abordar la neurorreparación eficaz del SN dañado por patologías neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson, o una lesión de la médula espinal. En 1965, Altman y Das (5) presentaron evidencia científica de neurogénesis en el cerebro adulto, en el hipocampo de la rata. En 1983, Nottebohm (6) mostró los cambios anatómicos cíclicos de los núcleos de control del canto en canarios. En 1992 se cultivaron por primera vez progenitores/precursores neurales como neuroesferas (7). En 2001 se adjudicó una patente a *NeuralStem*® (Gaithersburg, Maryland, EEUU)

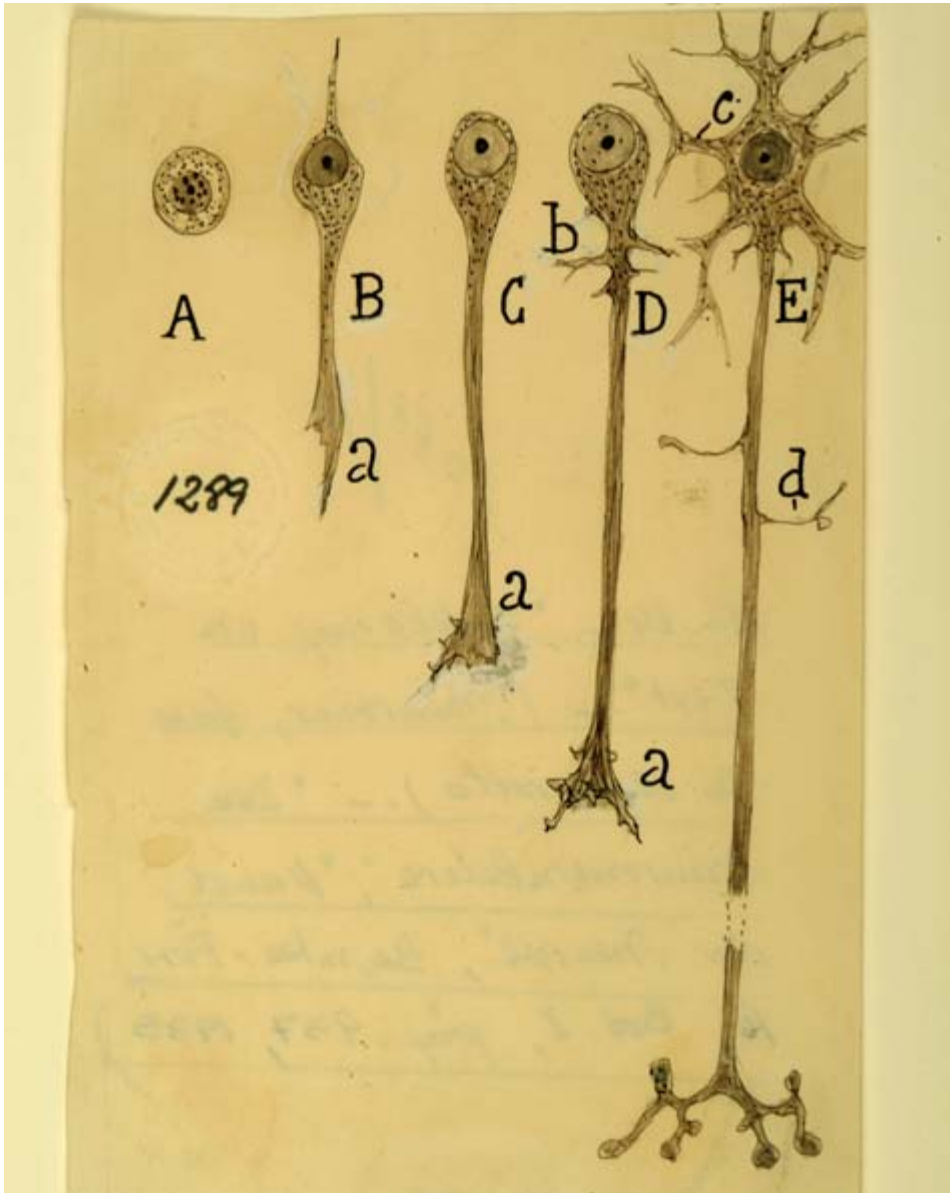


Figura 1. **Evolución de la fibra nerviosa.** A) Célula germinal. B) Fase bipolar con iniciación de la maza —cono— de crecimiento (a). C) Fase de neuroblasto. D) Aparición de las dendritas (b). E) Modelamiento de éstas y formación de las ramas nerviosas colaterales y terminales. (Tomado de S. Ramón y Cajal, ref. 3).

para un método de «aislar, propagar y diferenciar eficientemente en cultivo, células madre neurales (NSC) de mamíferos, incluidos humanos, para generar grandes cantidades de neuronas». Afirmaban ser capaces de producir «distintos tipos neuronales con el objeto de ser usados en terapia celular, terapia génica, cribado de factores de crecimiento y cribado de fármacos para enfermedades del Sistema Nervioso». En el año 2008 se ha comprobado que es más fácil producir células pluripotentes inducidas (iPS, ver capítulo 3) si en vez de partir de células somáticas, se parte de NSC (8).

Dado que hay cierta ambigüedad en el uso de algunos términos en la literatura, aquí los usaremos con estas definiciones (9):

- *Células madre neurales* (NSC): células con capacidad de auto-renovarse indefinidamente (aunque en sentido absoluto no pueda ser probado) y multipotentes, con el potencial de diferenciarse a fenotipos celulares maduros, neuronas y dos tipos de células gliales, astrocitos y oligodendrocitos.
- *Precursoros neurales*: Usaremos este término de manera equivalente con el de *Progenitores*; son células neurales con capacidad más limitada de autorrenovación y expansión, y con potencialidad para diferenciarse a pocos tipos neuronales, a veces unipotentes. Serían *Progenitores* neuronales y progenitores gliales las células comprometidas a diferenciarse sólo a neuronas o a glía, respectivamente. Los progenitores neuronales determinados a un tipo de neurona concreto, serían la herramienta de sustitución ideal para tratar el SNC lesionado.
- *Neuroesferas*: grupo o colonia de células formado en cultivo en suspensión, altamente proliferativas en presencia de factores mitogénicos (principalmente EGF y FGF), que contienen proporciones variables de NSC y precursoros bi o unipotentes.
- *Neurogénesis*: proceso de diferenciación celular que, a partir de células neuroepiteliales, genera neuronas muy activamente durante el desarrollo embrionario, y de forma restringida durante la vida adulta. En cultivo, la neurogénesis y la gliogénesis (generación de células gliales) se pueden estudiar a partir de neuroesferas o de «rodajas» de tejido nervioso fetal cultivables a largo y corto plazo, respectivamente.

El estado que permite a las NSC en los tejidos adultos mantener el potencial de autorrenovarse constantemente, aunque no sean células proliferativas *in vivo*, es en cierto modo un estado de «resistencia» a progresar a células diferenciadas (Figura 2). Además de por sus carac-

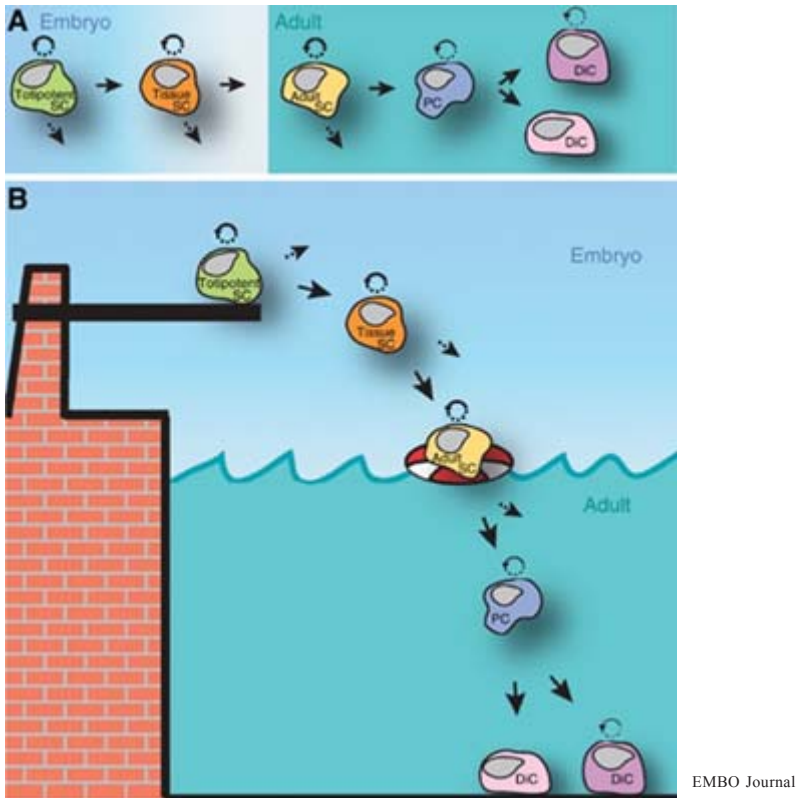


FIGURA 2. **Las células madre a lo largo del proceso de la diferenciación.** A) En el embrión, el desarrollo de un linaje celular puede ser dibujado como una progresión lineal con aumento gradual de la especialización y pérdida de ciertas opciones. Células de distintos estadios (SC, células madre; PC, progenitores; DiC, células diferenciadas), pueden tener cierta capacidad de autorrenovación (indicado por flechas circulares) y el potencial de producir muchos tipos de progenie (puntos de ramificación en el linaje). B) Una visión distinta enfocada en la retención estable de las células madre en un punto a lo largo del proceso de diferenciación. La célula madre se mantiene en un punto del linaje debido al influjo del nicho en el que se encuentra dentro del tejido, mostrado aquí como un salvavidas que le permite flotar en la superficie. Es decir, la célula madre de los tejidos adultos es especial por tener una situación estable como en un estadio temprano del desarrollo. Muchas células en los tejidos pueden tener cierta capacidad de autorrenovación y ser multipotentes pero, si no están retenidas, inevitablemente se hunden a su destino final (10).

