



18. Medicina regenerativa para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas

Micaela López-León, Marianne Lehmann, Rodolfo G. Goya

El envejecimiento se encuentra asociado a un aumento en la incidencia de enfermedades neurodegenerativas tanto en el hombre como en los animales de laboratorio. En el hombre, este fenómeno se manifiesta en dos enfermedades principales, la de Alzheimer y la de Parkinson. En la actualidad sólo se dispone de tratamientos paliativos para ambas dolencias, por lo que existe un gran interés en el desarrollo de nuevos abordajes terapéuticos. En este contexto, la medicina regenerativa con células madre naturales o inducidas por reprogramación celular ofrece una clara promesa para el tratamiento de estas devastadoras patologías. El uso de células madre embrionarias o adultas constituye el abordaje más convencional de la medicina regenerativa y, si bien ha aportado resultados preclínicos alentadores, enfrenta dos obstáculos principales. Uno es de naturaleza ética, ya que el uso de células madre embrionarias implica la destrucción de embriones humanos. El otro obstáculo se origina en el hecho de que tanto las células madre embrionarias como las células madre adultas que se utilizan son heterólogas para el paciente, lo que suele generar rechazo inmunológico. Estos inconvenientes parecen haber encontrado una solución definitiva con el surgimiento de la reprogramación celular hace una década. Esta metodología permite la generación de células madre pluripotentes inducidas a partir de células somáticas del paciente. Aunque es posible rediferenciar células madre pluripotentes inducidas a tipos celulares somáticos específicos, el potencial tumorigeno de las células madre pluripotentes inducidas contaminantes aumenta el riesgo para la aplicación clínica de células neurales gene-

radas por este procedimiento. Por tanto, se están explorando enfoques de reprogramación que omiten el estadio de célula madre pluripotente. Recientemente se ha documentado un método llamado reprogramación de linaje, que consiste en la conversión directa de un tipo celular adulto en otro por medio de la expresión transgénica de factores de transcripción específicos del linaje o micro-ARN. Otro método, llamado reprogramación directa mediada por factores de pluripotencia, utiliza un sistema universal de factores de transcripción y permite generar una población celular de progenitores multipotentes rejuvenecidos, que pueden diferenciarse en tipos celulares particulares en respuesta a factores de diferenciación específicos. Estos tópicos serán revisados en el presente capítulo.

Índice

1.	Envejecimiento cerebral y medicina regenerativa	4
2.	Células madre	6
2.1.	Células madre embrionarias	8
2.2.	Células madre mesenquimales.....	8
2.3.	Células madre para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson	9
2.4.	Células madre para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.....	11
3.	Reprogramación celular	14
3.1.	La ruta hacia la reprogramación celular	14
3.2.	Células pluripotentes inducidas frente a células madre embrionarias	15
3.3.	Estrategias de reprogramación	15
3.4.	Transdiferenciación y reprogramación directa.....	16
3.5.	Inducción de células neurales por reprogramación celular	17
3.6.	Potencial terapéutico de la reprogramación celular para la enfermedad de Parkinson	23
3.7.	Potencial terapéutico de la reprogramación celular para la enfermedad de Alzheimer	24
4.	Consideraciones finales	28
5.	Bibliografía	29

1. Envejecimiento cerebral y medicina regenerativa

El envejecimiento está asociado a un progresivo incremento en la incidencia de enfermedades neurodegenerativas, tanto en animales de laboratorio como en seres humanos. En el sistema nervioso central, las neuronas colinérgicas y dopaminérgicas se encuentran entre las células más susceptibles a los efectos deletéreos de la edad y de las agresiones ambientales. Se sabe que el sistema colinérgico del prosencéfalo basal sufre cambios neurodegenerativos moderados durante el envejecimiento normal, así como una atrofia grave en la enfermedad de Alzheimer. La degeneración colinérgica en la enfermedad de Alzheimer conduce a la atrofia exacerbada del sistema colinérgico del prosencéfalo basal, que puede ser detectada en fases muy tempranas de deterioro cognitivo [1]. En la rata, el envejecimiento está asociado con cambios degenerativos y/o atróficos en el sistema colinérgico del prosencéfalo, y estos cambios morfológicos son paralelos a una declinación en la capacidad de aprendizaje espacial [2].

La enfermedad de Parkinson es un trastorno neurológico caracterizado por la degeneración y la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra del mesencéfalo, que conducen a una reducción de dopamina en el cuerpo estriado [3]. La enfermedad de Parkinson afecta al 0,1-0,3% de la población y es el reflejo más conspicuo de la vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas a la edad. Si bien la rata no desarrolla síntomas parkinsonianos durante el envejecimiento, a edades avanzadas (32 meses de edad, con una longevidad máxima en esta especie de unos 36 meses) pierde del 35 al 40% de las neuronas dopaminérgicas nigricas y muestra una marcada declinación en su función motora [4]. En los seres humanos, el envejecimiento normal también se asocia a una declinación en la función motora y a una pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas nigricas [5]. En consecuencia, la declinación progresiva de la función cognitiva y la actividad dopaminérgica central parecen representar rasgos básicos del envejecimiento normal, tanto en humanos como en animales de laboratorio. La exacerbación de estos procesos podría conducir a la enfermedad de Alzheimer y a la enfermedad de Parkinson, respectivamente.

En este contexto, la reprogramación celular y la terapia con células madre (conocidas también como células troncales) emergen como tecnologías capaces de hacer posible el desarrollo de tratamientos que resulten efectivos para detener o demorar la progresión, tanto de la enfermedad de Alzheimer como de la enfermedad de Parkinson. La medicina regenerativa tiene como objetivo explotar las características de las células madre, mediante trasplantes que sustituyan las células enfermas o disfuncionales por células sanas o por activación farmacológica de las poblaciones celulares multipotentes residentes en los tejidos. De esta manera, se intenta corregir las causas de las enfermedades degenerativas y no sólo tratar los síntomas. La reprogramación

celular ofrece la promesa de una medicina regenerativa personalizada, aunque su desarrollo se encuentra todavía en un estadio muy temprano. Por su parte, la terapia con células madre adultas se ha evaluado en modelos animales y también en algunos ensayos clínicos para enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis múltiple y esclerosis lateral amiotrófica [6-12], así como para la isquemia cerebral y en lesiones traumáticas de la columna [13]. Se han utilizado diferentes tipos de células madre adultas para el tratamiento de enfermedades neurológicas en modelos animales y se han obtenido resultados prometedores. Aunque los ensayos clínicos no han revelado todavía efectos concluyentes, el creciente esfuerzo humano y financiero destinado al desarrollo de la terapia con células madre permite albergar fundadas esperanzas de logros concretos en un futuro próximo.

2. Células madre

Las células madre (*stem cells*, en inglés) poseen dos características esenciales que las definen. En primer lugar, son capaces de autorrenovarse, es decir, dividirse produciendo nuevas células madre, manteniendo así la población celular. A su vez, bajo condiciones fisiológicas o experimentales específicas, las células madre pueden realizar divisiones celulares asimétricas y dar como resultado dos células diferentes [14]; una es todavía una célula madre, pero la otra ha comenzado un proceso de diferenciación celular. Hablamos entonces de su potencialidad para originar células maduras de diferentes linajes.

Las células madre pueden clasificarse teniendo en cuenta diferentes criterios, como su procedencia o su capacidad de regeneración.

- a) Según su procedencia, podemos dividir las células madre en células madre adultas, embrionarias e inducidas. Las células madre adultas, también conocidas como células madre somáticas, residen dentro de áreas específicas denominadas nichos, y han sido identificadas en diferentes órganos y tejidos [15,16]. Pueden permanecer quiescentes por largos períodos de tiempo, pero también pueden proliferar bajo ciertas circunstancias. Están presentes en muy bajo número en cada tejido y poseen una limitada capacidad de proliferación, por lo que la generación de grandes cantidades de este tipo celular en laboratorio resulta complicada. Por otro lado se encuentran las células madre embrionarias, que sólo existen en las primeras fases del desarrollo embrionario. Se obtienen del macizo celular interno del blastocisto y son capaces de producir cualquier tipo de célula del organismo (Fig. 1), pero no así dar lugar a un organismo nuevo, dado que no pueden diferenciarse a células del trofoectodermo, las que dan lugar a los tejidos extraembrionarios como la placenta. Bajo condiciones adecuadas, estas células conservan la capacidad de dividirse y hacer copias de sí mismas indefinidamente. Finalmente encontramos las células madre inducidas, que, a diferencia de las anteriores, son producidas de manera artificial y están programadas para comportarse como células madre embrionarias.
- b) Según su capacidad de regeneración y potencialidad de diferenciación, es decir, la capacidad de una célula para diferenciarse en otros tipos celulares, se encuentran en primer lugar las células madre totipotentes, que pueden crecer y formar un organismo completo, es decir, pueden diferenciarse hacia todos los tipos celulares, embrionarios y extraembrionarios. La célula madre totipotente por excelencia es el cigoto. Las células madre pluripotentes están presentes en estadios tempranos del desarrollo embrionario y poseen una alta capacidad de autorrenovación. Son las que pueden diferenciarse a cualquier tipo celular del organismo, es decir, pueden dar origen a las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo),

