

Caracterización molecular de células progenitoras del parénquima subcortical cerebral humano adulto

Molecular characterization of progenitor cells from subcortical parenchyma of adult human brain

Oliver-De La Cruz J¹, Carrión-Navarro J¹, Romaguera-Ros M¹, Gutiérrez-Martín A², Escobedo-Lucea C¹, Ayuso-Sacido A¹, García-Verdugo JM¹

¹ Laboratorio de Morfología Celular, Unidad Mixta Centro de Investigación Príncipe Felipe y Universidad de Valencia, CIBERNED, Valencia. ² Departamento de Neurocirugía, Hospital Universitario La Fe de Valencia. Valencia. España.

Esta investigación ha sido financiada por FUNDACIÓN MAPFRE

Resumen

Objetivo: Caracterizar los patrones de expresión de marcadores de indiferenciación y diferenciación y las alteraciones morfológicas de las células progenitoras procedentes de parénquima cerebral humano adulto a lo largo de los pases en cultivo, evaluando su potencial para ser empleadas como fuente de progenitores de oligodendrocitos.

Materiales y Métodos: Las células progenitoras se aislaron a partir de dos muestras obtenidas de pacientes sometidos a exéresis temporal por epilepsia. Para comprobar la evolución de los niveles de expresión de marcadores moleculares de diferenciación e indiferenciación en dichas células, se procedió a la extracción de ARNm en cada pase y a su estudio mediante RT-PCR. Se llevó a cabo un análisis de su capacidad proliferativa mediante inmunocitoquímica y un estudio de la evolución morfológica mediante microscopía.

Resultados: Las células mostraron capacidad proliferativa durante los primeros pases en cultivo. Además, detectamos la expresión de marcadores de indiferenciación y diferenciación temprana a oligodendrocitos.

Conclusión: Las células progenitoras aisladas de parénquima subcortical de cerebro humano pueden ser susceptibles de diferenciación a oligodendrocitos maduros, aunque en protocolos de diferenciación sólo deberían utilizarse pases tempranos.

Palabras clave:

Oligodendrocitos, regeneración, cerebro, epilepsia.

Abstract

Objective: characterize the behavior of progenitor cells isolated from subcortical parenchyma of human brain in culture. We have analyzed the changes in expression patterns of differentiation/undifferentiation markers as well as cell morphology along the passages and evaluated the potential to be further used as oligodendrocyte progenitors source.

Material and Methods: We isolated progenitor cells from two different samples of subcortical parenchyma human brain of patients suffering from epilepsy. Cells were kept in culture until they became quiescent/senescent. Every other passages RNAs were isolated and checked for the expression of differentiation and undifferentiation markers by using RT-PCR. Proliferation was also addressed by RT-PCR and immunocytochemistry. We carried out cell morphology studies on semithin and ultrathin sections of cells.

Results: We observed decreasing proliferative capacity of both two cell lines which became quiescent/senescent around passages 8-10. We detected the expression of either undifferentiation or early neural and oligodendrocytes differentiation markers.

Conclusions: As for the expression of molecular markers, progenitor cells isolated from subcortical parenchyma of human brain have the potential to differentiate into mature oligodendrocytes.

Key words:

Oligodendrocyte, Regeneration, brain, epilepsy.

Correspondencia

A. Ayuso-Sacido, PhD
Dpto. de Morfología Celular. Centro de Investigación Príncipe Felipe.
Avda. Autopista del Saler 16. 46012, Valencia (Spain)
aayuso@cipf.es