terísticas intrínsecas, serían las características del nicho en el que residen, las que hacen a las células madre mantener accesibilidad transcripcional a una batería de genes; ello permite a las NSC retener su potencialidad de generar progenie con características diferenciadas (10). En el proceso de diferenciación progresiva hay una reprogramación de múltiples genes que se reprimen, en tanto que muchos otros se activan.

En lugar de usar una definición funcional de célula madre, hay autores que han tratado de definir este programa molecular de la «stemness». Por ejemplo, la vía de las proteínas hedgehog (Hh), además de desempeñar un importante papel en el desarrollo embrionario, lo desempeña también en el mantenimiento de las células madre del adulto (11, 12). Las diversas funciones de esta vía han sido recientemente revisadas de manera detallada en la monografía XXIV de la Real Academia Nacional de Farmacia (13). Aunque los genes *Oct 4* y *Nanog* han sido identificados como genes específicos de las células madre embrionarias en varias especies (ver capítulo 1), el análisis del transcriptoma en estudios de micromatrices no ha logrado definir un programa genético común que controle las propiedades de los diferentes tipos de células madre de tejidos adultos. Las señales extracelulares y rutas de señalización intracelular, que parecen tener funciones importantes en múltiples linajes, son miembros

TABLA 1. *Resumen de las características funcionales que pueden distinguir las Células Madre de los Progenitores neurales*
(Adaptada de Ref. 9)

<i>Característica</i>	<i>Células Madre</i>	<i>Precursor/Progenitor</i>
Autorrenovación <i>in vivo</i>	Ilimitada; durante toda la vida del organismo	Limitada; transitoria
Autorrenovación <i>in vitro</i>	Ilimitada; máximo número de duplicaciones	No llega al número máximo de duplicaciones celulares antes de transformarse
Potencialidad	Multipotentes para generar neuronas, astrocitos y oligodendrocitos	Generalmente bi o unipotentes
Mantenimiento de la Autorrenovación y la Multipotencialidad	Sí	No

de las familias WNT, hedgehog, BMP y Notch (14). Tienen importancia así mismo el FGF2-, EGF y otros factores de crecimiento. Puede verse un completo poster sobre mecanismos moleculares e identidad de las células madre en los distintos tejidos en www.abcam.com/stemcells (15). Entre las NSC y los precursores neurales hay solapamiento de expresión de genes, como ocurre con la nestina, pero pueden ser distinguidos por la diferente señalización en la ruta de Notch y, como se ha mencionado, por algunas características funcionales (Tabla 1).

¿CÓMO Y DÓNDE SE ENCUENTRAN LAS CÉLULAS MADRE Y LOS PROGENITORES NEURALES EN EL CEREBRO?

Los estudios en modelos animales que han permitido el mayor avance en el conocimiento de las NSC han utilizado generalmente el ratón y menos la rata. Para analizar las características funcionales de las células candidatas a NSC, se disecciona la región del SNC de interés, se disocian las células individuales y se exponen a la acción de factores mitogénicos. Así se determina si las células de esa zona son capaces de proliferar en suspensión como neuroesferas. Los cultivos resultantes pueden ser manipulados para determinar la autorrenovación y multipotencialidad. La disociación de las neuroesferas en células individuales y la nueva generación de neuroesferas secundarias o de fenotipos celulares diferenciados, tras la retirada de mitógenos, es el procedimiento habitual. La prueba de «clonalidad», que demuestra que de una sola célula procedente de una neuroesfera derivan los tres grandes tipos neurales, neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, es esencial para demostrar que la célula original era una NSC.

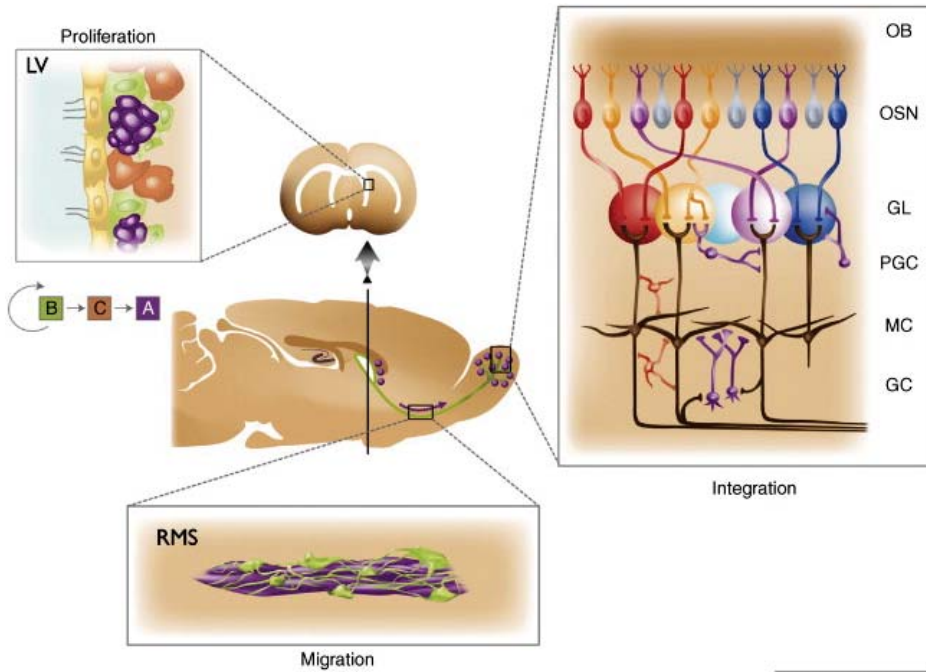
Para recapitular y modular los eventos celulares que pueden tener lugar en condiciones de reparación o regeneración, es esencial conocer bien los procesos fisiológicos del desarrollo embrionario. Durante el desarrollo temprano, son NSC las células neuroepiteliales, con características de glía radial, que tapizan la luz del tubo neural. En las etapas embrionarias y fetales avanzadas, en distintas zonas del SNC hay proporciones variables de NSC y precursores neurales, que progresivamente van restringiendo su capacidad de diferenciarse (16). La neurogénesis adulta recapitula en parte el proceso de desarrollo neuronal, pero en el entorno o nicho del SNC maduro. Las dos zonas del cerebro adulto

mejor conocidas en el modelo de ratón, donde está ampliamente confirmada la producción de nuevas neuronas en la vida adulta, son: la zona subventricular de las paredes del tercer ventrículo (SVZ, *subventricular zone*) y la capa subgranular del giro dentado del hipocampo (17-19).

Tras una larga controversia, se ha confirmado en el ratón que las células que funcionan como NSC, y generan nuevas neuronas que migran al Bulbo Olfatorio (BO) para reemplazar a las interneuronas de manera constante, corresponden a las denominadas tipo B por el grupo de Alvarez-Buylla. Esta es una subpoblación de células que se dividen lentamente y tienen la morfología, ultraestructura y marcadores de astrocitos (20). Las células B, producen las de tipo C, que ya se dividen rápidamente para producir, a su vez, las de tipo A o neuroblastos (y en respuesta a una lesión producir también oligodendrocitos). Estos neuroblastos migran tangencialmente en cadenas que convergen formando la corriente migratoria rostral (RMS, *rostral migratory stream*), que llega al BO (Figura 3). Dentro del BO, los neuroblastos o neuronas jóvenes maduran en varios subtipos de interneuronas (21). La diversidad de estas interneuronas contribuye a la plasticidad de los especializados circuitos olfativos postnatales (19).