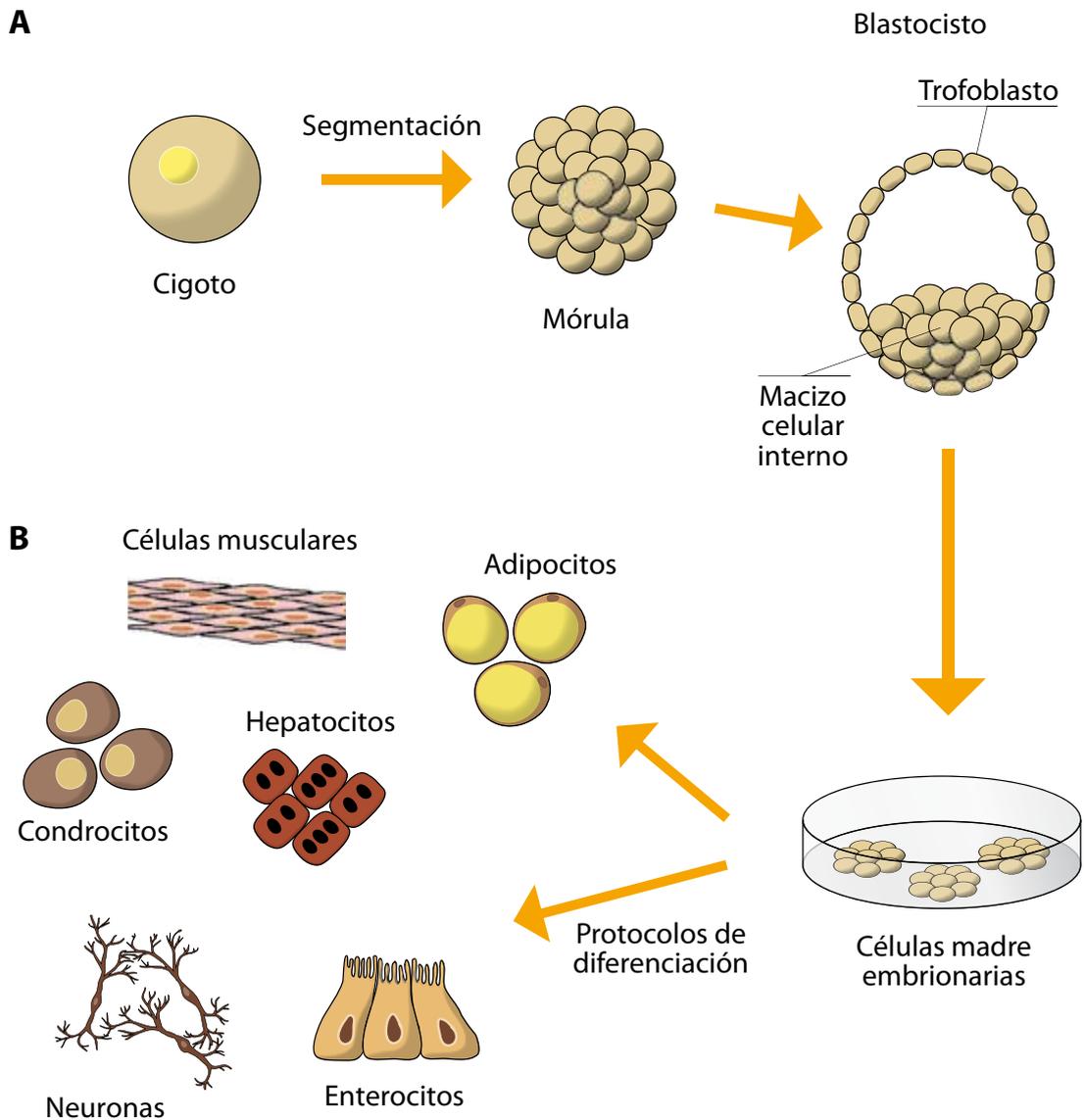


Figura 1. Desarrollo embrionario y derivación de células madre embrionarias. a) Primeras etapas del desarrollo embrionario, en donde un cigoto da lugar a la formación del blastocisto; b) Derivación de células madre a partir del macizo celular interno. *In vitro*, estas células tienen la capacidad de diferenciarse a cualquier tipo celular de las tres capas germinales mediante la aplicación de protocolos definidos.

pero no pueden formar un organismo completo. Las células madre multipotentes son las que sólo pueden diferenciarse en múltiples, pero limitados, tipos celulares. Pueden generar células de su propia capa o linaje embrionario de origen, aunque la ciencia actual ha demostrado que estos límites son flexibles. Las células madre oligopotentes, como las células madre

neurales, pueden dar lugar a unos pocos tipos celulares. Finalmente, las células madre unipotentes son las que pueden formar únicamente un tipo celular particular.

2.1. Células madre embrionarias

Las células madre embrionarias fueron aisladas por primera vez en 1998 por Thomson [17]. Tras la fecundación, el cigoto experimenta un marcado aumento de su actividad metabólica, necesario para que se inicie la segmentación, que consiste en una serie de divisiones mitóticas del cigoto en células hijas o blastómeras. Las primeras 12-16 blastómeras conforman la mórula. Después de aproximadamente cuatro días desde que ocurre la fecundación, se originan espacios entre las células centrales de la mórula y comienza a fluir líquido hacia esta cavidad emergente, lo que permite la separación de dos poblaciones celulares: una externa y una interna. A partir de la primera, denominada trofoblasto, se originan, entre otras estructuras, parte de la placenta y el cordón umbilical. La población interna localizada en el centro del embrión, que se conoce como el macizo celular interno, está constituida por las células madre embrionarias, que son las que darán origen al embrión propiamente dicho. Al embrión en este estadio del desarrollo se lo denomina blastocisto. El cigoto contiene toda la información genética y epigenética necesaria para el desarrollo del embrión. Las primeras ocho células que constituyen la mórula se caracterizan por tener la capacidad para dar origen a un organismo completo (totipotencia). En la siguiente etapa embrionaria, cuando se forma el blastocisto, ocurre la primera división funcional entre grupos de células. En este proceso, las células madre embrionarias del macizo celular interno darán origen al embrión, pero no al trofoblasto, que está compuesto por otro tipo de células multipotentes que darán lugar a las estructuras extraembrionarias [18] (Fig. 1).

Las células madre embrionarias son pluripotentes por naturaleza y pueden dar lugar a más de 200 tipos celulares [19]. Bajo condiciones de cultivo apropiadas, pueden ser inducidas a diferenciarse en una gran variedad de tipos celulares somáticos útiles, incluyendo neuronas, glía, células β -pancreáticas, hepatocitos, cardiomiocitos y muchos otros [20]. No sorprende que estas características hayan generado un enorme interés en su uso potencial como modelo del desarrollo humano, como una herramienta para el testeo y descubrimiento de drogas terapéuticas, y como una fuente celular para la medicina regenerativa.

2.2. Células madre mesenquimales

Las células madre mesenquimales, también conocidas como células estromales mesenquimales o células estromales multipotentes, pueden describirse como progenitores de morfología fibro-

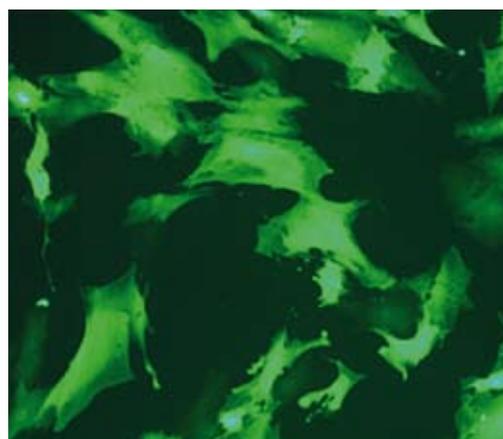
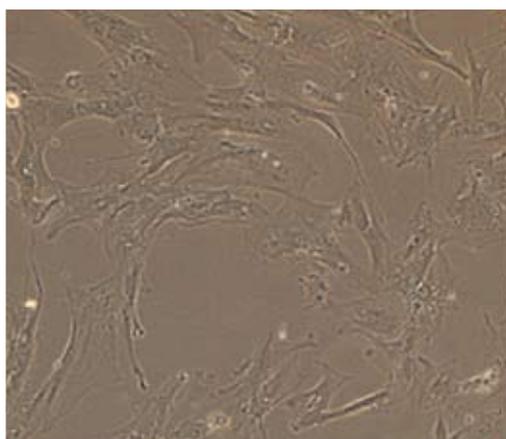
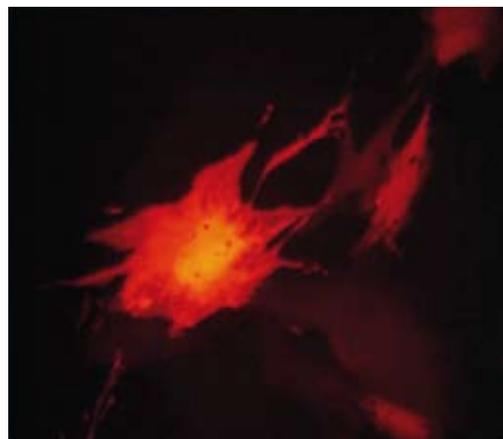
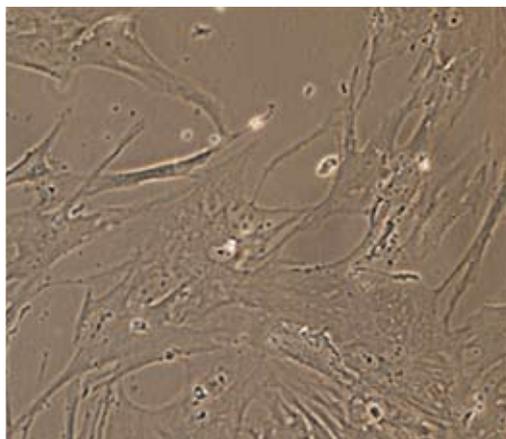
blasto-símil que se obtienen cuando se cultivan células adherentes al plástico a partir de diversos tejidos. Son células madre multipotentes con capacidad de autorrenovación y amplia distribución tisular [21]. Una característica que comparten las células madre mesenquimales de diferentes tejidos es la expresión de ciertos marcadores celulares de superficie, como el CD105, CD73 y CD90, así como la ausencia de expresión de marcadores hematopoyéticos. Otra característica común de las células madre mesenquimales es que pueden diferenciarse a osteoblastos, condroblastos y adipoblastos [22]. Asimismo, estas células presentan una plasticidad de diferenciación en tipos celulares no esqueléticos [23].

Las células madre mesenquimales constituyen las células madre adultas de mayor interés en medicina regenerativa, debido a que son relativamente fáciles de aislar y expandir, y se encuentran en muchos tejidos, como la médula ósea, la sangre periférica, el tejido adiposo y el músculo esquelético. Debe mencionarse, además, que la baja inmunogenicidad de las células madre mesenquimales las convierte en candidatas promisorias para su utilización como vehículos de genes terapéuticos (Fig. 2) [24]. Existe un creciente interés en la capacidad regenerativa, antiinflamatoria y terapéutica de las células madre mesenquimales, y se han publicado en los últimos años numerosos estudios experimentales que describen la aplicación de dichas células en modelos animales de infarto de miocardio, fibrosis hepática y neurodegeneración. En este último campo, la aplicación experimental de las células madre mesenquimales se focaliza principalmente en modelos de enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer, entre otros, dado que estos trastornos implican la pérdida de circuitos neuronales particulares, por lo que se busca restablecer esos circuitos mediante el aprovechamiento de la capacidad regenerativa de dichas células. Después del trasplante, las células madre mesenquimales pueden implantarse en el tejido cerebral y diferenciarse en neuronas y células gliales *in situ* [25]. Además de su capacidad de diferenciación neural, estas células pueden promover la neurogenia de progenitores neurales y la supervivencia de células neurales a través de la expresión de factores neurotróficos, como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el factor de crecimiento neuronal y el factor de crecimiento seudoinsulínico de tipo 1 [26]. Más aún, el trasplante de estas células en el sistema nervioso central previene la apoptosis y promueve la neurogenia local de células neurales y células madre del huésped [26-28].

2.3. Células madre para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson

En relación con la enfermedad de Parkinson, el objetivo de la terapia celular consiste en el reemplazo de las neuronas dopaminérgicas nigroestriadas perdidas en el sistema nervioso con contrapartes sanas recién generadas, así como la protección de las neuronas dopaminérgicas nigricas de mayores pérdidas. En este contexto, el uso de células madre embrionarias como fuente de neuronas dopaminérgicas constituye un prospecto de creciente interés [29]. Las neuronas

Células madre mesenquimales adultas genéticamente modificadas como vehículos génicos



Microscopía
de contraste de fase

Microscopía
de fluorescencia

Figura 2. Expresión de los genes de la proteína fluorescente roja DsRed de la anémona marina *Discosoma spp.* (a) y de la proteína fluorescente verde GFP de la medusa *Aequorea victoria* (b) en células madre mesenquimales humanas de médula ósea. Expresión del gen de la GFP en células madre mesenquimales humanas de cordón umbilical, teñidas *in vitro* con el colorante lipofílico rojo Dil (1,1',dioctadecil-3,3,3'-tetrametil-indocarbocianina perclorato) (c). Las imágenes de la izquierda y la derecha corresponden a los mismos campos de observación microscópica: uno por contraste de fase y el otro por microscopía de fluorescencia. Objetivo: 20x.

dopaminérgicas así generadas muestran propiedades electrofisiológicas y de comportamiento esperadas para las neuronas nigricas del mesencéfalo [30]. Existe evidencia de que las neuronas dopaminérgicas derivadas de células madre embrionarias de ratón sobreviven durante extensos períodos de tiempo (más de 37 semanas) en modelos murinos de enfermedad de Parkinson [31]. Además, las células madre embrionarias de ratón pueden diferenciarse espontáneamente en neuronas dopaminérgicas cuando se implantan en el cuerpo estriado de ratas cuyas neuronas dopaminérgicas nigricas han sido lesionadas farmacológicamente [32]. Estas neuronas dopaminérgicas así generadas causan una reversión conductual gradual y sostenida de la asimetría motora, rotación que se observa en ratas con lesiones nigricas unilaterales.