Introducción

Un número importante de enfermedades neurodegenerativas que afectan al sistema nervioso central, cursan con pérdida de mielina. Dentro de este grupo de patologías, la esclerosis múltiple (EM) es, con excepción de los traumatismos, la causa más frecuente de discapacidad neurológica en adultos jóvenes [1][2]. La evolución normal de la enfermedad, junto con la observación de remielinización espontánea en lesiones inflamatorias agudas en animales de experimentación [3], hacen de la EM una de las enfermedades neurológicas candidatas para la utilización de tratamientos alternativos basados en terapia celular [4-6]. Varios tipos celulares podrían ser candidatos para implantarse en las placas escleróticas [6]. Pueden obtenerse oligodendrocitos mielinizantes por diferenciación de células madre embrionarias, progenitores de oligodendrocitos de origen fetal, células de Schwann aisladas a través de biopsias de nervios periféricos, glía olfatoria, células madre neurales (NSC) o progenitoras adultas procedentes de la zona subventricular de los ventrículos laterales y progenitores de oligodendrocitos (OPC) que aparecen dispersos en la sustancia blanca del cerebro adulto [7-11]. En este sentido, las NSC y progenitoras adultas de cerebro humano son la opción más prometedora. Idealmente, procederían del propio sujeto, con lo que se evitaría además el rechazo inmunológico. Sin embargo, el principal problema con estos tipos celulares es disponer de un número de células suficientes para llevar a cabo los protocolos de expansión y diferenciación *in vitro*, previos a la reimplantación en el paciente. Además, es crítico poder identificar por medio de marcadores moleculares, los distintos estadios en el proceso de diferenciación hacia oligodendrocitos maduros y el contexto en el que estos eventos tienen lugar.

Trabajos previos [3][12][13] han demostrado que las células progenitoras procedentes del parénquima subcortical del cerebro humano adulto son capaces, inmediatamente después de ser aisladas, de diferenciarse a oligodendrocitos maduros y pueden sobrevivir y cobrar funcionalidad cuando son trasplantados en el cerebro de pequeños mamíferos. Dichas células son también capaces de proliferar *in vitro* durante periodos de tiempo prolongados, incluso después de haber sido criopreservadas y descongeladas, conservando su potencial para generar células que expresan marcadores neuronales [9][10]. A pesar de ello, se desconoce cuanto tiempo pueden mantenerse estas células en cultivo, así como su potencial de diferenciación a oligodendrocitos maduros. En el presente trabajo, demostramos que la capacidad proliferativa de células progenitoras de parénquima cerebral humano adulto subcultivadas *in vitro* disminuye hasta su entrada en quiescencia/senescencia en torno a pa-

ses 8-10. Del mismo modo, detectamos una reducción paulatina en la expresión de marcadores de indiferenciación y diferenciación temprana de oligodendrocitos a lo largo de los pases en cultivo, lo que es indicativo de su pérdida de potencial para generar oligodendrocitos maduros.

Materiales y métodos

Recogida de las muestras y procesado.

Las muestras de sustancia blanca fueron obtenidas de la exéresis hipocampal de dos pacientes epilépticos, que no mostraban evidencia de tumoración cerebral ni extracerebral, procedentes del Hospital La Fe, de Valencia, previo consentimiento informado. El estudio fue aprobado por la Comisión de Ética del Hospital La Fe de Valencia.

Las muestras fueron procesadas antes de las 6 horas siguientes a la extracción, siguiendo el protocolo [10] resumido en la Figura 1.

Cultivo celular

Las células obtenidas fueron resuspendidas en un medio definido compuesto por DMEM-F12, amino ácidos no esenciales (100 μ m), hepes (2 mM), D-Glucosa (30 mM) BSA (0,001%), sodio-piruvato (1mM) , L-glutamina (2 mM), N2 suplemento (1X), penicillina-estreptomicina-fungizona (1X) (Gibco-Invitrogen) e hidrocortisona (300 ng/ml) y tri-iodo-tironina (30 ng/ml) (Sigma). Los medios se suplementaron con bFGF (basic fibroblast growth factor) (10 ng/ml, Sigma) y EGF (epidermal growth factor) (10 ng/ml) (Sigma).