El nicho neurogénico de la SVZ es complejo. Recientemente se ha observado su estructura con gran detalle, y se ha visto que las NSC de tipo B forman una arquitectura «en rueda», donde su proceso apical central toca el ventrículo, y está rodeado de células endodiales (22). Por su parte, las células endodiales que tapizan los ventrículos laterales son quiescentes, y finalmente parece probado que no contribuyen a la neurogénesis en el ratón adulto en condiciones normales. Dan lugar, sin embargo, a neuroblastos que llegan al BO tras producirse un daño isquémico, lo que les convierte en un reservorio con potencial reparador (23). También pueden ser activadas las células endodiales cuando la señalización de Notch se interrumpe. Este hallazgo es importante porque indica que hay células sin las características de NSC que pueden ser reclutadas para fases reparadoras iniciales tras una lesión, y que hay posibilidades de cambiar el potencial de los distintos precursores y células neurales mediante manipulaciones moleculares (23-26).

La demostración de la existencia de neurogénesis en el cerebro humano a partir de una subpoblación de astrocitos, células B, se ha visto



TRENDS in Neurosciences

FIGURA 3. Zona Subventricular (SVZ) y ruta al bulbo olfatorio (OB). Representa una de las pocas áreas neurogénicas constitutivas en el cerebro adulto, que en sección sagital de ratón, se muestra en el centro. La flecha indica la migración tangencial de los neuroblastos (puntos morados) hacia el OB. Las nuevas neuronas reclutadas reemplazan continuamente a las interneuronas locales. El panel a la derecha muestra las conexiones nerviosas dentro del OB. La actividad de las neuronas de proyección en el OB tiene lugar a través de dos poblaciones de interneuronas: las periglomerulares (PGC) y las granulares (GC) (ambas en morado) y células de axon corto (en rojo). El panel de la izquierda muestra el nicho neurogénico. Aquí, la proliferación tiene lugar en las paredes del ventrículo lateral (LV), en donde las células madre (en verde, células tipo B) se dividen para generar las células que se amplifican transitoriamente (en marrón, tipo C), que a su vez dan los neuroblastos (en morado, células tipo A) que son los que migran en la corriente migratoria rostral (RMS en el panel inferior) hasta su destino final en el OB, donde se diferencian en interneuronas (19).

complicada porque la estructura y organización de los ventrículos laterales humanos difieren de las de los roedores. Desde la Universidad de Valencia, García Verdugo ha contribuido notablemente a la identificación de esta subpoblación como NSC en humanos, utilizando la microscopía electrónica (<http://www.uv.es/garciajm/>). Es posible, sin embargo, que la corriente migratoria rostral hacia el BO no tenga los límites definidos hallados en ratón (27).

Respecto al hipocampo, hay asimismo estudios de trazado genético, ablación farmacológica, análisis inmunohistoquímico acoplado a microscopía confocal y de ultraestructura que sugieren que el tipo especial de astrocitos GFAP+, SOX2+, con ciertas características de glía radial, es la NSC adulta de la zona subgranular del giro dentado del hipocampo (18, 28, 29). Las nuevas neuronas migran localmente a la capa granular interna, posiblemente por migración radial. Entender cómo las neuronas de reciente generación sobreviven, migran, generan dendritas y forman sinapsis en los circuitos existentes ha requerido complejos estudios utilizando retrovirus para datar la fecha de nacimiento de las neuronas y probar la implicación de distintos genes (NR1, DISC) en el proceso (30-32). Quedan muchos aspectos aún sin conocer en cuanto a la sinaptogénesis de las nuevas neuronas generadas en el adulto, y en cuanto a su capacidad de movilización hacia áreas distantes del origen. La neurogénesis en la SVZ (33) y el hipocampo humano está siendo actualmente abordada también por otras técnicas, incluyendo estudios de neuroimagen *in vivo* (34).

PAPEL DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO EN LA PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE LAS NSC

La señalización por factores de crecimiento es el principal mecanismo para regular la proliferación durante la neurogénesis, tanto *in vivo* como en los modelos de NSC estudiados en cultivo. Se ha demostrado el efecto de los FGF, EGF, neuregulinas, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento derivado del epitelio pigmentario (PEDF) y algunos neurotransmisores como GABA (35, 36). Los nucleótidos purinas actúan como señales proliferativas para progenitores neurales y, por tanto, regulan negativamente la diferenciación neuronal terminal en la SVZ de rata (37). La familia de citoquinas neuropoyéticas, particularmente LIF y CNTF, promueven el mantenimiento de las NSC en el adulto (38), y pueden ser parte de las señales puestas en marcha en respuesta a lesiones neurales. El ratón deficiente de reelina, proteína de la matriz extracelular que se une a receptores VLDR y ApoER expresados por neuronas, tiene disminuidas las poblaciones de NSC del hipocampo y el BO, pero la población de la SVZ es normal. Esto sugiere que la falta de reelina endógena altera la migración

de las NSC que han proliferado en la SVZ. De hecho, las NSC humanas inyectadas en el ventrículo lateral, migran y se diferencian en un ratón silvestre pero no lo hacen en el deficiente en reelina (39). Muchos otros factores, neurotrofinas, neuropéptidos y neurotransmisores ayudan a las células madre a decidir su destino y a alcanzarlo, y este conocimiento es esencial para poder plantearse futuros usos terapéuticos (40).

En nuestro laboratorio, hemos estudiado el papel de los factores de crecimiento *insulina-like*, especialmente el IGF-I, en una población de células que residen en el BO antes de la llegada de la corriente migratoria rostral. Reunen las características de NSC y se encuentran en el embrión

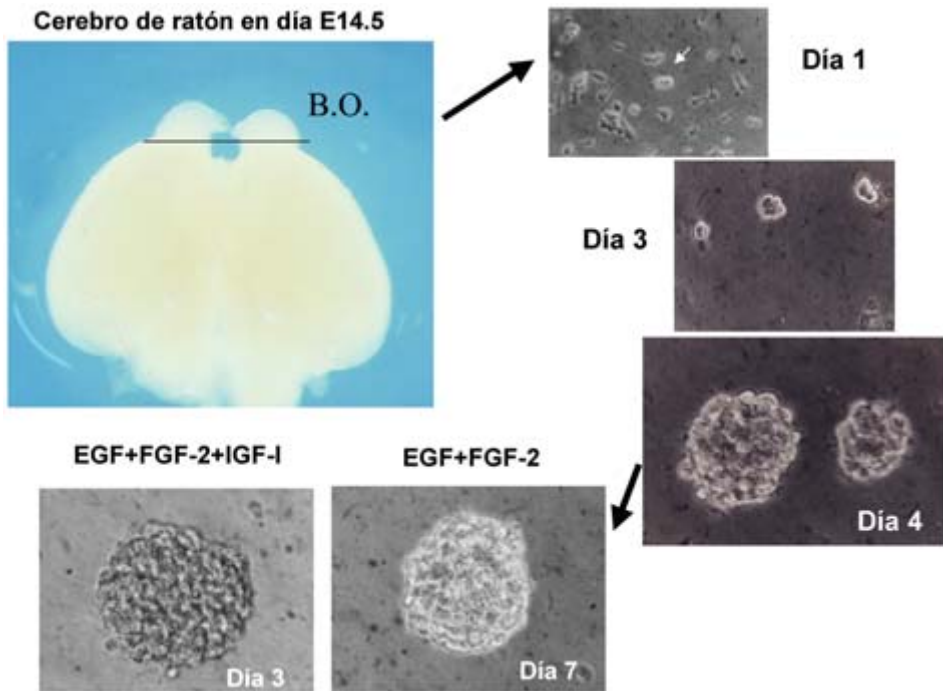


FIGURA 4. Generación de neuroesferas a partir de NSC del Bulbo Olfatorio de ratón embrionario. Los bulbos olfatorios (B.O.) de embriones de ratón a los 14,5 días de desarrollo fueron disecados del cerebro (plano de sección indicado por la línea horizontal) y las células fueron disociadas y cultivadas. El primer día del cultivo en presencia de EGF y FGF2 ya se observaron células dividiéndose (flecha blanca). En el día 3 se observaron agregados celulares que formaban pequeñas neuroesferas; estas crecían de tamaño rápidamente, especialmente si a los factores mitogénicos anteriores se le añadía IGF-I (41). NSC, Células madre neurales.

de ratón de 12.5-14.5 días (Figura 4). Las células aisladas, eran más del 99% positivas para el marcador nestina y proliferaron en cultivo formando neuroesferas al menos durante 150 duplicaciones celulares. Hemos demostrado que el IGF-I colabora con el FGF2 y el EGF para promover la proliferación de las NSC y precursores, así como la formación de neuroesferas. En ausencia de IGF-I endógeno, el BO de ratón muestra un desarrollo anormal de la capa de neuronas mitrales y de la glía radial. En los cultivos preparados a partir de ratones IGF-I^{-/-}, el porcentaje de neuronas, astrocitos y oligodendrocitos generados a partir de NSC fue marcadamente más bajo que en ratones normales (41). Estos resultados mostraron que el IGF-I es un factor de crecimiento endógeno que regula la diferenciación de las NSC y otros precursores en el BO en desarrollo. Uno de los genes implicados en el mantenimiento del estado indiferenciado y el control de la autorrenovación en NSC/precursores de BO es la ligasa Ring1B, de la familia de genes *Polycomb* (42).