El potencial terapéutico de las células madre mesenquimales se ha examinado también en modelos animales de enfermedad de Parkinson, y se ha evaluado su capacidad neurorestaurativa intrínseca y su utilidad como fuente de neuronas dopaminérgicas. En este último aspecto, se ha documentado que las células madre mesenquimales de médula ósea pueden ser diferenciadas a neuronas dopaminérgicas funcionalmente activas cuando se cultivan en un medio que contiene el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2) como único inductor [33]. En otro estudio se documentó que la sobreexpresión de Nurr1 en células madre mesenquimales humanas promueve su diferenciación a neuronas dopaminérgicas *in vitro*, cuando el cultivo se realiza en presencia de *sonic hedgehog* (Shh) y FGF8, agregados secuencialmente al medio de cultivo. Interesantemente, el trasplante de estas neuronas dopaminérgicas generadas *in vitro* en el estriado de ratas hemiparkinsonianas atenúa su déficit motriz, evaluado por el grado de rotación asimétrica inducida por la administración de amfetamina [34]. Se ha documentado que la administración intracerebroventricular de células madre mesenquimales en ratas jóvenes estimula la neurogenia en el hipocampo [35], un hallazgo que, de replicarse en el hipocampo de ratas seniles, reafirmaría la promesa de las células madre mesenquimales para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. El implante intraestriado de células neurales originadas a partir de células madre mesenquimales, tratadas con el factor neurotrófico derivado de la glía, produce un mejoría en el comportamiento rotacional inducido por apomorfina, en un modelo parkinsonismo de ratas lesionadas con 6-hidroxidopamina [36]. En un ensayo clínico, se observó que la inyección de células madre mesenquimales en el área inferoventriculolateral de siete pacientes parkinsonianos indujo un significativo mejoramiento en los síntomas a nivel de gestos faciales, modo de andar y episodios de congelamiento observados [37].

2.4. Células madre para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer

Se ha documentado que la inyección intracerebral de células madre mesenquimales derivadas de cordón umbilical en un modelo murino de enfermedad de Alzheimer es capaz de reducir la

expresión de marcadores de activación glial, estrés oxidativo y apoptosis en su cerebro, lo cual se acompañó por una recuperación de la capacidad de aprendizaje y el desempeño de la memoria de dichos animales [7].

La inyección endovenosa de células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea en un modelo murino de Alzheimer reveló, por primera vez, la capacidad de dichas células de migrar al cerebro, así como una reducción en el tamaño de las placas amiloides pE3-A β [38]. En este estudio se observó una disminución en el nivel de activación de la microglía y los astrocitos. Se ha descrito también que la administración de células madre mesenquimales humanas en modelos animales de Alzheimer aumenta de manera significativa la neurogenia hipocampal, como también la diferenciación de progenitores neurales a neuronas maduras [39]. Este resultado puede ser de gran impacto en futuras estrategias para el tratamiento del Alzheimer, dado que el uso de células madre mesenquimales modula la neurogenia endógena en adultos. Las células madre mesenquimales humanas aumentan la autofagia y disminuyen el tamaño de las placas A en modelos murinos de Alzheimer, y ejercen de esta manera un efecto neuroprotector [40]. En modelos murinos de Alzheimer, los factores citotróficos secretados por dichas células ejercen efectos favorables a través de la disminución de la carga amiloide y la inflamación, así como por el aumento de la neurogenia endógena [7,41,42]. Recientemente, se ha completado la primera fase de un ensayo clínico, en el cual se inyectaron células madre mesenquimales humanas derivadas del cordón umbilical en el hipocampo y el precúneo, áreas afectadas en estadios tempranos de la enfermedad de Alzheimer, y se han obtenido resultados promisorios [43]. Si bien las células madre neurales trasplantadas en el cerebro pueden diferenciarse *in vivo* a neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, requieren un microambiente adecuado para que esto ocurra [44]. Como en los cerebros con Alzheimer el microambiente es hostil, es necesario coimplantar células madre progenitoras neurales y células madre mesenquimales, a fin de que estas últimas provean un ambiente prooligodendrónico para los progenitores neurales [45].

Asimismo, existe un creciente interés en producir neuronas colinérgicas a partir de células progenitoras neurales derivadas de células madre embrionarias, cuya capacidad restaurativa puede ser subsecuentemente evaluada en modelos murinos de Alzheimer. En este contexto, Moghadam et al [9] demostraron que, cuando se trasplantan progenitores neurales derivados de células madre embrionarias en cerebros de roedores, la mayoría de las células retiene su fenotipo neural, y un 40% de ellas expresa un fenotipo celular de neurona colinérgica sin formación de tumores, por lo que resultan seguras para el trasplante. Este estudio reveló una mejoría significativa en el desempeño de la memoria después del trasplante de los progenitores neurales.

El trasplante de células madre neurales hipocampales y células gliales derivadas de células madre neurales en dos grupos de ratas lesionadas por disecciones en el prosencéfalo basal reveló una

mayor generación de neuronas colinérgicas en el tabique medial y en la derivación vertical diagonal en el primer grupo de animales. No se observaron diferencias significativas en la capacidad cognitiva entre ambos grupos, pero hubo una diferencia significativa entre los animales trasplantados con células madre neurales respecto a un grupo de animales lesionados que no recibió células [12]. En otro estudio se trasplantaron células madre neurales en la región hipocampal de ratones triplemente transgénicos (3xTg-AD) que expresan formas patógenas de la proteína precursora β amiloide (APP) y presenilina [46]. Los resultados muestran que los déficits en la función cognitiva de los ratones viejos 3xTg-AD fueron atenuados por el tratamiento, sin alterar la patología A β o Tau. Esta mejora funcional fue acompañada de un incremento significativo en la densidad sináptica hipocampal mediada por el BDNF, el cual, según se demostró, es secretado por las células madre neurales.

3. Reprogramación celular

3.1. La ruta hacia la reprogramación celular

La demostración de que la sobreexpresión de tan sólo cuatro factores de transcripción específicos de células madre puede reprogramar fibroblastos murinos a un estado de pluripotencia, llevándolos a una condición en la que se comportan como células madre embrionarias, marcó el comienzo de la era de la medicina regenerativa personalizada.

El descubrimiento de la pluripotencia inducida representa la síntesis de principios científicos y tecnologías que se han desarrollado durante las últimas seis décadas. Entre los esfuerzos pioneros que despejaron la ruta hacia la reprogramación celular debe mencionarse el trabajo de John Gurdon et al en los años sesenta. Sus estudios demostraron que el núcleo de una célula diferenciada de rana adulta podía ser reprogramado, convirtiéndolo en el de una célula totipotente, cuando se transfería a un óvulo enucleado. A partir de dichas células, el equipo de Gurdon logró generar ranas adultas [47], con lo que se inició un camino que, tres décadas más tarde, llevaría a la clonación de mamíferos por transferencia nuclear somática, alcanzada en 1996 con el nacimiento de la oveja Dolly [48]. Este logro fue prontamente seguido por trabajos que documentaron la clonación de otras especies. Es importante destacar que todos estos estudios demostraron que el genoma celular, incluso el de las células altamente especializadas, permanece genéticamente totipotente, es decir, puede sostener el desarrollo de un organismo completo. Debemos también mencionar que en la década de los ochenta se había descubierto que un único factor de transcripción, MYOD, resulta capaz de convertir fibroblastos en células de músculo esquelético, lo que demuestra que el destino celular puede ser cambiado a través de la sobreexpresión de factores de transcripción específicos [49]. Estos hallazgos desafiaron la doctrina fundamental de que la célula, una vez terminalmente diferenciada, queda determinada de manera irreversible en su especialización. Por otra parte, el éxito de la clonación animal sugiere firmemente que el destino celular no es fijo, sino notablemente dúctil, y que distintos programas de expresión génica pueden ser activados en células terminalmente diferenciadas por medio de factores definidos. Otra implicación trascendental de los experimentos de clonación fue que en el citoplasma de un ovocito maduro hay moléculas capaces de reprogramar un núcleo somático, que lo inducen a poner en marcha el programa de desarrollo de un nuevo individuo. Lo que permanecía sin respuesta en 1996 era la cuestión de cuán compleja sería la constelación de factores de transcripción necesarios para reprogramar un núcleo somático. Este enigma se dilucidó 10 años después, cuando, en 2006, Takahashi y Yamanaka demostraron que la transferencia de los cuatro genes de pluripotencia *oct4*, *sox2*, *c-myc* y *klf4* a fibroblastos de ratón podía reprogramarlos, llevándolos a un estadio en el que se comportan como células madre pluripotentes

inducidas [50]. Un año más tarde se demostró que estos mismos cuatro genes de pluripotencia, conocidos como los genes de Yamanaka, pueden reprogramar fibroblastos humanos a células madre pluripotentes inducidas [51].

3.2. Células pluripotentes inducidas frente a células madre embrionarias

La ventaja potencial del uso de células madre pluripotentes inducidas y células madre embrionarias reside en el hecho de que las células pluripotentes son capaces de diferenciarse en prácticamente todos los tipos celulares del organismo [19,52]. Se trata de células indiferenciadas capaces de autorrenovarse y proliferar, generando tanto células hijas indiferenciadas como células maduras especializadas [53]. La reprogramación celular es una tecnología emergente que ofrece dos ventajas principales respecto a los abordajes terapéuticos basados en el uso de células madre embrionarias. La primera se relaciona con el hecho de que las células madre pluripotentes inducidas pueden generarse a partir de células somáticas del paciente fácilmente accesibles (por ejemplo, fibroblastos cutáneos). Las células madre pluripotentes inducidas derivadas de las propias células del paciente serán autólogas para él mismo y, en consecuencia, no generarán rechazo inmunológico cuando se implanten. Éste es un requerimiento necesario para implementar una genuina medicina regenerativa personalizada. La segunda ventaja es de naturaleza ética y se origina en el hecho de que el uso de células madre pluripotentes inducidas no requiere la destrucción de embriones, como es el caso de la terapia convencional con células madre embrionarias.