Cuando las células alcanzaban un crecimiento cercano a la confluencia, se procedía al subcultivo incubando con Triple Express (Invitrogen) durante 5 minutos a 37°C, se recogían y eran sembradas a una densidad de 2.000 células/cm² en frascos de 25 cm². Las células fueron subcultivadas, mediante este procedimiento, hasta su entrada en quiescencia/senescencia, lo cual ocurría entre los pases 8 y 10. En este sentido, consideramos pases tempranos del 1 al 5 y pases tardíos a partir del pase 5. El tiempo estimado entre pases, específico de cada muestra y de la densidad celular, oscilaba entre 15 y 30 días.

Extracción de ARN, síntesis de ADNc y ensayos de PCR.

Parte de las células obtenidas tras cada pase se destinó a la extracción de RNA con el RNeasy micro Kit® (QUIAGEN®), seguido de un tratamiento posterior con DNasa I (QUIAGEN®). A continuación, se realizó la síntesis de ADNc utilizando el High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit® (Applied Biosystems®). Utilizando el progra-

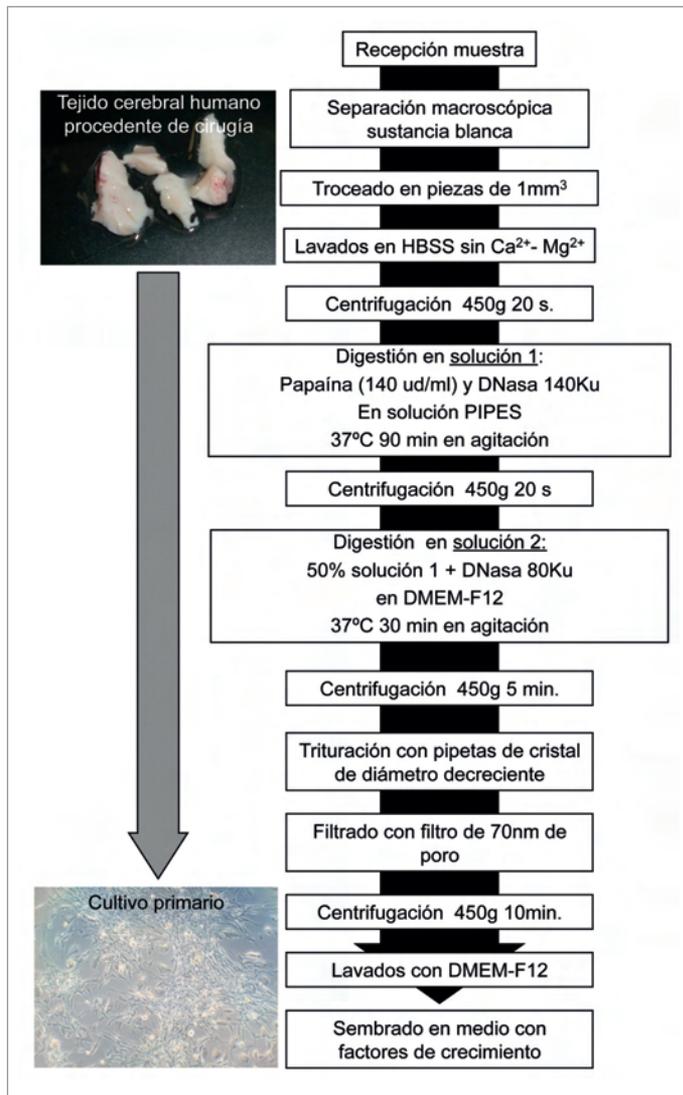


Fig. 1. Protocolo de aislamiento de células madre/precursoras neurales a partir de tejido cerebral humano.

ma Primer3 se diseñaron cebadores específicos para los distintos componentes de las rutas moleculares implicadas en diferenciación de oligodendrocitos, así como marcadores de indiferenciación y diferenciación hacia otras células de linaje neural. Tras comprobar la eficiencia y especificidad de los cebadores utilizando los controles adecuados en cada caso, se realizaron los ensayos de PCR (Paq5000 DNA Polymerase, Stratagene®) empleando ADNc procedentes de distintos países. Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en gel de Agarosa al 1,8%.