En el ratón postnatal, el IGF-I regula también la migración de células que salen de la corriente migratoria rostral y la salida de neuroblastos desde la SVZ, y su posicionamiento en el BO (resultados no publicados, comunicación personal de C. Vicario Abejón, Instituto Cajal, Madrid). La migración y diferenciación de las neuronas derivadas de progenitores/NSC de bulbo olfatorio adulto está también estimulada por el FGF2 (43). El IGF-I aumenta los niveles de la proteína fosforilada AKT *in vitro* e *in vivo*, ruta de diferenciación que implica a la PI3K y que frena la fosfatasa PTEN (44). Otros autores han aislado células progenitoras neurales en el BO humano adulto (45, 46) y demostrado que la delección condicionada de PTEN aumenta la neurogénesis constitutiva, aumentando el tamaño del BO y mejorando la función olfativa (47). Nuestro modelo de neurogénesis en el BO se resume en la Figura 5.

Diferenciación a partir de NSC de BO.

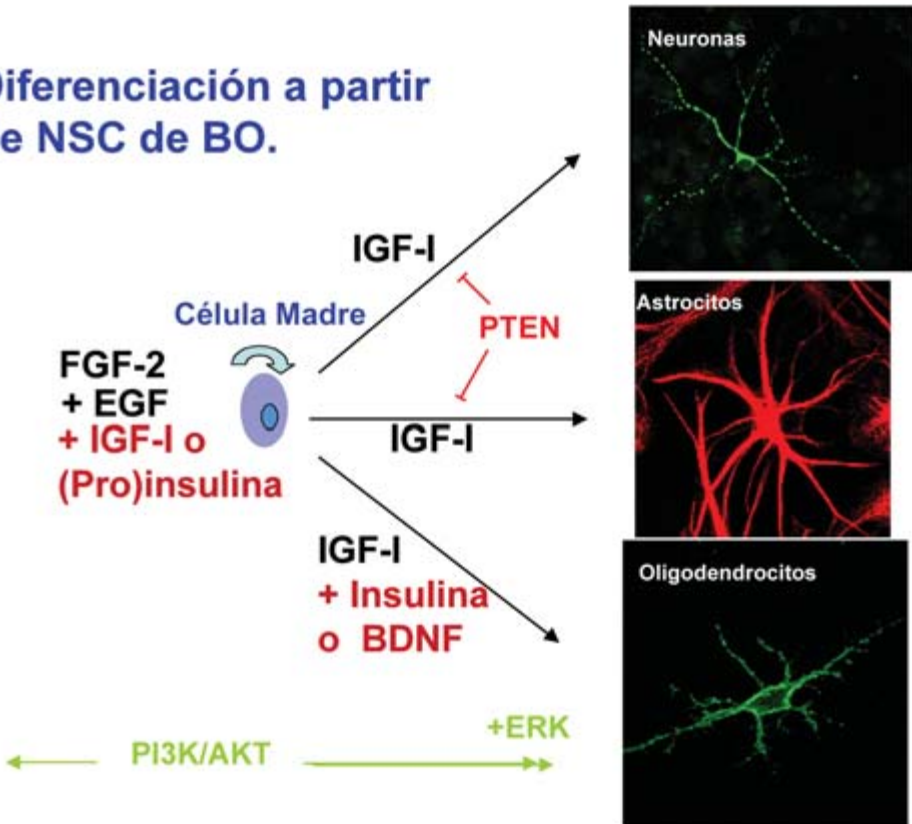


Figura 5. **Modelo de neurogénesis a partir de NSC de Bulbo Olfatorio de ratón.** Después de pases múltiples en condiciones de proliferación formando neuroesferas (descrito en la Figura 4), la retirada de los factores EGF y FGF2 promovió el inicio de un programa de diferenciación en células con los marcadores característicos de neuronas (52%), astrocitos (25%) y oligodendrocitos (4%). Estudios realizados con células de BO de un ratón carente de IGF-I indicaron que este factor es necesario para la diferenciación de NSC de ese origen (41). El IGF-I señala este proceso por una ruta que implica a las quinasas PI3K y AKT y que está modulada por la fosfatasa PTEN (44). NSC, Células madre neurales.

APROXIMACIONES REGENERATIVAS Y AUTORREGENERATIVAS COMO POSIBLES TERAPIAS EN EL SNC

Al tener el SNC menor potencial regenerador que otros tejidos, la terapia reparadora de disfunción celular por lesión, isquemia o degene-

ración, tiene que incluir un doble abordaje: terapia sustitutiva con precursores neurales y terapia antidegenerativa o neurotrófica.

Comenzando por la posibilidad de utilizar células madre embrionarias (ESC) como fuente de precursores neurales, cabe preguntarse si esta herramienta plantea todavía muchos interrogantes en cuanto a su comportamiento para poder iniciar ensayos clínicos reglados (48). El que estas células se dividan tan activamente es el aspecto más negativo para su traslado a la clínica, por el riesgo de producción de tumores. El efecto de trasplantar unas células con *demasiado potencial de expansión*, como son por definición las ESC, podría causar una proliferación anormal irreversible. El cálculo del riesgo de la terapia celular depende mucho del tipo de células que se usen y cómo se cultiven antes del trasplante. Para el SNC se necesitarán progenitores más flexibles que las neuronas diferenciadas, aunque éstas sean más fáciles de separar de las NSC. Hará falta amplia evidencia de eficacia en modelos animales de enfermedades humanas (49), que en algunos casos deberán incluir animales grandes o primates, no solo roedores. El modo de administración de las células, es también importante porque influye en la seguridad y la eficacia. Llegar a utilizar células progenitoras para tratar enfermedades del cerebro, la retina o la médula espinal (50) con la seguridad y eficacia que hoy se utilizan precursores/progenitores hematopoyéticos para reconstituir el sistema inmune (ver capítulo 2), llevará tiempo.

Entre las enfermedades neurodegenerativas, es quizá la de Parkinson la que podría beneficiarse antes de la terapia celular en sus diferentes aproximaciones. Esta enfermedad es una alteración progresiva del control motor y la función cognitiva que afecta aproximadamente al 2% de las personas de más de 65 años. Está causada por la muerte de neuronas productoras de dopamina, por causas desconocidas, en la región del cerebro llamada «*substantia nigra*». La consecuencia es que llega menos dopamina a las neuronas diana del estriado. La estrategia de reemplazar las neuronas perdidas se inició en los años 1980 del siglo pasado, cuando se autotrasplantaron células liberadoras de dopamina de las glándulas suprarrenales a pacientes con Parkinson (51-53), con modestos resultados. El NIH (*National Institutes of Health* de EEUU) financió dos ensayos clínicos bien controlados, que han durado más de una década, trasplantando tejido de fetos abortados al estriado, con resultados muy desiguales. Sólo los pacientes más jóvenes y con enfermedad leve respondieron relativa-

mente bien al trasplante; se observó por *PET-scan* que algunas de las neuronas productoras de dopamina habían sobrevivido y madurado. La composición celular exacta en estos tejidos fetales trasplantados no se conoce. El objetivo actual en este área es generar NSC y precursores que puedan crecer en grandes cantidades y diferenciarse eficientemente a neuronas dopaminérgicas que funcionen tras el trasplante (54-56). Se han generado ya neuronas dopaminérgicas a partir de ESC (57) y se han aislado del cuerpo carotídeo precursores (en este caso, parte del sistema nervioso periférico) con capacidad de producir dopamina (58).

Las nuevas células iPS pueden ser la alternativa más útil para tratar de obtener neuronas dopaminérgicas, entre otras. Se acaba de demostrar en un modelo de Parkinson de rata que, a partir de una selección de células derivadas de iPS de ratón, excluidas las pluripotentes, y tras ser trasplantadas, se diferenciaban a dopaminérgicas, se integraban y mejoraban los síntomas (59).

Un paso muy importante respecto a la reprogramación a células iPS, acaba de darse cuando escribimos este artículo (marzo de 2009), al lograrse transformar células de la piel de pacientes con Parkinson en neuronas productoras de dopamina, habiendo sido capaces de escindir los lentivirus que se usaron para introducir los cuatro genes reprogramadores (60). Estas células serán un gran modelo para estudiar su respuesta a factores exógenos como estrés oxidativo y neurotoxinas, y así entender mejor qué ha llevado a la neurodegeneración en esos pacientes concretos.