3.3. Estrategias de reprogramación

El método más utilizado para generar células inducidas de distintas estirpes se basa en la reprogramación de células somáticas a células madre pluripotentes inducidas, que subsecuentemente se diferencian al linaje celular de interés (Fig. 3a). Aunque es posible rediferenciar células madre pluripotentes inducidas en tipos celulares somáticos específicos cultivando dichas células en un medio suplementado con factores de diferenciación apropiados, el procedimiento en su conjunto es costoso, arduo y extenso. Debido a que los protocolos para generar células madre pluripotentes inducidas incluyen un gran número de etapas, la eficiencia con la cual se genera el tipo celular buscado puede ser baja. Además, se plantea una serie de interrogantes acerca de la seguridad y fidelidad de las células derivadas de células madre pluripotentes inducidas, que deben ser resueltos antes de que éstas puedan ser usadas clínicamente. Es importante señalar que uno de los ensayos más comúnmente utilizados para demostrar pluripotencia es la capacidad de formar teratomas [54]. Por tanto, el potencial tumorigeno de las células madre pluripotentes inducidas contaminantes que no logran diferenciarse aumenta el riesgo para la aplicación

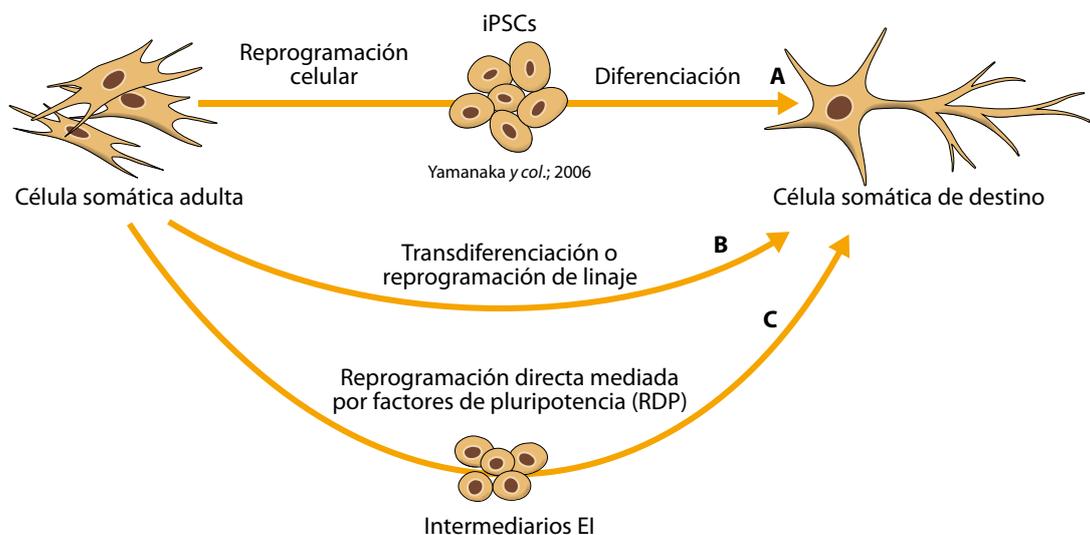


Figura 3. Esquemas que ilustran los distintos métodos de reprogramación celular que se utilizan en la actualidad. El diagrama A esquematiza el método original de Yamanaka et al. El esquema B corresponde a la reprogramación de linaje que emplea la transferencia de genes para factores específicos de estirpe celular. El esquema C delinea el método conocido como reprogramación directa mediada por factores de pluripotencia que se basa en la transferencia de cuatro genes de pluripotencia universales que convierte a las células somáticas de partida en intermediarios epigenéticamente inestables que pueden ser subsecuentemente transdiferenciados al linaje somático de interés.

clínica de las células somáticas generadas por este procedimiento. Consecuentemente, se están comenzando a desarrollar otros modos de reprogramar células, los cuales se basan en la conversión directa entre tipos celulares diferenciados, y se evita de esta forma el pasaje a través del estadio de pluripotencia. Estas metodologías emergentes se describen en el apartado siguiente.

3.4. Transdiferenciación y reprogramación directa

Recientemente se ha desarrollado una estrategia de reprogramación celular más directa para la generación de tipos celulares específicos. Se trata de la reprogramación de linaje o transdiferenciación, que consiste en la conversión directa de un tipo celular adulto en otro por expresión ectópica de múltiples factores de transcripción específicos del linaje o micro-ARN, sin que las células pasen a través de un estadio de células madre pluripotente [55]. Esta estrategia usa factores que muestran una expresión específica en las células de destino (Fig. 3b). De este modo, se ha demostrado que la transferencia génica, mediada por adenovirus, de una combinación de tres factores de transcripción puede reprogramar eficientemente células exocrinas pancreáticas a cé-

lulas β funcionales en ratones, lo cual constituye la primera evidencia documentada de reprogramación celular *in vivo* mediante factores definidos [56]. Estudios recientes han demostrado que la transdiferenciación puede producir un amplio rango de tipos celulares relevantes en medicina, como cardiomiocitos y neuronas [57,58]. Las células reprogramadas directamente muestran una funcionalidad equivalente a la de las células diferenciadas a partir de células madre pluripotentes inducidas o a sus contrapartes naturales, y no evidencian tumorigenia cuando se trasplantan *in vivo*. Sin embargo, las células generadas por este procedimiento pueden poseer una capacidad proliferativa restringida, limitada diversidad de tipo celular e incluso senescencia, lo que limita su potencial aplicación en terapia regenerativa.

Otro abordaje novedoso a la reprogramación celular, denominado reprogramación directa mediada por factores de pluripotencia, ha comenzado a utilizarse en años recientes. Este procedimiento parte de células somáticas adultas (fibroblastos o células sanguíneas, por ejemplo) a las que se les transfieren los cuatro genes de pluripotencia de Yamanaka, *oct4*, *sox2*, *c-myc* y *klf4*, pero en este caso sólo se les permite expresarse por un lapso de cuatro a seis días, y luego se reprimen. En estas condiciones no se generan células madre pluripotentes inducidas, sino células somáticas epigenéticamente inestables que son receptivas a la acción de diferentes factores de diferenciación (Fig. 3c). De este modo, si se cultivan durante unos 15 días en presencia de factores neurógenos o cardiomiógenos, se convertirán en precursores neurales [59] y neuronas inducidas o cardiomiocitos [60], respectivamente.

La transdiferenciación y la reprogramación directa mediada por factores de pluripotencia comparten el rasgo de ser procedimientos específicos del paciente, y en ambos casos se evita el paso por un estado intermediario pluripotente. En contraste con la conversión de tipo celular mediada por células madre pluripotentes inducidas, larga y tediosa, en los abordajes directos la conversión ocurre en un período de tiempo generalmente menor de 15 días.

3.5. Inducción de células neurales por reprogramación celular

Existe un gran interés en la obtención de neuronas maduras y precursores neurales por reprogramación de células somáticas de pacientes con enfermedad de Parkinson o de Alzheimer. La figura 4 presenta un resumen gráfico de los métodos utilizados para obtener diferentes tipos de células neurales inducidas. Dichas células neurales inducidas podrían ser subsecuentemente utilizadas para implementar terapia celular personalizada en esos pacientes. En este contexto, se ha demostrado que células somáticas humanas no neurales pueden convertirse directamente en neuronas mediante factores de transcripción determinantes de linaje [58]. Inicialmente se demostró que los fibroblastos embrionarios y posnatales de ratón pueden convertirse eficien-

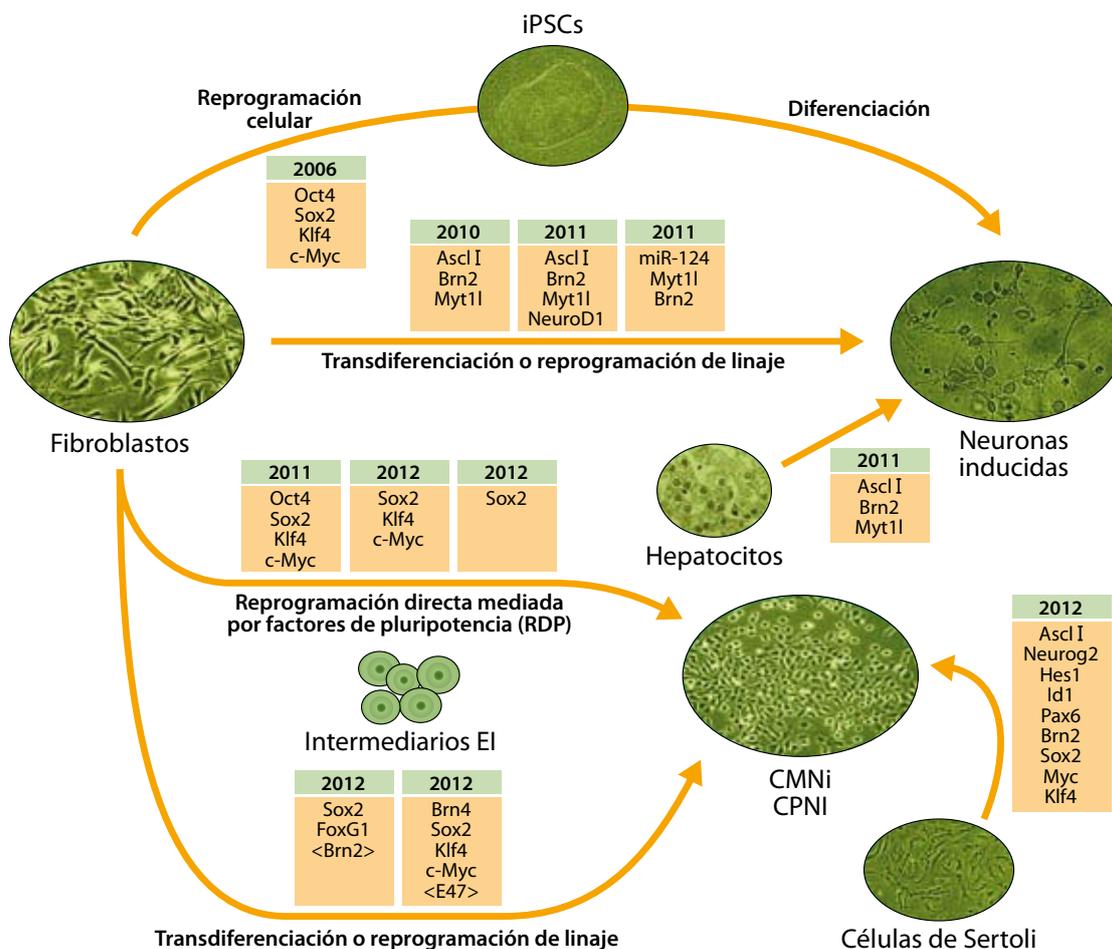


Figura 4. Resumen gráfico de los distintos procedimientos de reprogramación celular que se han descrito para generar neuronas inducidas, células madre neurales inducidas o células progenitoras neurales inducidas.

temente en neuronas funcionales *in vitro* por transferencia génica de tan sólo tres factores de transcripción específicos de linaje, a saber BRN2, ASCL1 y MYT1L, conocidos colectivamente como BAM [61]. Estas neuronas inducidas expresan múltiples proteínas neuroespecíficas, generan potenciales de acción y forman sinapsis funcionales. Cuando son combinados con el factor de transcripción NEUROD1, estos tres factores también pueden convertir fibroblastos humanos en células neuronales inducidas, las cuales muestran morfología neuronal típica y expresan múltiples marcadores neurales [62]. Estas células neuronales inducidas humanas son capaces de generar potenciales de acción y recibir contactos sinápticos de neuronas corticales murinas en cocultivo. Un año posterior a este descubrimiento, numerosos grupos lograron generar neuronas inducidas a partir de fibroblastos humanos [62-64].