Inmunocitoquímica

Para comprobar el porcentaje de células en proliferación y su evolución, se realizó una tinción inmunocitoquímica

contra el marcador Ki67. Las células de ambas muestras para pases altos y bajos, se sembraron en placas recubiertas con poli-D-lisina y fueron mantenidas hasta alcanzar el 80% de confluencia. Posteriormente se fijaron con paraformaldehído al 4%. Se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) 0,1M y se procedió a la recuperación del antígeno mediante tampón citrato sódico 10 mM a pH 6. Después se incubaron 30 minutos en tampón de bloqueo (Triton 0,2%, suero de cabra al 5% en PBS 0'1M) y posteriormente se dejaron toda la noche con el anticuerpo primario (anti-Ki67 1:250, Dako). Al día siguiente, tras varios lavados en PBS 0,1M, se incubaron con anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 (1:500, Molecular Probes, Invitrogen) durante hora y media. Los núcleos se tiñeron con DAPI y las placas se montaron con ProLong Gold antifade reagent (Molecular Probes, Invitrogen). Se tomaron 10 fotografías correspondientes a 10 campos elegidos al azar dentro de cada pocillo y se analizaron un mínimo de 3 pocillos. Posteriormente se realizó un recuento de células totales y células Ki67+ en los campos seleccionados. Los resultados se expresaron como el porcentaje de células positivas con respecto al total de células.

Microscopía electrónica de transmisión

Tras su siembra, las células fueron fijadas con 3% de glutaraldehído en tampón fosfato (PB) 0,1M durante 30 minutos a temperatura ambiente y postfijadas en 2% de tetraóxido de osmio durante 2 horas. Tras un proceso de deshidratación se incluyeron en Araldita (Durcupan, Fluka). Se realizaron cortes semifinos de 1 µm y se tiñeron con azul de toluidina (Panreac, España) al 1%. Las fotografías se tomaron en un microscopio Nikon Eclipse 800. Posteriormente, a partir de los cortes semifinos se realizaron cortes ultrafinos (70nm) con una cuchilla de diamante, se tiñeron con citrato de plomo, y fueron examinados usando un microscopio electrónico modelo FEI Tecnai Spirit, con el fin de establecer posibles semejanzas y diferencias entre los pases más tempranos y tardíos de ambas líneas de cultivos primarios.

Resultados

Caracterización morfológica de las células progenitoras in vitro

Durante los primeros días de su siembra, los cultivos obtenidos presentaron un gran número de células diferenciadas sin capacidad proliferativa. Al cabo de una semana se observaron poblaciones clonales con capacidad proliferativa. Estas células presentan una morfología alargada con escaso citoplasma, núcleos grandes, cromatina laxa y nucleo-

los prominentes (Figura 2). Además, mostraron abundante citoesqueleto y ocasionales fibras de estrés y vesículas claras al microscopio electrónico (Figura 2). Durante los primeros pases no observamos diferencias significativas entre las dos muestras analizadas. A medida que aumentaron los pases en cultivo observamos un aumento paulatino de la relación citoplasma/núcleo (Figura 2). Además, aparecieron invaginaciones nucleares y un considerable aumento de fibras de estrés y vesículas claras. Estos cambios en la morfología fueron apreciables en pases más tempranos en la muestra 2.

Descenso de la tasa proliferativa a lo largo de los pases

El procesado de las muestras de sustancia blanca subcortical de cerebro humano adulto permitieron la obtención de

dos líneas celulares que fueron mantenidas en cultivo durante más de un año, incluyendo periodos de criopreservación mediante congelación en medio con DMSO.

La observación apuntó un descenso de la tasa proliferativa in vitro, de forma que en los pases altos, partiendo del mismo número de células iniciales, era necesario más tiempo para alcanzar una confluencia total, llegando un pase en el cual el cultivo entraba en quiescencia/senescencia y no progresaba.