La esclerosis lateral amiotrófica (ALS) es una enfermedad neurodegenerativa progresiva fatal, en la que mueren motoneuronas de la médula espinal y tronco del encéfalo, causando pérdida del control muscular y parálisis que lleva a la muerte. Se han utilizado diferentes fuentes de progenitores para intentar restaurar la actividad de las motoneuronas. Así, células germinales embrionarias humanas fueron inyectadas en el líquido cefalorraquídeo de ratas parcialmente paralizadas, y unas pocas células maduraron a neuronas, acompañándose de mejora en el movimiento (61). Se ha iniciado recientemente un ensayo clínico fase I en nuestro país de autotrasplante de células aisladas, de médula ósea, a la médula espinal de pacientes afectados de ALS (comunicación personal del Prof. Salvador Martínez, Universidad Miguel Hernández de Alicante). Veremos otras estrategias interesantes para abordar esta enfermedad en el apartado siguiente.

En cuanto a las lesiones medulares, parciales o totales, que dejan frecuentemente al paciente parapléjico o tetrapléjico, afectan a pacientes jóvenes, dado que su causa suele ser accidentes de tráfico o deportivos; se calcula que pueden producirse anualmente de 15 a 40 millones en el mundo (62). Muchos estudios en roedores han indicado un beneficio tras el trasplante de variados tipos de células madre y precursores pero son difíciles de comparar por ser diversos los modelos, el protocolo de trasplante y los tipos de células utilizadas (62). En los casos en los que se han trasplantado NSC o precursores neurales o gliales, se ha visto que hay efecto beneficioso, aunque las células identificadas como derivadas del trasplante son en mayor número astrocitos que neuronas u oligodendrocitos (63, 64). Células madre neurales humanas sacadas de cerebros fetales y crecidas como neuroesferas, consiguieron sobrevivir tras el trasplante al ratón con lesión medular, y formar neuronas y oligodendrocitos. Incluso se detectaron nuevas sinapsis por ME entre nuevas neuronas y las del hospedador, sin aumentar la cicatriz glial (65).

Lamentablemente, bastantes pacientes con lesión medular han recibido trasplantes de varios tipos de células madre fetales y adultas, especialmente de médula osea, y a pesar del limitado conocimiento sobre como pueden promover la regeneración de la médula espinal, ya se están ofreciendo comercialmente en clínicas privadas (por ej. en www.stemcellschina.com). Se han iniciado ensayos clínicos en fase I para comprobar la seguridad (66), y un grupo de científicos independientes evaluó en China alguno de estos tratamientos a pacientes, y no encontró ningún efecto positivo tras la inyección de células sacadas de cerebros de fetos abortados en ese país (67). Recientemente, se ha planeado un análisis en profundidad por un consorcio internacional (68) que confiamos deje aclarados algunos aspectos esenciales de estas terapias.

La neuroretina es una parte del SNC que contiene fotorreceptores tipo cono y tipo bastón sensibles a la luz. La pérdida de estas células en muchas enfermedades retinianas causa ceguera. Dada su accesibilidad en el ojo, podría ser uno de los primeros lugares del SNC donde el trasplante de precursores neurales pudiera abordarse en la clínica. Hasta recientemente, no había ejemplos que mostraran en modelos animales que células madre derivadas de cerebro o retina se hubieran integrado en la capa nuclear externa, y se hubieran diferenciado correctamente en fotorreceptores. En 2006, sin embargo, se publicó un estudio en ratón

que aislaba los progenitores de la propia retina entre día postnatal (P)1 y P7, en el momento del pico de producción de conos en el ratón. Utilizando estas células para trasplantes subretinianos, tanto a ratones normales como a los modelos de retinosis pigmentaria, se obtuvo integración y diferenciación a conos. No obstante, la recuperación de la función visual fue muy limitada, en los casos de degeneración retiniana por falta de la proteína Rho (69, 70). Hay un reciente estudio trasplantando fotorreceptores derivados de ESC humanas a un modelo de ceguera congénita de Leber en ratón, que muestra cierta mejoría a la respuesta a la luz (71).

El progreso en entender la biología de las células madre, en obtenerlas de distintos orígenes y manipularlas para hacerlas útiles para trasplantes, ha sido muy importante en los últimos años. Sin embargo, estamos muy lejos todavía de poder proponer una terapia celular, mediante implantación de células exógenas, en patología difusas como la enfermedad de Alzheimer; o de saber dirigir las NSC a un tipo especializado como fotorreceptores funcionales. Aún tenemos otros desafíos importantes, como es reclutar las células madre neurales endógenas.

RECLUTAMIENTO Y ACTIVACIÓN DE CÉLULAS MADRE ENDÓGENAS Y NEURORREPARACIÓN POR FACTORES DE CRECIMIENTO

Saber cómo activar las propias células madre del SNC para que éste se autorrepare en caso de patología, es un área de investigación todavía en sus comienzos. Mucho menos explorada que la utilización de los trasplantes, es una estrategia necesaria dentro de la terapia personalizada y regenerativa hacia la que vamos caminando. En teoría presenta menos problemas de aplicación clínica que el trasplante de células con capacidad proliferativa, tendría algo menos riesgo de producir tumores (aunque un exceso de factores de crecimiento también los puede propiciar) y podría ser menos invasiva.

Las células madre activadas, sean trasplantadas o endógenas, son herramientas de reparación no sólo por su capacidad de convertirse en elementos estructurales útiles (neuronas con sinapsis maduras integradas en el tejido afectado), sino por su capacidad de secretar factores de

crecimiento o neurotróficos, ya sea utilizando progenitores neurales u otras células manipuladas genéticamente para producir localmente este tipo de factores.

Esta forma de tratamiento es, además, complementaria a la administración de factores neurotróficos directamente en el tejido o en los humores que le bañan. En todos los casos, el objetivo de los factores neurotróficos es evitar la muerte de células deterioradas y facilitar la reconexión de circuitos neuronales.

En la enfermedad de Parkinson, en un modelo de rata, la inyección de TGF- α indujo la proliferación de células que migraban al área dañada (72). La presencia de neurogénesis en la *substantia nigra* adulta es controvertida, y los estudios, en varios modelos de parkinsonismo en ratón y rata, no dan una respuesta definitiva a si las NSC endógenas pueden ser manipuladas y redirigidas para convertirse en neuroblastos que migran a la zona anormal (56). En cuanto al tratamiento con factores neurotróficos aplicados directamente, en 2003 se inició en el Reino Unido el primer ensayo clínico utilizando GDNF para tratar pacientes con Parkinson avanzado. Se administraba directamente en el cerebro mediante una minibomba implantada. Los resultados tras dos años fueron esperanzadores, con mejoría en la disquinesia y ausencia de efectos secundarios importantes. Sin embargo, en 2005, Amgen Inc., que patrocinaba los ensayos clínicos con GDNF, decidió pararlos porque en uno de los ensayos no se encontraron beneficios. Hubo protestas de algunos investigadores por esta interrupción del ensayo clínico, y parte de ellos decidieron continuar los tratamientos iniciados (73-75).

Respecto al tratamiento de ALS, ya hay modelos animales utilizando NSC modificadas genéticamente para liberar factores neurotróficos, que serían como «minibombas biológicas» de liberación *in situ*. Suzuki y cols. modificaron NSC humanas para liberar GDNF, y tras ser trasplantadas a un modelo de rata, se obtuvo buena migración celular a zonas degeneradas de la médula espinal, junto a una adecuada liberación de GDNF y mayor supervivencia de motoneuronas, aunque no hubo mayor inervación muscular (76).

En las lesiones medulares también se han utilizado NSC modificadas genéticamente para producir GDNF (77), y para producir Neurogenina 2, un factor de transcripción implicado en diferenciación a linajes

neurales (78), con variables resultados, ya que causaban alodinia. No esta claro todavía si es posible modular las NSC *in situ* para promover la recuperación, ya que hay aún poca información sobre la presencia de células madre de médula espinal (62). En nuestro país, se estan aislando células endodiales de la médula espinal con características de células multipotentes, que si proceden de animales con la médula lesionada proliferan mejor, y dan mejores resultados tras el trasplante en ratón (79).

La posibilidad de poder derivar iPS del propio paciente lesionado medular, en un futuro queda abierta, pero el tipo de lesión aguda requeriría actuar más rápido de lo que esta técnica posibilita por ahora. Habrá que recurrir a células heterólogas, preferentemente progenitores neurales, manipuladas para producir factores neurotróficos y almacenarlas en Biobancos, cuando se solucionen los problemas de elección de vectores y de multiplicación descontrolada (62).

Las tecnologías de aplicación son también importantes; al cerebro se llega mal por vía sistémica. Hay la posibilidad de introducir moléculas por vía nasal, vía intraocular para el caso de enfermedades de retina, y de hacer inyecciones intraventriculares o intraparenquima cerebral, pero que son mucho más invasivas.