El cambio en la identidad celular requiere la transición entre estados epigenéticos, mediada por factores de transcripción y moduladores epigenéticos. Durante la diferenciación *in vivo*, los cambios graduales en el destino celular están controlados por la combinación de una cascada programada genéticamente de patrones de expresión de proteínas, mediada por factores de transcripción, con la modulación de factores de señalización exógenos. Durante la reprogramación, los llamados factores de transcripción pioneros acceden directamente al nucleosoma, se unen a las estructuras cerradas de la cromatina y coordinan la unión de factores de transcripción secundarios para iniciar un nuevo destino celular [92]. En la reprogramación a células madre pluripotentes inducidas [51], los factores de Yamanaka OCT4, SOX2 y KLF4 actúan como factores de transcripción pioneros, mientras que C-MYC solo se une a la cromatina ya abierta y actúa como un potenciador secundario [65,66]. Durante la conversión de fibroblastos de ratón a neuronas inducidas mediada por BAM, ASCL1 puede actuar como un factor de transcripción primario que posteriormente recluta a BRN2 a los sitios de unión del ASCL1, mientras MYTL1 es requerido únicamente en estadios avanzados de maduración [67]. Por tanto, la conversión de neuronas inducidas sigue un mecanismo jerárquico en el cual ocurre una secuencia de eventos epigenéticos [68]. Cabe mencionar que varios grupos han demostrado que la expresión de factores de transcripción puede ser temporal y no se requiere en forma continua para la conversión a neuronas inducidas, evitando de esta manera el riesgo potencial de que la sobreexpresión permanente de factores de desarrollo neural pudiera interferir con la función de fenotipos neurales maduros o con otros fenotipos relevantes de las neuronas inducidas generadas [69-72]. Parecen existir diferencias específicas de la especie en el conjunto óptimo de factores de transcripción necesario para la conversión directa. Las estrategias basadas en ASCL1 demostraron ser menos eficientes en humanos que en roedores: se requieren cuatro factores (BAM más NEUROD1) para convertir fibroblastos humanos en neuronas inducidas funcionales. Por el contrario, NGN2, un factor de transcripción proneural, las convierte eficientemente [70]. En la búsqueda del conjunto más eficiente y acotado de factores de transcripción suficientes para la reprogramación a neuronas [73] se descubrió que una combinación de los dos factores de transcripción pioneros, ASCL1 y NGN2, conduce a una alta eficiencia de conversión, incluso en fibroblastos derivados de humanos adultos y seniles [74,75].

Una limitación significativa de las células neuronales inducidas para su uso rutinario en terapia celular es que para cada aplicación deben generarse a partir de células somáticas, ya que las células neuronales inducidas son posmitóticas y no pueden expandirse en cultivo. En tal sentido, la generación de progenitores y precursores neurales aparece como más ventajosa para la preparación de *stocks* de células neuronales inducidas a partir de aquéllos. Asimismo, diversos estudios se han focalizado en la generación de células madre neurales inducidas y células progenitoras neurales inducidas a partir de fibroblastos [59,76]. Estas células pueden diferenciarse en neuronas y células gliales, los dos tipos celulares mayoritarios en el sistema nervioso central. Mientras

que, como se mencionó antes, las células madre neurales son células autorrenovables, capaces de producir neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, las células progenitoras neurales tienen una capacidad de autorrenovación limitada. La estrategia de reprogramación directa mediada por factores de pluripotencia fue usada inicialmente por Kim et al [59], quienes demostraron que la expresión transitoria de los cuatro factores de pluripotencia OCT4, SOX2, KLF4 y C-MYC, bajo el control de un promotor inducible por doxiciclina, durante 3-6 días, seguida por el agregado de factores de diferenciación adecuados, puede reprogramar eficientemente fibroblastos a células progenitoras neurales inducidas funcionales. Cuando durante la reprogramación directa mediada por factores de pluripotencia se generan fibroblastos de ratón epigenéticamente inestables que son posteriormente cultivados en un medio que contiene las moléculas neurógenas denominadas FGF2, FGF4 y factor de crecimiento epidérmico, se observa, 8-9 días más tarde, la aparición de colonias de células que exhiben varias de las características de las células progenitoras neurales. Este proceso, que es altamente específico y eficiente, se completa en unos 13 días, y se cosecha cerca del 100% de las colonias recién generadas, que están compuestas en su mayoría por células progenitoras neurales [59]. Comparadas con las células neuronales inducidas, las células progenitoras neurales poseen la ventaja distintiva de ser expandibles *in vitro* y de retener su capacidad para dar origen a múltiples subtipos neuronales y células gliales. Otra ventaja de este método es el uso de factores de reprogramación universales, en lugar de factores de transcripción específicos para cada linaje celular.

Debido a que las células madre neurales expresan endógenamente tres de los cuatro factores de reprogramación de Yamanaka, a saber, SOX2, KLF4 y C-MYC, pero no OCT4, Thier et al [77] investigaron si una reprogramación en la que se permitiese una expresión restringida en el tiempo de OCT4 podría convertir fibroblastos en células madre neurales inducidas. Estos autores demostraron que, si se inducían constitutivamente SOX2, KLF4 y C-MYC mientras la actividad de OCT4 se limitaba estrictamente a la fase inicial de reprogramación, se generaban células madre neurales inducidas. La expresión de OCT4 fue reprimida selectivamente después del día 5, y se mantuvieron los otros tres genes sobreexpresados. Estas células madre neurales inducidas, que pueden ser expandidas por más de 50 pasajes, mostraron de manera uniforme poseer características morfológicas y moleculares típicas de las células madre neurales derivadas del cerebro y tuvieron un perfil transcripcional similar al de ellas. De este modo se logró generar células madre neurales inducidas multipotentes y autorrenovables, carentes de potencial tumorigeno, directamente a partir de fibroblastos por sobreexpresión restringida de genes de pluripotencia. También se ha documentado la generación de células madre neurales inducidas a partir de fibroblastos humanos y de ratón por reprogramación directa con un único factor, SOX2 [78]. Estas células madre neurales inducidas expresan marcadores de células madre neurales naturales y se asemejan a ellas en su morfología, capacidad de autorrenovación para formar neuroesferas y perfiles de expresión génica. Pueden diferenciarse en varios tipos de neuronas maduras, lo cual indica

multipotencialidad. Estas células madre neurales inducidas pueden sobrevivir e integrarse en el cerebro de ratones y, a diferencia de las células madre neurales derivadas de células madre pluripotentes inducidas, no generan tumores. Las células madre neurales inducidas muestran una extensa capacidad de autorrenovación comparada con la limitada tasa replicativa de las células progenitoras neurales inducidas generadas por Kim et al [59], las cuales pueden ser expandidas sólo por unos pocos pasajes, lo que excluye la posibilidad de que las células se mantengan en autorrenovación permanente, que es un requerimiento crítico para su aplicación clínica. Por otra parte, las células obtenidas por Kim et al aparentemente carecen del potencial para diferenciarse en oligodendrocitos.

En un enfoque alternativo de transdiferenciación, Lujan et al [76] demostraron que una combinación definida de factores de transcripción altamente expresado en células progenitoras neurales es suficiente para transdiferenciar fibroblastos murinos a células progenitoras neurales inducidas proliferantes. En efecto, los factores FOXG1 y SOX2 son capaces de inducir células progenitoras neurales autorrenovables y bipotentes, que pueden dar lugar a neuronas y astrocitos. Cuando se añade el gen para BRN2, se generan células progenitoras neurales inducidas tripotentes, las cuales también pueden diferenciarse a oligodendrocitos. En otro enfoque de transdiferenciación, Sheng et al [79] demostraron que células de Sertoli derivadas de mesodermo pueden convertirse directamente en células madre neurales inducidas expresando múltiples marcadores específicos de células madre neurales, exhibiendo un perfil de expresión génica característico y la capacidad de autorrenovación y diferenciación en glía y neuronas funcionales. Para implementar este protocolo se requirió la sobreexpresión de nueve factores de reprogramación específicos de células madre neurales.

Asimismo, la expresión combinada de los factores de Yamanaka con factores de transcripción neurales tempranos, como FOXG1 o BRN4, ayuda luego a impulsar los intermediarios inestables hacia el linaje de células progenitoras neurales inducidas [77,78,80,81]. Se ha documentado la conversión directa de fibroblastos en células progenitoras neurales inducidas [81], las cuales se asemejan a las células madre neurales en morfología, expresión génica de marcadores, potencial de diferenciación y capacidad de autorrenovación. Estas células se generaron exitosamente mediante dos combinaciones de factores de transcripción: una combinación de cuatro factores (SOX2, C-MYC, KLF4 y BRN4), y una combinación de cinco factores (sumando a E47 a los anteriores). Resumidamente, se demostró que SOX2, C-MYC, KLF4 y BRN4 son factores activos suficientes para inducir la transdiferenciación de fibroblastos de ratón en células progenitoras neurales inducidas, en un proceso gradual en el cual el programa transcripcional de los fibroblastos es silenciado durante un tiempo. Para generar células del sistema nervioso periférico, la expresión combinada de SOX10 con la señalización WNT logró convertir fibroblastos en células de la cresta neural inducidas [82]. En ausencia de factores de reprogramación, la supresión de

let-7 y la activación de HMGA2 logró convertir fibroblastos humanos y células de la sangre en células progenitoras neurales inducidas [83].

Las aplicaciones clínicas de las neuronas inducidas y sus precursores están gravemente afectadas por el hecho que la mayoría de las estrategias de reprogramación utilizadas para generar dichas células involucran la transferencia génica integrativa mediante retrovirus y lentivirus, que conlleva el bien conocido riesgo de mutagenia insercional o silenciamiento génico. Los vectores virales pueden integrarse en el genoma huésped al azar, incrementando el riesgo de genotoxicidad, mutagenia y formación de tumores no deseadas. Por este motivo, es necesario el desarrollo de métodos de generación de células madre y progenitoras neurales inducidas que no involucren la transducción viral. Recientemente se han publicado trabajos en los que se hizo uso de vectores basados en el virus de Epstein-Barr, los cuales se mantienen como episomas multicopia sin integrarse en el genoma de la célula huésped, como herramientas de reprogramación para generar células madre pluripotentes inducidas libres de integración [84,85]. Kim et al [86] demostraron la generación de células madre neurales inducidas libres de integración mediante el uso de vectores episomales. La transfección de vectores episomales que contenían los genes para los factores de transcripción SOX2, KLF4, C-MYC y BRN4/POU3F4 fue suficiente para generar células madre neurales inducidas a partir de fibroblastos embrionarios de ratón, aunque con una eficiencia de conversión menor a la obtenida con sistemas virales. Estas células madre neurales inducidas libres de integración se asemejan en gran medida a las células madre neurales de tejido cerebral y a las células madre neurales inducidas generadas mediante retrovirus, tanto en morfología, transcriptoma, características epigenéticas, y capacidad de diferenciación *in vivo* e *in vitro*.

En los últimos años se han desarrollado estrategias de conversión directa alternativas, libres de factores de transcripción, incluida la represión génica dirigida. Los micro-ARN proneurales miR-124 y miR-9* pueden dirigir la conversión directa de fibroblastos humanos en neuronas inducidas inmaduras mediante la activación de NEUROD2, aunque se requieren ASCL1 y MYT1L para la maduración funcional de estas células [87]. En otro estudio se demostró que miR-124, en combinación con BRN2 y MYT1L, permite la conversión directa de fibroblastos humanos en células neurales inducidas funcionales sin la necesidad de factores de transcripción pioneros [88]. Se ha demostrado también que la supresión de un ARN corto de interferencia, PTBP1, es suficiente para la conversión directa de fibroblastos de ratón en neuronas inducidas [89]. Otra estrategia diferente de reprogramación directa involucra el uso de pequeñas moléculas inhibitoras de vías de señalización. La inhibición de las vías TGF o SMAD mediante Noggin, o la inhibición de ALK, mejora dramáticamente la eficiencia de conversión a neuronas inducidas [70,74]. Se han descrito diferentes combinaciones de pequeñas moléculas capaces de convertir fibroblastos en neuronas funcionales sin necesidad del agregado de factores exógenos [90,91].