Con objeto de cuantificar la evolución de la capacidad proliferativa de dichas células a lo largo de los pases en cultivo, se efectuó un análisis de la presencia de Ki67 mediante inmunocitoquímica (Figura 3). El recuento de células positivas indicó un descenso estadísticamente significativo en el porcentaje de células que seguían en fases activas del ciclo

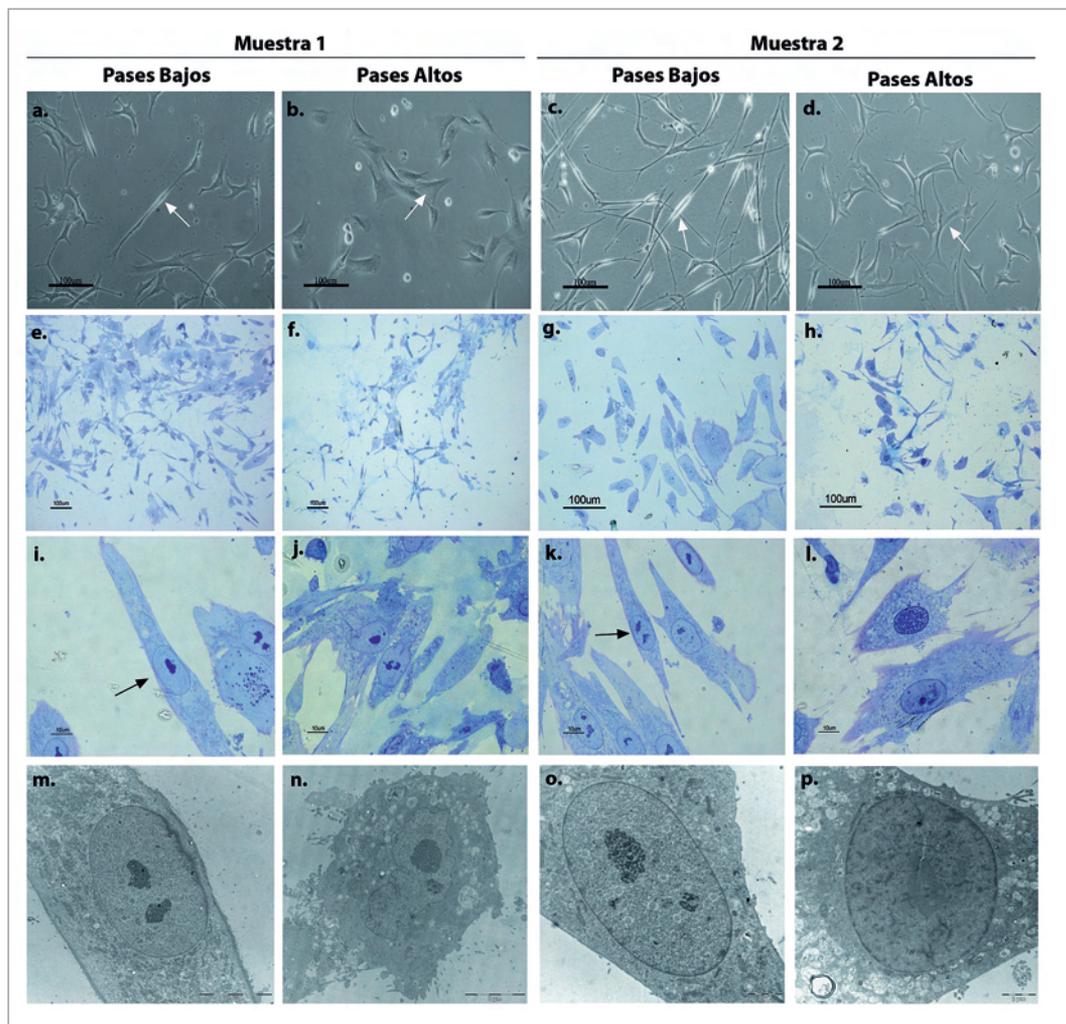


Fig. 2. Análisis morfológico de células progenitoras aisladas del parénquima subcortical durante los diferentes pases en cultivo hasta alcanzar la senescencia. Comparación entre pases bajos y pases altos de los dos cultivos. Microscopía óptica, durante su crecimiento in vitro (a-d, barra de