LA NEURORRETINA EN DESARROLLO Y LECCIONES ÚTILES PARA EL TRATAMIENTO NEUROPROTECTOR EN LA RETINOSIS PIGMENTARIA

La muerte celular es un proceso que, junto a la proliferación y la diferenciación, tiene que funcionar al nivel adecuado para la construcción normal del SNC; y es también una característica final de muchos procesos neurodegenerativos. Conocer los mecanismos de muerte y de neuroprotección durante el desarrollo ha ayudado a nuestro grupo a entender su desregulación en condiciones patológicas en el adulto (80, 81). Hemos demostrado que la muerte celular programada, con características de apoptosis, está muy finamente regulada y ocurre en etapas tempranas del desarrollo, desde la neurulación y etapas proliferativas de neurogénesis en la retina. Hemos caracterizado el papel relevante de moléculas como c-Raf (82) o HSC 70 (83) y, especialmente, el de la

proinsulina, proteína precursora de la insulina (84). Nuestro conocimiento de los efectos neuroprotectores durante el desarrollo de la proinsulina, nos llevó a plantearnos la posibilidad de que fuera un factor protector de supervivencia celular en una patología neurodegenerativa sin tratamiento en el momento actual.

La Retinosis Pigmentaria es una enfermedad rara (afecta al 2,5 por 10.000 de población). Está causada por cualquiera de una larga serie de mutaciones en distintos genes, y que comienza en la etapa juvenil y conduce a la ceguera. En el modelo de ratón rd10, la degeneración de los bastones empieza en las primeras semanas postnatales, a los dos meses la degeneración ha afectado también a conos y el ratón presenta electroretinograma plano, es decir, es funcionalmente ciego. En nuestros primeros experimentos, provocamos un aumento de la proinsulina circulante mediante el cruce del ratón rd10 con un ratón transgénico que producía proinsulina de manera constitutiva en el músculo, la cual era transportada por sangre y llegaba al ojo. Comprobamos que estos mayores niveles de proinsulina retrasaban significativamente la degeneración de fotorreceptores en el ratón afectado (Figura 6), permitiendo el mantenimiento durante varias semanas adicionales de la actividad elec-

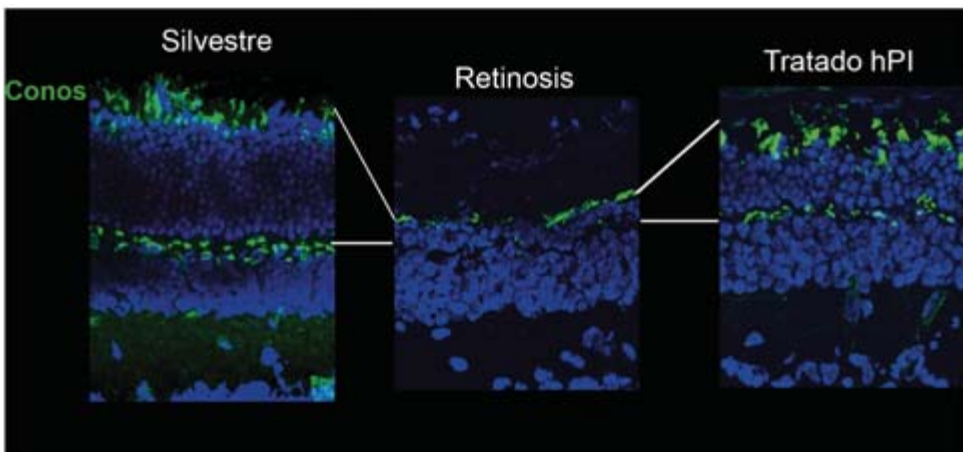


FIGURA 6. **Efecto protector de la Proinsulina sobre fotorreceptores.** La degeneración de fotorreceptores en retina de ratón P30, en el modelo de Retinosis Pigmentaria rd10, se observa por la disminución de bastones (capa de núcleos azules entre líneas) y la disminución de conos (marcados en verde), respecto al ratón silvestre. El aumento de niveles de hPI-proinsulina humana (en este caso inducido por transgénesis) protege a los fotorreceptores y retrasa su degeneración (85).

trorretinográfica (85). Este hallazgo ha dado lugar a la presentación de una patente y a que la EMEA (*European Medicines Agency*) y la FDA (*Food and Drug Administration*, de EEUU) hayan concedido la denominación de medicamento huérfano a la proinsulina, en su relación con el posible tratamiento en humanos de la Retinosis Pigmentaria. Además, hemos fundado una *spin-off* «ProRetina Therapeutics, S.L.» que tiene por objeto desarrollar terapias neuroprotectoras, celulares o génicas para esta enfermedad. Muy recientemente, Punzo y cols. (86) han demostrado que la estimulación de la ruta de señalización de insulina/mTOR retrasa la muerte de conos en un modelo de Retinosis Pigmentaria.

Claramente, las terapias con factores neurotróficos pueden ser complementarias y sinérgicas con las terapias celulares utilizando precursores neurales en diversas patologías. El SN en desarrollo debe ser nuestra fuente de conocimientos básicos para reconstituir el sistema cuando falla en la edad adulta.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Como la empresa biotecnológica española Cellerix®, enfocada a terapias celulares, afirma, estamos hoy explorando el uso de «*living medicines*», en contraposición con la farmacología convencional que utiliza productos químicos. Aunque estemos aún lejos del uso de células como terapia rutinaria o, al menos, como complemento significativo a la sustitución de un órgano completo por trasplante, el avance es, confiamos, imparable. Dada la compleja naturaleza del SNC es, sin embargo, un desafío mayor que en otros tejidos, el administrar terapia celular directamente en el cerebro. Deben incluirse entre nuestros objetivos:

- Seguir investigando todas las líneas abiertas, la biología de las células madre embrionarias, las fetales o neonatales y las adultas —las residentes en el cerebro y reactivadas, y las reprogramadas a neurales a partir de otras células somáticas, las prometedoras iPS—.
- Explorar terapias combinadas: trasplantes autólogos y heterólogos de células progenitoras o diferenciadas en cultivo, implantes de vehículos celulares que liberen factores neuroprotectores,

implantes con materiales biocompatibles o vectores génicos que aporten moléculas protectoras, terapias estimuladoras (eléctricas u otros tipos de energía) de la autorregeneración, etc.

El avance es necesario y será fascinante recorrer el camino, pero habrá que tener una regulación exigente para estas terapias, y no correr riesgos injustificados en su traslado a la clínica.

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de la última década he aprendido el significado de las células madre y ampliado conceptos en el área de la neuroprotección, gracias al trabajo de muchos colaboradores y colaboradoras en el laboratorio. Quiero agradecer especialmente al Dr. Carlos Vicario Abejón por aportarnos el sistema y conocimientos básicos a nuestro grupo, utilizando células madre de bulbo olfatorio, y al Dr. Enrique J. de la Rosa su continua contribución a la parte más celular del trabajo del equipo, y su liderazgo en nuestra nueva faceta de transferencia de resultados. A ambos les doy también las gracias por sus acertados comentarios sobre este manuscrito. La investigación del grupo aquí citada ha sido financiada por el Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2007-66175 a EJ de la R y BFU2007-61055 a F de P).

ABREVIATURAS

ALS, Esclerosis Lateral Amiotrófica (*Amiotrophic Lateral Sclerosis*); BMP, Proteína Morfogenética de Hueso; BO, Bulbo Olfatorio; BrdU, 5-Bromo-2' deoxiuridina; CNTF, Factor Neurotrófico Ciliar; EGF, Factor de Crecimiento Epidérmico; ESC, Células Madre Embrionarias (*Embryonic Stem Cells*); FGF, Factor de Crecimiento de Fibroblastos; GDNF, Factor Neurotrófico Derivado de Glía; IGF-I, Factor de Crecimiento Insulina-like I; LIF, Factor Inhibidor de Leucemia; iPS, Células Madre Pluripotentes Inducidas (*induced Pluripotent Stem cells*); ME, Microscopía Electrónica; NSC, Células Madre Neurales (*Neural Stem Cells*); NR1, Neuregulina I; PI3K, Fosfatidil Inositol-3-Kinasa; PEDF, Factor de Crecimiento Derivado del Epitelio Pigmentario; PET,

Tomografía de Emisión de Positrones; PTEN, Fosfatasa homóloga de Tensina; RMS, Corriente Migratoria Rostral (*Rostral Migratory Stream*); SNC, Sistema Nervioso Central; SVZ, Zona Subventricular (*Subventricular Zone*); VEGF, Factor de Crecimiento Endotelial Vascular.