3.6. Potencial terapéutico de la reprogramación celular para la enfermedad de Parkinson

El advenimiento de la tecnología de la reprogramación celular permite derivar células madre pluripotentes inducidas, así como neuronas maduras, precursores neurales y células madre neurales a partir de fibroblastos cutáneos u otras células somáticas fácilmente accesibles en el paciente. Actualmente se pueden obtener neuronas por diferenciación de células madre pluripotentes inducidas [11] o por conversión directa de fibroblastos [58,64,93,94].

Al igual que las células madre embrionarias, las células madre pluripotentes inducidas pueden diferenciarse a neuronas dopaminérgicas en cultivo e implantarse subsecuentemente en el cerebro de ratas en las que se han inducido síntomas parkinsonianos, donde son capaces de atenuar su sintomatología [10]. Se ha descrito que, cuando estas neuronas dopaminérgicas inducidas se implantan en el cerebro de fetos de ratones, pueden integrarse sinápticamente, y se ha documentado asimismo que funcionan apropiadamente cuando se las implanta en el cerebro de ratas parkinsonianas adultas [11]. En un abordaje más directo en el que se usaron los factores de transcripción ASCII, NURR1 y LMX1A, se logró generar neuronas dopaminérgicas funcionales a partir de fibroblastos humanos, sin pasar por un estadio de célula progenitora [93]. En el mismo estudio también se demostró que es posible generar neuronas dopaminérgicas a partir de pacientes parkinsonianos. Por otra parte, se demostró que una combinación de los factores de transcripción ASCL1 y NURR1, asociados con factores neurotróficos como el SHH y el FGF8, permite reprogramar fibroblastos embrionarios de ratón a neuronas dopaminérgicas inducidas y células panneuronales [95].

La posibilidad de inducir células madre neurales originadas a partir de células somáticas humanas, por ejemplo, fibroblastos, ha abierto nuevos horizontes para la investigación tanto para el modelado de enfermedades como para aplicaciones de terapia celular en el campo neurológico. El hecho de que las células madre neurales inducidas puedan ser expandidas *in vitro* por un número de pasajes potencialmente ilimitado constituye una característica ventajosa, ya que las aplicaciones clínicas que involucran trasplante de células madre usualmente requieren grandes cantidades de células del donante. El trasplante de células neurales derivadas de fibroblastos del paciente podría eliminar los problemas de rechazo que se manifiestan durante el uso de células madre embrionarias u otras células madre derivadas de diferentes donantes. Dado que las células madre neurales inducidas están comprometidas hacia el linaje neural, son capaces de generar los tres tipos principales de células neurales [78] y permiten su adaptación con un menor riesgo tumorigeno. En contraste, tanto las células madre embrionarias como las células madre pluripotentes inducidas son capaces de diferenciarse a una amplia variedad de tipos celulares, muestran una alta plasticidad y manifiestan también potencial tumorigeno en los animales trasplantados.

Resulta de interés el descubrimiento de que las células madre neurales inducidas poseen *per se* efectos terapéuticos en ratones con Parkinson experimental [96]. El estudio citado reveló que estas células, modificadas genéticamente para expresar el factor LMX1A (células iNSC-Lmx1a o sus controles iNSC-GFP), poseen una capacidad terapéutica mejorada cuando se las trasplanta en el cerebro de modelos animales de Parkinson, y se observa que dichas células genéticamente modificadas producen un mayor rendimiento en la generación de neuronas dopaminérgicas, que, a su vez, generan mayores cantidades de dopamina en cultivo. Cuando las células iNSC-Lmx1a o sus controles se implantan en el cerebro de ratones parkinsonianos, se obtiene una mejor respuesta terapéutica en un test rotacional, aunque las iNSC-Lmx1a resultan más efectivas que las células controles. Considerando que LMX1A desempeña un papel central en la diferenciación hacia neuronas dopaminérgicas [97,98], los resultados arriba descritos sugieren que este factor de transcripción podría mejorar la eficiencia de la conversión de células madre neurales a neuronas dopaminérgicas.

También resulta de interés explorar la posibilidad de inducir transdiferenciación directamente en el tejido neural para su regeneración y reparación *in situ*. De esta manera podría ser posible utilizar células madre neurales inducidas para desarrollar nuevos abordajes terapéuticos para trastornos neurodegenerativos. Sin embargo, existe evidencia de que las células madre neurales son más proclives a diferenciarse en células gliales que en neuronas funcionales después del trasplante [99,100], lo que constituye una desventaja para la terapia de reemplazo de neuronas en enfermedades neurodegenerativas. En tal sentido, existe un tipo de célula precursora de mayor promesa, los progenitores dopaminérgicos, que, aunque están más comprometidos que las células madre neurales, no son neuronas terminalmente diferenciadas. Recientemente, Kim et al [101] demostraron que los fibroblastos de ratón pueden ser reprogramados directamente en progenitores dopaminérgicos específicos del mesencéfalo a través de la expresión transitoria de los cuatro genes de Yamanaka. Este estudio demuestra la factibilidad de inducir una alteración directa del destino celular de los fibroblastos a progenitores neurales específicos a través de la estrategia de reprogramación directa mediada por factores de pluripotencia, y provee una ruta novedosa para obtener progenitores útiles para potenciales terapias y estudios sobre enfermedad de Parkinson y otras enfermedades neurológicas.

3.7. Potencial terapéutico de la reprogramación celular para la enfermedad de Alzheimer

Los estadios iniciales de la enfermedad de Alzheimer están caracterizados por una pérdida sustancial temprana de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal, que conduce a déficits en el aprendizaje y la memoria espacial. En consecuencia, el reemplazo de neuronas colinérgicas

constituye un objetivo terapéutico relevante. Recientemente se ha demostrado que las neuronas colinérgicas pueden ser derivadas de células madre embrionarias humanas [102]. También se ha demostrado que pueden generarse neuronas glutamatérgicas funcionales mediante reprogramación de fibroblastos de piel de individuos normales y familiares de pacientes con enfermedad de Alzheimer [103]. En una estrategia diferente, se utilizaron forskolina y dorsomorfina para activar el factor de transcripción neurogenina 2 (NGN2) con el fin de convertir en forma directa fibroblastos de pulmón fetal humano en neuronas colinérgicas, con una pureza mayor que el 90% y una eficiencia de hasta un 99% de células expresando NGN2. Estas neuronas colinérgicas humanas inducidas muestran propiedades electrofisiológicas de neuronas maduras y exhiben características de neuronas motoras. La adición de SOX11 a la combinación forskolina-dorsomorfina permite la eficiente conversión de fibroblastos posnatales y adultos de individuos sanos y pacientes con la enfermedad de Alzheimer a neuronas colinérgicas [70].

Los progenitores neurales restringidos, también conocidos como neuroblastos, constituyen un tipo celular de transición que se encuentra en un estadio intermedio entre células progenitoras neurales multipotentes y neuronas terminalmente diferenciadas. Estos progenitores neurales restringidos poseen capacidad de autorrenovación y migración en el sistema nervioso [104]. Pueden diferenciarse a neuronas más fácilmente que a células gliales *in vivo* e *in vitro* [105], lo cual constituye una gran ventaja para la terapia celular de patologías como la enfermedad de Alzheimer. Cuando se inyectan en la zona subventricular, los progenitores neurales restringidos pueden migrar extensamente e integrarse en diferentes regiones del cerebro, para luego diferenciarse en varios subtipos de neuronas, y contribuir a la plasticidad y reparación de este órgano [104]. Desafortunadamente, es difícil obtener progenitores neurales restringidos altamente purificados a partir de tejido nervioso normal [106], lo cual limita su disponibilidad para investigación o eventuales aplicaciones que requieran un número relativamente elevado de células. Recientemente se ha demostrado que mediante el uso de solamente tres factores definidos, SOX2, C-MYC y BRN2 o BRN4, se pueden convertir fibroblastos fetales humanos en progenitores neurales restringidos inducidos humanos [107]. Estos progenitores neurales humanos restringidos exhiben características neuronales distintivas, incluyendo la capacidad de autorrenovación, la expresión de múltiples marcadores neuronales, una morfología propia de las neuronas y un perfil transcripcional neuronal. Podrían diferenciarse en varios tipos de neuronas terminales con sus correspondientes propiedades funcionales de membrana, pero no en células gliales. Por tanto, la conversión directa de progenitores neurales restringidos inducidos humanos a partir de células somáticas con una alta eficiencia puede proporcionar una nueva fuente de células para estudios de desarrollo neuronal, al igual que para terapias de reemplazo celular de enfermedades degenerativas, como la de Alzheimer, Parkinson y Huntington.

La reprogramación celular también está siendo utilizada para el modelado *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer. Las células madre pluripotentes inducidas derivadas de pacientes con Alzheimer familiar fueron obtenidas por primera vez por Yagi et al [108], quienes confirmaron que la producción del péptido altamente tóxico A β 42 se encuentra aumentada en todas las líneas celulares obtenidas. Además, las neuronas derivadas de estas células madre pluripotentes inducidas portadoras de mutaciones, obtenidas de pacientes con Alzheimer, responden marcadamente a moduladores e inhibidores de la γ -secretasa, lo que demuestra que dichas neuronas poseen un potencial significativo en el descubrimiento de fármacos para la enfermedad de Alzheimer. En otro estudio, neuronas derivadas de células madre pluripotentes inducidas que se generaron a partir de individuos con Alzheimer esporádico o familiar, esta última causada por la duplicación del gen *app*, evidenciaron niveles significativamente elevados de A β 40 [109]. Este estudio también demostró otras características patológicas de las neuronas derivadas de pacientes con Alzheimer, incluyendo un incremento de tau fosforilada y de su actividad cinasa (GSK). Existe también evidencia de que las neuronas derivadas de células madre pluripotentes obtenidas de pacientes con Alzheimer exhiben una mayor vulnerabilidad a la muerte celular mediada por glutamato [110], y que la acumulación de oligómeros A β induce estrés oxidativo que, a su vez, conduce a apoptosis [111,112]. También se demostró que células neurales derivadas de un paciente con Alzheimer esporádico y de otro paciente portador de la mutación patógena APP-E693D producen acumulación intracelular de oligómeros A β [111].

Utilizando una línea celular macrófago-símil derivada de células madre pluripotentes inducidas, a la que se les incorporó el gen de la neprilisina-2 (NEP2), una enzima proteolítica que degrada los péptidos amiloides A β , se logró reducir los niveles de péptido soluble A β *in vitro*. Cuando estas células macrófago-símil transgénicas se inyectaron en el cerebro de ratones transgénicos que producen el amiloide A β , se observó una importante disminución de la concentración de dichos péptidos en el fluido intersticial cerebral de los ratones [113].

Al margen de estos primeros avances específicos hacia la aplicación de la reprogramación celular al tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, merecen mencionarse avances más generales que resultan de una transcendencia difícil de exagerar en relación con la comprensión y el eventual tratamiento de enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento. En un estudio reciente en el que se utilizaron células de donantes humanos de un rango etario de 0 a 89 años, se demostró que cuando se transdiferenciaban fibroblastos cutáneos a neuronas inducidas, el perfil transcripcional de las neuronas inducidas a partir de fibroblastos de individuos añosos coincidía con el perfil transcripcional de los fibroblastos de ese donante. Por el contrario, si los fibroblastos de donantes ancianos se reprogramaban a células madre pluripotentes inducidas y éstas se diferenciaban a neuronas, dichas neuronas poseían perfiles transcripcionales correspondientes a células jóvenes, es decir, que la desdiferenciación de las células borraba los

rasgos epigenéticos asociados a la vejez y permitía generar neuronas rejuvenecidas [114]. Este hallazgo abre un prometedor horizonte terapéutico en relación con las enfermedades neurológicas asociadas a la edad, en especial la de Alzheimer.