escala = 100µm), en cortes semifinos (azul de toluidina) (e-h, barra de escala = 100µm) y (i-l, barra de escala = 10µm). Cortes ultrafinos en microscopio electrónico de transmisión (m-p) (m, barra de escala = 10µm; n, barra de escala = 6µm; n-p, barra de escala = 2µm).

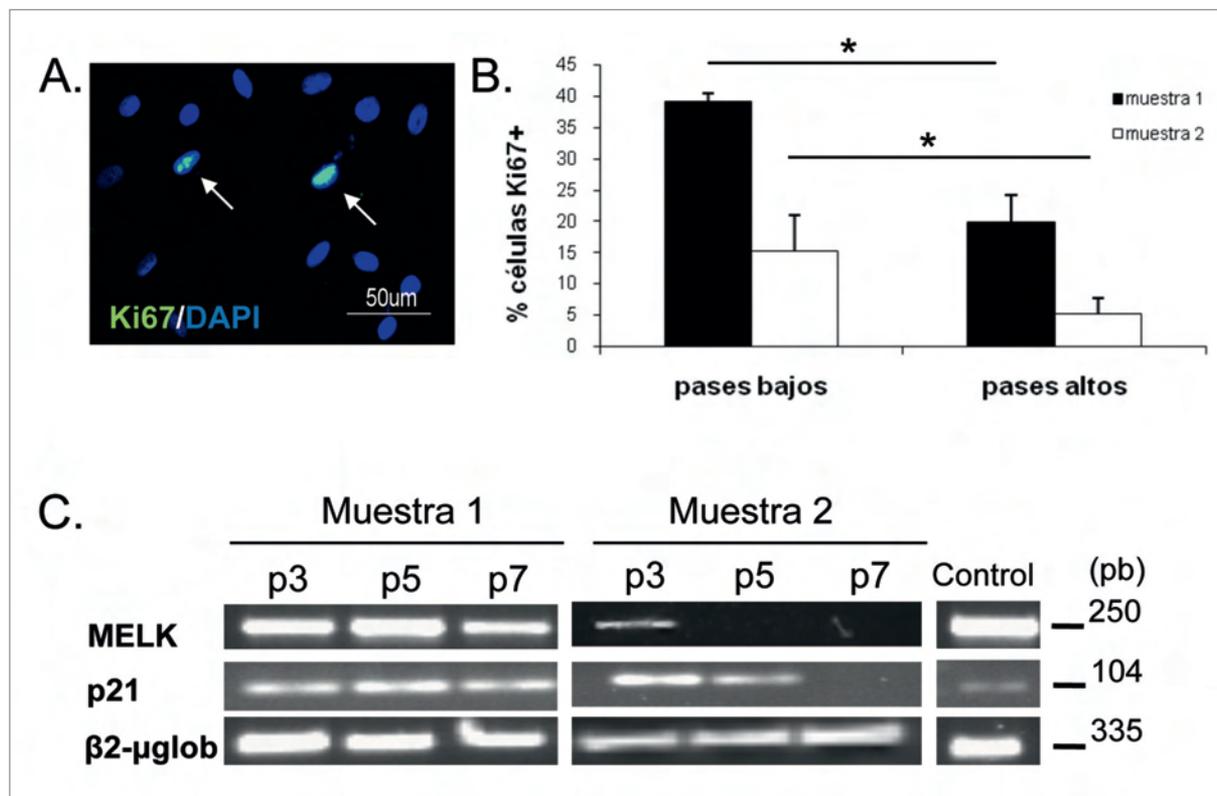


Fig. 3. Cuantificación de la capacidad proliferativa de células progenitoras aisladas del parénquima subcortical. A. Inmunocitoquímica contra Ki67 (flechas blancas: células positivas para Ki67). B. Histograma de células positivas para Ki67 según pases en cultivo. C. Análisis de expresión de los marcadores de proliferación p21 y MELK a lo largo de los 7 primeros pases en cultivo.