BIBLIOGRAFÍA

1. Spalding KL, Bhardwaj RD, Buchholz BA, Druid H, Frisen J (2005) Retrospective birth dating of cells in humans. *Cell* **122**, 133-143
2. Bhardwaj RD, Curtis MA, Spalding KL, Buchholz BA, Fink D, Bjork-Eriksson T, Nordborg C, Gage FH, Druid H, Eriksson PS, Frisen J (2006) Neocortical neurogenesis in humans is restricted to development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 12564-12568
3. Ramón y Cajal S (1981) Recuerdos de mi vida: Historia de mi labor científica. Alianza Editorial, Madrid (reimpresión del original de 1923).
4. Ramón y Cajal S (1928) Degeneration and regeneration of the nervous system. Oxford University Press. London: Humphrey Milford. Volume I.
5. Altman J y Das GD (1965) Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature* **207**, 953-956
6. Goldman SA y Nottebohm F (1983) Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 2390-2394
7. Reynolds BA y Weiss S (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* **255**, 1707-1710
8. Kim JB, Zaehres H, Wu G, Gentile L, Ko K, Sebastiano V, Arauzo-Bravo MJ, Ruau D, Han DW, Zenke M, Scholer HR (2008) Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature* **454**, 646-650
9. Seaberg RM y van der Kooy D (2003) Stem and progenitor cells, the premature desertion of rigorous definitions. *Trends Neurosci* **26**, 125-131
10. Mikkers H y Frisen J (2005) Deconstructing stemness. *EMBO J* **24**, 2715-2719
11. Lai K, Kaspar BK, Gage FH, Schaffer DV (2003) Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat Neurosci* **6**, 21-27
12. Palma V, Lim DA, Dahmane N, Sanchez P, Brionne TC, Herzberg CD, Gitton Y, Carleton A, Alvarez-Buylla A, Ruiz i Altaba A (2005) Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development* **132**, 335-344
13. Ros MA (2008) La vía de Hedgehog: embriogénesis y enfermedad. En Redes de señalización y estrategias terapéuticas. Monografía XXIV, JM Ortiz Melón y M. Cascales Angosto, eds. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid. P. 161.

14. Fuchs E, Tumber T, Guasch G (2004) Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* **116**, 769-778
15. Watt FM y Eggan K (2009) Molecular mechanisms of stem-cell identity and fate. www.abcam.com/stemcells
16. McKay R (1997) Stem cells in the central nervous system. *Science* **276**, 66-71
17. Gross CG (2000) Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nat Rev Neurosci* **1**, 67-73
18. Duan X, Kang E, Liu CY, Ming GL, Song H (2008) Development of neural stem cell in the adult brain. *Curr Opin Neurobiol* **18**, 108-115
19. Lledo PM, Merkle FT, Álvarez-Buylla A (2008) Origin and function of olfactory bulb interneuron diversity. *Trends Neurosci* **31**, 392-400
20. Doetsch F, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A (1999) Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11619-11624
21. Carleton A, Petreanu LT, Lansford R, Álvarez-Buylla A, Lledo PM (2003) Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nat Neurosci* **6**, 507-518
22. Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A (2008) Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell* **3**, 265-278
23. Carlen M, Meletis K, Goritz C, Darsalia V, Evergren E, Tanigaki K, Amendola M, Barnabe-Heider F, Yeung MS, Naldini L, Honjo T, Kokaia Z, Shupliakov O, Cassidy RM, Lindvall O, Frisen J (2009) Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke. *Nat Neurosci* **12**, 259-267
24. Zhao C, Suh H, Gage FH (2009) Notch keeps ependymal cells in line. *Nat Neurosci* **12**, 243-245
25. Kohyama J, Kojima T, Takatsuka E, Yamashita T, Namiki J, Hsieh J, Gage FH, Namihira M, Okano H, Sawamoto K, Nakashima K (2008) Epigenetic regulation of neural cell differentiation plasticity in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 18012-18017
26. Jessberger S, Toni N, Clemenson GD, Jr., Ray J, Gage FH (2008) Directed differentiation of hippocampal stem/progenitor cells in the adult brain. *Nat Neurosci* **11**, 888-893
27. Sanai N, Tramontin AD, Quinones-Hinojosa A, Barbaro NM, Gupta N, Kunwar S, Lawton MT, McDermott MW, Parsa AT, García Verdugo JM, Berger MS, Alvarez-Buylla A (2004) Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* **427**, 740-744
28. Álvarez-Buylla A y Lim DA (2004) For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* **41**, 683-686
29. Suh H, Consiglio A, Ray J, Sawai T, D'Amour KA, Gage FH (2007) In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2⁺ neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* **1**, 515-528

30. Ge S, Goh EL, Sailor KA, Kitabatake Y, Ming GL, Song H (2006) GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* **439**, 589-593
31. Tashiro A, Sandler VM, Toni N, Zhao C, Gage FH (2006) NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus. *Nature* **442**, 929-933
32. Duan X, Chang JH, Ge S, Faulkner RL, Kim JY, Kitabatake Y, Liu XB, Yang CH, Jordan JD, Ma DK, Liu CY, Ganesan S, Cheng HJ, Ming GL, Lu B, Song H (2007) Disrupted-In-Schizophrenia 1 regulates integration of newly generated neurons in the adult brain. *Cell* **130**, 1146-1158
33. Curtis MA, Kam M, Nannmark U, Anderson MF, Axell MZ, Wikkelsø C, Holtas S, van Roon-Mom WM, Bjork-Eriksson T, Nordborg C, Frisen J, Dragunow M, Faull RL, Eriksson PS (2007) Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. *Science* **315**, 1243-1249
34. Manganas LN, Zhang X, Li Y, Hazel RD, Smith SD, Wagshul ME, Henn F, Benveniste H, Djuric PM, Enikolopov G, Maletic-Savatic M (2007) Magnetic resonance spectroscopy identifies neural progenitor cells in the live human brain. *Science* **318**, 980-985
35. Zhao C, Deng W, Gage FH (2008) Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* **132**, 645-660
36. Ge SY, Pradhan DA, Ming GL, Song HJ (2007). GABA sets the tempo for activity-dependent adult neurogenesis. *Trends Neurosci* **30**, 1-8.
37. Lin JH, Takano T, Arcuino G, Wang X, Hu F, Darzynkiewicz Z, Nunes M, Goldman SA, Nedergaard M (2007) Purinergic signaling regulates neural progenitor cell expansion and neurogenesis. *Dev Biol* **302**, 356-366
38. Bauer S, Kerr BJ, Patterson PH (2007) The neuropoietic cytokine family in development, plasticity, disease and injury. *Nat Rev Neurosci* **8**, 221-232
39. Kim HM, Qu T, Kriho V, Lacor P, Smalheiser N, Pappas GD, Guidotti A, Costa E, Sugaya K (2002) Reelin function in neural stem cell biology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 4020-4025
40. Trujillo CA, Schwandt TT, Martins AH, Alves JM, Mello LE, Ulrich H (2009) Novel perspectives of neural stem cell differentiation, from neurotransmitters to therapeutics. *Cytometry A* **75**, 38-53
41. Vicario-Abejón C, Yusta-Boyo MJ, Fernández-Moreno C, De Pablo F (2003) Locally born olfactory bulb stem cells proliferate in response to insulin-related factors and require endogenous insulin-like growth factor-I for differentiation into neurons and glia. *J Neurosci* **23**, 895-906
42. Román-Trufero M, Méndez-Gómez HR, Pérez C, Hijikata A, Fujimura, Y-I, Endo T, Koseki H, Vicario-Abejón C, Vidal M (2009) Maintenance of undifferentiated state and self-renewal of embryonic neural stem cells by Polycomb protein Ring 1B. *Stem Cells* (in press)
43. Vergaño-Vera E, Méndez-Gómez HR, Hurtado-Chong A, Cigudosa JC, Vicario-Abejón C (2009) Fibroblast growth factor-2 increases the expression of neuroge-