4. Consideraciones finales

El incremento de la población anciana es un fenómeno prácticamente universal. En consecuencia, la incidencia de patologías neurológicas (y otras) relacionadas con la edad, como la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer, se está transformando en un problema de significativo impacto tanto médico como económico, el cual es exacerbado por la exposición de la población general a altos niveles de contaminantes ambientales. En este contexto, la investigación y el desarrollo de nuevos abordajes terapéuticos, como la terapia con células madre, podrían abrir nuevos horizontes para el tratamiento de estas devastadoras patologías. En los últimos años, la reprogramación celular está emergiendo como una poderosa tecnología que promete hacer posible la implementación de la medicina regenerativa personalizada para enfermedades neurodegenerativas. Parece, por tanto, plausible mantener la hipótesis de que, en un futuro no muy distante, una tecnología de reprogramación celular madura nos brindará medios efectivos para restaurar funcionalmente el cerebro envejecido.

5. Bibliografía

1. Grothe M, Heinsen H, Teipel SJ. Atrophy of the cholinergic basal forebrain over the adult age range and in early stages of Alzheimer's disease. *Biol Psych* 2011; 71: 805-13.
2. Fischer W, Chen KS, Gage FH, Bjorklund A. Progressive decline in spatial learning and integrity of forebrain cholinergic neurons in rats during aging. *Neurobiol Aging* 1992; 13: 9-23.
3. Gaillard A, Jaber M. Rewiring the brain with cell transplantation in Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 2011; 34: 124-33.
4. Sánchez HL, Silva LB, Portiansky EL, Herenu CB, Goya RG, Zuccolilli GO. Dopaminergic mesencephalic systems and behavioral performance in very old rats. *Neuroscience* 2008; 154: 1598-606.
5. Rudow G, O'Brien R, Savonenko AV, Resnick SM, Zonderman AB, Pletnikova O. Morphometry of the human substantianigra in ageing and Parkinson's disease. *ActaNeuropathol* 2008; 115: 461-70.
6. Karussis D, Petrou P, Kassis I. Clinical experience with stem cells and other cell therapies in neurological diseases? *J NeuroSci* 2013; 324: 1-9.
7. Lee HJ, Lee JK, Lee H, Shin JW, Carter JE, Sakamoto T, et al. The therapeutic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2010; 481: 30-5.
8. Lunn JS, Sakowski SA, Federici T, Glass JD, Boulis NM, Feldman EL, et al. Stem cell technology for the study and treatment of motor neuron diseases. *Reg. Med* 2011; 6: 201-13.
9. Moghadam FH, Alaie H, Karbalaie K, Tanhaei S, Nasr Esfahani MH, Baharvand H. Transplantation of primed or unprimed mouse embryonic stem cell derived neural precursor cells improves cognitive function in Alzheimerian rats. *Differentiation* 2009; 78: 59-68.
10. Politis M, Lindvall O. Clinical application of stem cell therapy in Parkinson's disease. *BMC Med* 2012; 10: 1-7.

11. Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, Hedlund E, Fu D, Soldner F, et al. Neurons derived from re-programmed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 5856-61.
12. Xuan AG, Luo M, Ji WD, Long DH. Effects of engrafted neural stem cells in Alzheimer's disease rats. *Neurosci Lett* 2009; 450: 167-71.
13. Nandoe Tewarie RS, Hurtado A, Bartels RH, Grotenhuis A, Oudega M. Stem cell-based therapies for spinal cord injury. *J Spinal Cord Med* 2009; 32: 105-14.
14. Inaba M, Yamashita YM. Asymmetric Stem Cell Division: Precision for Robustness. *Cell Stem Cell* 2012; 11: 461-9.
15. Brittan M, Wright NA. Stem cell in gastrointestinal structure and neoplastic development. *Gut* 2004; 53: 899-910.
16. Lavker RM, Tseng SC, Sun TT. Corneal epithelial stem cells at the limbus: looking at some old problems from a new angle. *Exp Eye Res* 2004; 78: 433-46.
17. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-7.
18. Mummery C. Induced pluripotent stem cells –a cautionary note. *N Engl J Med* 2012; 364: 2160-2.
19. Boiani M, Schöler HR. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 872-84.
20. Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 2001; 19: 193-204.
21. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* 2004; 8: 301-16.
22. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-7.
23. Grove JE, Bruscia E, Krause DS. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells* 2004; 22: 487-500.

24. Kumar S, Chanda D, Ponnazhagan S. Therapeutic potential of genetically modified mesenchymal stem cells. *Gene Ther* 2008; 15: 711-5.
25. Zhang H, Huang Z, Xu Y, Zhang S. Differentiation and neurological benefit of the mesenchymal stem cells transplanted into the rat brain following intracerebral hemorrhage. *Neurol Res* 2006; 28: 104-12.
26. Crigler L, Robey RC, Asawachaicharn A, Gaupp D, Phinney DG. Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neuritogenesis. *Exp Neurol* 2006; 198: 54-64.
27. Munoz JR, Stoutenger BR, Robinson AP, Spees JL, Prockop DJ. Human stem/progenitor cells from bone marrow promote neurogenesis of endogenous neural stem cells in the hippocampus of mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 18171-6.
28. Yoo SW, Kim SS, Lee SY, Lee HS, Kim HS, Lee YD, et al. Mesenchymal stem cells promote proliferation of endogenous neural stem cells and survival of newborn cells in a rat stroke model. *Exp Mol Med* 2008; 40: 387-97.
29. Ganat YM, Calder EL, Kriks S, Nelander J, Tu EY, Jia F, et al. Identification of embryonic stem cell-derived midbrain dopaminergic neurons for engraftment. *J Clin Invest* 2012; 122: 2928-39.
30. Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, et al. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 2002; 418: 50-6.
31. Rodríguez-Gómez JA, Lu JQ, Velasco I, Rivera S, Zaghbi SS, Liow SS, et al. Persistent dopamine functions of neurons derived from embryonic stem cells in a rodent model of Parkinson disease. *Stem Cells* 2007; 25: 918-28.
32. Bjorklund LM, Sánchez-Pernaute R, Chung S, Anderson T, Chen IY, McNaught K, et al. Embryonic stem cell develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 2344-9.
33. Nandy SB, Mohanty SI, Singh M, Behari M, Airan B. Fibroblast growth factor-2 alone as an efficient inducer for differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into dopaminergic neurons. *J Biomed Sci* 2014; 21: 83-92.

34. Ko TL, Fu YY, Shih YH, Lin YH, Ko MH, Fu TW, et al. A high efficiency induction of dopaminergic cells from human umbilical mesenchymal stem cells for the treatment of hemiparkinsonian rats. *Cell Transplant* 2014; Oct 6. [Epub ahead of print].
35. Tfilin M, Sudai E, Merenlender A, Gispan I, Yadid G, Turgeman G. Mesenchymal stem cells increase hippocampal neurogenesis and counteract depressive-like behavior. *Mol Psychiatry* 2010; 15: 1164-75.
36. Dezawa M, Kanno H, Hoshino M, Cho H, Matsumoto M, Itokazu Y, et al. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest* 2004; 113: 1701-10.
37. Venkataramana NK, Kumar SK, Balaraju S, Radhakrishnan RC, Bansal A, Dixit A, et al. Open-labeled study of unilateral autologous bone-marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in Parkinson's disease. *Transl Res* 2010; 155: 62-70.
38. Naaldijk Y, Jäger C, Fabian C, Leovsky C, Blüher A, Rudolph L, et al. Effect of systemic transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on neuropathology markers in APP/PS1 Alzheimer mice. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2016; Feb 26 [Epub ahead of print].
39. Oh SH, Kim HN, Park HJ, Shin JY, Lee PH. Mesenchymal stem cells increase hippocampal neurogenesis and neuronal differentiation by enhancing the wnt signaling pathway in an Alzheimer's disease model. *Cell Transpl* 2015; 24: 1097-109.
40. Shin JY, Park HJ, Kim HN, Oh SH, Bae JS, Ha HJ, et al. Mesenchymal stem cells enhance autophagy and increase β -amyloid clearance in Alzheimer disease models. *Autophagy* 2014; 10: 32-44.
41. Kim JY, Kim DH, Kim JH, Lee D, Jeon HB, Kwon SJ, et al. Soluble intracellular adhesion molecule-1 secreted by human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell reduces amyloid- β plaques. *Cell Death Differ* 2012; 19: 680-91.
42. Kim JY, Kim DH, Kim DS, Kim JH, Jeong SY, Jeon HB, et al. Galectin-3 secreted by human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells reduces amyloid-beta42 neurotoxicity in vitro. *FEBS Lett* 2010; 584: 3601-8.
43. Kim HJ, Seo SW, Chang JW, Lee JI, Kim CH, Chin J, et al. Stereotactic brain injection of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells in patients with Alzheimer's disease

- dementia: A phase 1 clinical trial. *Alzheimer's & Dementia Transl Res Clin Interv* 2015; 1: 95-102.
44. Waldau B, Shetty AK. Behavior of neural stem cells in the Alzheimer brain. *CMLS* 2008; 65: 2372-84.
45. Rivera FJ, Siebzehnruhl FA, Kandasamy M, Couillard-Despres S, Caioni M, Poehler AM, et al. Mesenchymal stem cells promote oligodendroglial differentiation in hippocampal slice cultures. *Cell Physiol Biochem* 2009; 24: 317-24.
46. Blurton-Jones M, Kitazawa M, Martinez-Coria H, Castello NA, Muller FJ, Loring JF, et al. Neural stem cells improve cognition via BDNF in a transgenic model of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 13594-9.
47. Gurdon JB. From nuclear transfer to nuclear reprogramming: the reversal of cell differentiation. *Ann Rev Cell Dev Biol* 2006; 22: 1-22.
48. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; 385: 810-3.
49. Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 1987; 51: 987-1000.
50. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663-76.
51. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 13: 861-72.
52. Yamashita JK. ES and iPS cell research for cardiovascular regeneration. *Exp Cell Res* 2010; 316: 2555-9.
53. Gepstein L. Derivation and potential applications of human embryonic stem cells. *Circ Res* 2002; 91: 866-76.
54. Patel M, Yang S. Advances in reprogramming somatic cells to induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rev* 2010; 6: 367-80.