celular a lo largo de los pases, tanto para la muestra 1 (39,3% \pm 1,24 para pases bajos frente a 19,9% \pm 4,34 para pases altos) como para la muestra 2 (15,3% \pm 5,67 para pases bajos frente a 5,2% \pm 2,54 para pases altos) (Figura 3).

Con el mismo objetivo, se comprobó la presencia de marcadores de ciclo celular mediante RT-PCR. El empleo de esta técnica permitió detectar una pérdida de expresión del marcador Ki67 en ambas muestras, así como un descenso en la expresión de MELK. Además, en la muestra 2 se detectó una disminución de expresión de p21. Sin embargo, no se observaron cambios importantes en la expresión de otros marcadores como ciclina D1 (datos no mostrados) (Figura 3).

Pérdida de los marcadores de indiferenciación a lo largo de los pases

Con objeto de estudiar la identidad de las células proliferativas aisladas del parénquima subcortical de cerebro humano, diseñamos una colección de cebadores específicos para marcadores de indiferenciación de células madre neuronales y progenitores previamente descritos en la bibliografía tanto durante el desarrollo neural como en el cerebro

adulto. Aislamos ARNm procedente de las muestras cada dos pases en cultivo y estudiamos la expresión de dichos marcadores mediante RT-PCR. Observamos la presencia de ABCG2, Bmi-1, Nestina, Vimentina y Sox2 en ambas muestras, lo que confirmaba la existencia de una población de progenitores neurales en ellas. Así mismo, estudiamos la expresión de Musashi-1 (MSI1), Notch-1 y Nogina. Durante el desarrollo temprano del sistema nervioso MSI1 promueve la salida del ciclo celular y la diferenciación neuronal bloqueando la gliogénesis [14, 15], mientras que Notch está implicado en el mantenimiento de células madre neuronales y gliogénesis, [16, 17]. En este caso, observamos niveles altos de Notch y más reducidos de MSI1. Los niveles de expresión de Nogina fueron muy bajos en la muestra 1 y casi indetectables en la muestra 2. Finalmente, ampliamos el estudio de expresión a otros marcadores detectados previamente en progenitores neurales que podían aportarnos más información sobre la identidad de nuestras células. Así pues, encontramos altos niveles de expresión de CD44, niveles más bajos de CD90 y expresión muy débil en el caso de CD133, siendo casi indetectable en la muestra 2. En todos los casos los niveles de expresión de los marcadores