- nic genes and promotes the migration and differentiation of neurons derived from transplanted neural stem/progenitors cells. *Neuroscience* (in press)
44. Otaegi G, Yusta-Boyo MJ, Vergaño-Vera E, Méndez-Gómez HR, Carrera AC, Abad JL, González M, de la Rosa EJ, Vicario-Abejón C, De Pablo F (2006) Modulation of the PI 3-kinase-Akt signalling pathway by IGF-I and PTEN regulates the differentiation of neural stem/precursor cells. *J Cell Sci* **119**, 2739-2748
 45. Pagano SF, Impagnatiello F, Girelli M, Cova L, Grioni E, Onofri M, Cavallaro M, Etteri S, Vitello F, Giombini S, Solero CL, Parati EA (2000) Isolation and characterization of neural stem cells from the adult human olfactory bulb. *Stem Cells* **18**, 295-300
 46. Liu Z y Martin LJ (2003) Olfactory bulb core is a rich source of neural progenitor and stem cells in adult rodent and human. *J Comp Neurol* **459**, 368-391
 47. Gregorian C, Nakashima J, Le Belle J, Ohab J, Kim R, Liu A, Smith KB, Groszer M, Garcia AD, Sofroniew MV, Carmichael ST, Kornblum HI, Liu X, Wu H (2009) Pten deletion in adult neural stem/progenitor cells enhances constitutive neurogenesis. *J Neurosci* **29**, 1874-1886
 48. McCormick JB, Scott CT (2009) The stem cell century, a new epoch and fresh challenges. *Perspect Biol Med* **52**, 126-133
 49. Lindvall O y Kokaia Z (2006) Stem cells for the treatment of neurological disorders. *Nature* **441**, 1094-1096
 50. Daniela F, Vescovi AL, Bottai D (2007) The stem cells as a potential treatment for neurodegeneration. *Methods Mol Biol* **399**,199-213
 51. Panchision DM (2006) Repairing the nervous system with stem cells. En *Regenerative Medicine*, ed. Terese Winslow, National Institutes of Health 35-43
 52. Backlund EO, Granberg PO, Hamberger B, Knutsson E, Martensson A, Sedvall G, Seiger A, Olson L (1985) Transplantation of adrenal medullary tissue to striatum in parkinsonism. First clinical trials. *J Neurosurg* **62**, 169-173
 53. Madrazo I, Drucker-Colin R, Díaz V, Martínez-Mata J, Torres C, Becerril JJ (1987) Open microsurgical autograft of adrenal medulla to the right caudate nucleus in two patients with intractable Parkinson's disease. *N Engl J Med* **316**, 831-834
 54. Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R, Dillon S, Winfield H, Culver S, Trojanowski JQ, Eidelberg D, Fahn S (2001) Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* **344**, 710-719
 55. Olanow CW, Goetz CG, Kordower JH, Stoessl AJ, Sossi V, Brin MF, Shannon KM, Nauert GM, Perl DP, Godbold J, Freeman TB (2003) A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann Neurol* **54**, 403-414
 56. Zhao B, Zhong M, Jin K (2008) Neurogenesis and neurodegenerative diseases in human. *Panminerva Med* **50**, 55-64

57. Kim JH, Auerbach JM, Rodríguez-Gómez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, Lee SH, Nguyen J, Sánchez-Pernaute R, Bankiewicz K, McKay R. (2002) Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* **418**, 50-6
58. Pardal R, Ortega-Sáenz P, Durán R, López-Barneo J (2007) Glia-like stem cells sustain physiologic neurogenesis in the adult mammalian carotid body. *Cell* **131**, 364-77
59. Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, Hedlund E, Fu D, Soldner F, Broccoli V, Constantine-Paton M, Isacson O, Jaenisch R (2008) Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 5856-5861
60. Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, Gao Q, Bell GW, Cook EG, Hargus G, Blak A, Cooper O, Mitalipova M, Isacson O, Jaenisch R (2009) Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* **136**, 964-77.
61. Kerr DA, Llado J, Shablott MJ, Maragakis NJ, Irani DN, Crawford TO, Krishnan C, Dike S, Gearhart JD, Rothstein JD (2003) Human embryonic germ cell derivatives facilitate motor recovery of rats with diffuse motor neuron injury. *J Neurosci* **23**, 5131-5140
62. Barnabe-Heider F y Frisen J (2008) Stem cells for spinal cord repair. *Cell Stem Cell* **3**, 16-24
63. Enzmann GU, Benton RL, Talbott JF, Cao Q, Whittemore SR (2006) Functional considerations of stem cell transplantation therapy for spinal cord repair. *J Neurotrauma* **23**, 479-495
64. Karimi-Abdolrezaee S, Eftekharpour E, Wang J, Morshead CM, Fehlings MG (2006) Delayed transplantation of adult neural precursor cells promotes remyelination and functional neurological recovery after spinal cord injury. *J Neurosci* **26**, 3377-3389
65. Cummings BJ, Uchida N, Tamaki SJ, Salazar DL, Hooshmand M, Summers R, Gage FH, Anderson AJ (2005) Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in spinal cord-injured mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 14069-14074
66. Yoon SH, Shim YS, Park YH, Chung JK, Nam JH, Kim MO, Park HC, Park SR, Min BH, Kim EY, Choi BH, Park H, Ha Y (2007) Complete spinal cord injury treatment using autologous bone marrow cell transplantation and bone marrow stimulation with granulocyte macrophage-colony stimulating factor: Phase I/II clinical trial. *Stem Cells* **25**, 2066-2073
67. Dobkin BH, Curt A, Guest J (2006) Cellular transplants in China: observational study from the largest human experiment in chronic spinal cord injury. *Neuro-rehabil Neural Repair* **20**, 5-13
68. Cyranoski D (2007) Chinese network to start trials of spinal surgery. *Nature* **446**, 476-477

69. MacLaren RE, Pearson RA, MacNeil A, Douglas RH, Salt TE, Akimoto M, Swaroop A, Sowden JC, Ali RR (2006) Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors. *Nature* **444**, 203-207
70. Reh TA (2006) Neurobiology, right timing for retina repair. *Nature* **444**, 156-157
71. Lamba DA, Gust J, Reh TA (2009) Transplantation of human embryonic stem cell-derived photoreceptors restores some visual function in Crx-deficient mice. *Cell Stem Cell* **4**, 73-9.
72. Fallon J, Reid S, Kinyamu R, Opole I, Opole R, Baratta J, Korc M, Endo TL, Duong A, Nguyen G, Karkehabadhi M, Twardzik D, Patel S, Loughlin S (2000) In vivo induction of massive proliferation, directed migration, and differentiation of neural cells in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 14686-14691
73. Gill SS, Patel NK, Hotton GR, O'Sullivan K, McCarter R, Bunnage M, Brooks DJ, Svendsen CN, Heywood P (2003) Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nat Med* **9**, 589-595
74. Patel NK, Bunnage M, Plaha P, Svendsen CN, Heywood P, Gill SS (2005) Intraputamenal infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in PD: a two-year outcome study. *Ann Neurol* **57**, 298-302
75. Peck P (2005) AMGEN decision to halt GDNF clinical trials and withdraw the drug triggers protest from researchers and patients. *Neurol today* **5**, 4-7
76. Suzuki M, McHugh J, Tork C, Shelley B, Klein SM, Aebischer P, Svendsen CN (2007) GDNF secreting human neural progenitor cells protect dying motor neurons, but not their projection to muscle, in a rat model of familial ALS. *PLoS ONE* **2**, e689
77. Macias MY, Syring MB, Pizzi MA, Crowe MJ, Alexanian AR, Kurpad SN (2006) Pain with no gain: allodynia following neural stem cell transplantation in spinal cord injury. *Exp Neurol* **201**, 335-348
78. Hofstetter CP, Holmstrom NA, Lilja JA, Schweinhardt P, Hao J, Spenger C, Wiesenfeld-Hallin Z, Kurpad SN, Frisen J, Olson L (2005) Allodynia limits the usefulness of intraspinal neural stem cell grafts; directed differentiation improves outcome. *Nat Neurosci* **8**, 346-353
79. Moreno-Manzano V, Rodríguez-Jiménez FJ, García-Roselló M, Lainez S, Erceg S, Calvo MT, Ronaghi M, Lloret M, Planells-Cases R, Sánchez-Puelles JM, Stojkovic M (2009) Activated Spinal Cord Ependymal Stem Cells Rescue Neurological Function. *Stem Cells* **27**, 733-743
80. De la Rosa EJ and De Pablo F (2000) Cell death in early neural development: beyond the neurotrophic theory. *Trends Neurosci.* **23**, 454-458
81. De la Rosa EJ, Gómez-Vicente V, Valenciano AI, Boya P, De Pablo F (2007) Early neural cell death: an overlooked process in neural development. *An R Acad Nac Farm.* **73**, 1031-1045.
82. Pimentel B, Sanz C, Varela-Nieto I, Rapp UR, De Pablo F, de la Rosa (2000) EJC-Raf regulates cell survival and retinal ganglion cell morphogenesis during neurogenesis. *J. Neuroscience* **20**, 3254-62

83. De la Rosa EJ, Vega-Núñez E, Morales AV, Serna J, Rubio E, De Pablo F (1998) Modulation of the chaperone heat shock cognate 70 by embryonic (pro)insulin correlates with prevention of apoptosis. *Proc Nat Acad Sci, USA* **95**, 9950-9955
84. Díaz B, Serna J, De Pablo F, de la Rosa EJ (2000) In vivo regulation of cell death by embryonic (pro)insulin and the insulin receptor during early retinal neurogenesis. *Development* **127**, 1641-1649
85. Corrochano S, Barhoum R, Boya P, Arroba AI, Rodríguez-Muela N, Gómez-Vicente V, Bosch F, De Pablo F, de la Villa P, de la Rosa EJ (2008) Attenuation of vision loss and delay in apoptosis of photoreceptors induced by proinsulin in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **49**, 4188-4194
86. Punzo C, Kornacker K, Cepko CL. (2009) Stimulation of the insulin/mTOR pathway delays cone death in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Nat Neurosci* **12**, 44-52