55. Sancho-Martínez I, Baek SH, Izpisua Belmonte JC. Lineage conversion methodologies meet the reprogramming toolbox. *Nat Cell Biol* 2012; 14: 892-9.
56. Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* 2008; 455: 627-32.
57. Ieda M, Fu DJ, Delgado-Olguin P, Vedantham V, Hayashi Y, Bruneau BG, Srivastava D. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 2010; 142: 375-86.
58. Kim J, Su S, Wang H, Cheng AW, Cassady JP, Lodato MA, et al. Functional integration of dopaminergic neurons directly converted from mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 2011; 9: 413-9.
59. Kim J, Efe JA, Zhu S, Talantova M, Yuan X, Wang S, et al. Direct reprogramming of mouse fibroblasts to neural progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 7838-43.
60. Efe JA, Hilcove S, Kim J, Zhou H, Ouyang K, Wang G, et al. Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy. *Nat Cell Biol* 2011; 13: 215-22.
61. Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y, Südhof TC, Wernig M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 2010; 463: 1035-41.
62. Pang ZP, Yang N, Vierbuchen T, Ostermeier A, Fuentes DR, Yang TQ, et al. Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature* 2011; 476: 220-3.
63. Son EY, Ichida JK, Wainger BJ, Toma JS, Rafuse VF, Woolf CJ, et al. Conversion of mouse and human fibroblasts into functional spinal motor neurons. *Cell Stem Cell* 2011; 9: 205-18.
64. Pfisterer U, Kirkeby A, Torper O, Wood J, Nelander J, Dufour A, et al. Direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 10343-8.
65. Soufi A, Donahue G, Zaret KS. Facilitators and impediments of the pluripotency reprogramming factors' initial engagement with the genome. *Cell* 2012; 151: 994-1004.
66. Soufi A, Garcia MF, Jaroszewicz A, Osman N, Pellegrini M, Zaret KS. Pioneer transcription factors target partial DNA motifs on nucleosomes to initiate reprogramming. *Cell* 2015; 161: 555-68.

67. Wapinski OL, Vierbuchen T, Qu K, Lee QY, Chanda S, Fuentes DR, et al. Hierarchical mechanisms for direct reprogramming of fibroblasts to neurons. *Cell* 2013; 155: 621-35.
68. Castro DS, Guillemot F. Old and new functions of proneural factors revealed by the genome-wide characterization of their transcriptional targets. *Cell Cycle* 2011; 10: 4026-31.
69. Marro S, Pang ZP, Yang N, Tsai MC, Qu K, Chang HY, et al. Direct lineage conversion of terminally differentiated hepatocytes to functional neurons. *Cell Stem Cell* 2011; 9: 374-82.
70. Liu ML, Zang T, Zou Y, Chang JC, Gibson JR, Huber KM, et al. Small molecules enable neurogenin 2 to efficiently convert human fibroblasts into cholinergic neurons. *Nat Commun* 2013; 4: 2183-201.
71. Vadodaria KC, Mertens J, Paquola A, Bardy C, Li X, Jappelli R, et al. Generation of functional human serotonergic neurons from. *Mol Psych* 2015; 21: 49-61.
72. Lau S, Ottosson DR, Jakobsson J, Parmar M. Direct neural conversion from human fibroblasts using self-regulating and nonintegrating viral vectors. *Cell reports* 2014; 9: 1673-80.
73. Chambers SM, Studer L. Cell fate plug and play: direct reprogramming and induced pluripotency. *Cell* 2011; 145: 827-30.
74. Ladewig J, Mertens J, Kesavan J, Doerr J, Poppe D, Glaue F, et al. Small molecules enable highly efficient neuronal conversion of human fibroblasts. *Nat Meth* 2012; 9: 575-8.
75. Zhao P, Zhu T, Lu X, Zhu J, Li L. Neurogenin 2 enhances the generation of patient-specific induced neuronal cells. *Brain Res* 2015; 1615: 51-60.
76. Lujan E, Chanda S, Ahlenius H, Sudhof TC, Wernig M. Direct conversion of mouse fibroblasts to self-renewing, tripotent neural precursor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 2527-32.
77. Thier M, Wörsdörfer P, Lakes YB, Gorris R, Herms S, Opitz T, et al. Direct conversion of fibroblasts into stably expandable neural stem cells. *Cell Stem Cell* 2012; 10: 473-9.
78. Ring KL, Tong LM, Balestra ME, Javier R, Andrews-Zwilling Y, Li G, et al. Direct reprogramming of mouse and human fibroblasts into multipotent neural stem cells with a single factor. *Cell Stem Cell* 2012; 11: 100-9.

79. Sheng C, Zheng Q, Wu J, Xu Z, Wang L, Li W, et al. Direct reprogramming of Sertoli cells into multipotent neural stem cells by defined factors. *Cell Res* 2012; 22: 208-18.
80. Meyer S, Wörsdörfer P, Günther K, Thier M, Edenhofer F. Derivation of adult human fibroblasts and their direct conversion into expandable neural progenitor cells. *J Vis Exp* 2015; 101: e52831.
81. Han DW, Tapia N, Hermann A, Hemmer K, Höing S, Araúzo-Bravo MJ, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into neural stem cells by defined factors. *Cell Stem Cell* 2012; 10: 465-72.
82. Kim YJ, Lim H, Li Z, Oh Y, Kovlyagina I, Choi IY, et al. Generation of multipotent induced neural crest by direct reprogramming of human postnatal fibroblasts with a single transcription factor. *Cell Stem Cell* 2014; 15: 497-506.
83. Yu KR, Shin JH, Kim JJ, Koog MG, Lee JY, Choi SW, et al. Rapid and efficient direct conversion of human adult somatic cells into neural stem cells by HMGA2/let-7b. *Cell Reports* 2015; 10: 441-52.
84. Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin, I, et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 2009; 324: 797-801.
85. Okita K, Matsumura Y, Sato Y, Okada A, Morizane A, Okamoto S, et al. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Meth* 2011; 8: 409-12.
86. Kim SM, Kim JW, Kwak TH, Park SW, Kim KP, Park H, et al. Generation of Integration-free Induced Neural Stem Cells from Mouse Fibroblasts. *J Biol Chem* 2016; 291: 14199-212.
87. Yoo AS, Sun AX, Li L, Shcheglovitov A, Portmann T, Li Y, et al. MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons. *Nature* 2011; 476: 228-31.
88. Ambasudhan R, Talantova M, Coleman R, Yuan X, Zhu S, Lipton SA, et al. Direct reprogramming of adult human fibroblasts to functional neurons under defined conditions. *Cell Stem Cell* 2011; 9: 113-8.
89. Xue Y, Ouyang K, Huang J, Zhou Y, Ouyang H, Li H, et al. Direct conversion of fibroblasts to neurons by reprogramming PTB-regulated micro-RNA circuits. *Cell* 2013; 152: 82-96.

90. Li X, Zuo X, Jing J, Ma Y, Wang J, Liu D, et al. Small-molecule-driven direct reprogramming of mouse fibroblasts into functional neurons. *Cell Stem Cell* 2015; 17: 195-203.
91. Hu W, Qiu B, Guan W, Wang Q, Wang M, Li W, et al. Direct conversion of normal and Alzheimer's disease human fibroblasts into neuronal cells by small molecules. *Cell Stem Cell* 2015; 17: 204-12.
92. Iwafuchi-Doi M, Zaret KS. Pioneer transcription factors in cell reprogramming. *Genes Dev* 2014; 28: 2679-92.
93. Caiazzo M, Dell'Anno MT, Dvoretzkova E, Lazarevic D, Taverna S, Leo D, et al. Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature* 2011; 476: 224-7.
94. Liu X, Li F, Stubblefield EA, Blanchard B, Richards TL, Larson GA, et al. Direct reprogramming of human fibroblasts into dopaminergic neuron-like cells. *Cell Res* 2012; 22: 321-32.
95. Oh SI, Park HS, Hwang I, Park HK, Choi KA, Jeong H, et al. Efficient reprogramming of mouse fibroblasts to neuronal cells including dopaminergic neurons; *Sci World J* 2014; 2014: 957548.
96. Wu J, Sheng C, Liu Z, Jia W, Wang B, Li M, et al. Lmx1a enhances the effect of iNSCs in a PD model. *Stem Cell Res* 2015; 14: 1-9.
97. Deng Q, Andersson E, Hedlund E, Alekseenko Z, Coppola E, Panman L, et al. Specific and integrated roles of Lmx1a, Lmx1b and Phox2a in ventral midbrain development. *Development* 2011; 138: 3399-408.
98. Andersson E, Tryggvason U, Deng Q, Friling S, Alekseenko Z, Robert B, et al. Identification of intrinsic determinants of midbrain dopamine neurons. *Cell* 2006; 124: 393-405.
99. Holmin S, Almqvist P, Lendahl U, Mathiesen T. Adult nestin-expressing subependymal cells differentiate to astrocytes in response to brain injury. *Eur J Neurosci* 1997; 9: 65-75.
100. Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisén J. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 1999; 96: 25-34.
101. Kim HS, Kim J, Jo Y, Jeon D, Cho YS. Direct lineage reprogramming of mouse fibroblasts to functional midbrain dopaminergic neuronal progenitors. *Stem Cell Res* 2014; 12: 60-8.

102. Bissonnette CJ, Lyass L, Bhattacharyya BJ, Belmadani A, Miller RJ, Kessler JA. The controlled generation of functional basal forebrain cholinergic neurons from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2011; 29: 802-11.
103. Qiang L, Fujita R, Yamashita T, Angulo S, Rhinn H, Rhee D, et al. Directed conversion of Alzheimer's disease patient skin fibroblasts into functional neurons. *Cell* 2011; 146: 359-71.
104. Yang H, Mujtaba T, Venkatraman G, Wu YY, Rao MS, Luskin MB. Region-specific differentiation of neural tube-derived neuronal restricted progenitor cells after heterotopic transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 13366-71.
105. Mo Z, Moore AR, Filipovic R, Ogawa Y, Kazuhiro I, Antic SD, et al. Human cortical neurons originate from radial glia and neuron-restricted progenitors. *J Neurosci* 2007; 27: 4132-45.
106. Mayer-Proschel M, Kalyani AJ, Mujtaba T, Rao MS. Isolation of lineage-restricted neuronal precursors from multipotent neuroepithelial stem cells. *Neuron* 1997; 19: 773-85.
107. Zou Q, Yan Q, Zhong J, Wang K, Sun H, Yi X, et al. Direct conversion of human fibroblasts into neuronal restricted progenitors. *J Biol Chem* 2014; 289: 5250-60.
108. Yagi T, Ito D, Okada Y, Akamatsu W, Nihei Y, Yoshizaki T, et al. Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells. *Hum Mol Genet* 2011; 20: 4530-9.
109. Israel MA, Yuan SH, Bardy C, Reyna SM, Mu Y, Herrera C, et al. Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature* 2012; 482: 216-20.
110. Duan L, Bhattacharyya BJ, Belmadani A, Pan L, Miller RJ, Kessler JA. Stem cell derived basal forebrain cholinergic neurons from Alzheimer's disease patients are more susceptible to cell death. *Mol Neurodegener* 2014; 9: 3-16.
111. Kondo T, Asai M, Tsukita K, Kutoku Y, Ohsawa Y, Sunada Y, et al. Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A β and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell* 2013; 12: 487-96.
112. Nishitsuji K, Tomiyama T, Ishibashi K, Ito K, Teraoka R, Lambert MP, et al. The E693 Δ mutation in amyloid precursor protein increases intracellular accumulation of amyloid β oligomers and causes endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in cultured cells. *Am J Pathol* 2009; 174: 957-69.

113. Takamatsu K, Ikeda T, Haruta M, Matsumura K, Ogi Y, Nakagata N, et al. Degradation of amyloid beta by human induced pluripotent stem cell-derived macrophages expressing neprilysin-2. *Stem Cell Res* 2014; 13: 442–53. *Stem Cell Res* 2014; 13: 442-53.

114. Mertens J, Paquola AC, Ku M, Hatch E, Böhnke L, et al. Directly reprogrammed human neurons retain aging-associated transcriptomic signatures and reveal age-related nucleocytoplasmic defects. *Cell Stem Cell* 2015; 17: 705-18.