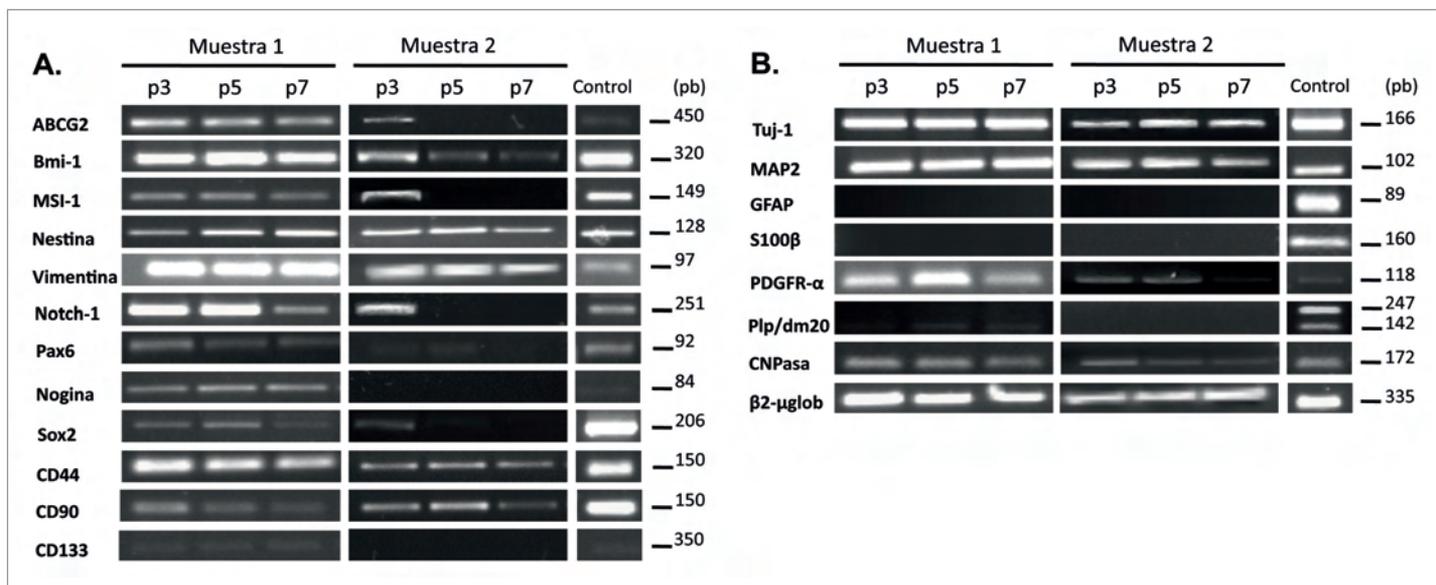


Fig. 4. Diferencias en los niveles de expresión de marcadores moleculares mediante RT-PCR durante el cultivo (A. Marcadores de indiferenciación. B. Marcadores de diferenciación a células neuronales, astrocitos y oligodendrocitos).

analizados se reducían en mayor o menor medida, con el aumento de los pases en cultivo. Este efecto era mucho más dramático en el caso de la muestra 2 (Figura 4).

Las células progenitoras obtenidas del parénquima subcortical expresan marcadores de linaje neuronal y oligodendroglial.

A continuación, nos preguntamos si la entrada en quiescencia/senescencia en pases altos podría ser consistente con una diferenciación de las células proliferativas. Para contestar a esta pregunta, realizamos un análisis de expresión de marcadores moleculares específicos de neurona, astrocitos y oligodendrocitos mediante RT-PCR a lo largo de todos los pases en cultivo hasta que se observaba el arresto de la proliferación en los cultivos.

En las dos muestras analizadas no se detectó la expresión de ninguno de los dos marcadores específicos de astrocitos utilizados en el estudio (GFAP y S100B). Sin embargo, ambas muestras presentaron niveles de expresión altos tanto de beta III tubulina como de MAP2, que no cambiaron significativamente a lo largo de los pases en cultivo (Figura 4).

Con respecto a la expresión de marcadores específicos del linaje oligodendroglial, ambas muestras presentaban el marcador de progenitores de oligodendrocitos PDGFR α , aunque sus niveles disminuían ligeramente a lo largo de los pases. Observamos además una tímida expresión de DM20 en la muestra 1, ausente en la muestra 2. Cuando estudiamos la expresión de marcadores tempranos en la diferenciación a oligodendrocitos, quedó evidenciada la presencia

de CNPasa en las dos muestras, que disminuía conforme aumentaban los pases (Figura 4). Sin embargo, no se detectó la expresión de los factores de transcripción Olig1 y Olig2, necesarios para la diferenciación oligodendroglial, ni de marcadores correspondientes a estadios finales de la diferenciación a oligodendrocitos maduros como MAG, MOG o MBP (datos no mostrados).

Discusión

Los resultados derivados del presente trabajo confirman la identidad de las células aisladas a partir de parénquima subcortical de cerebro humano como progenitores neurales [10]. Se ha postulado que dicha población de células progenitoras podría ser utilizada como fuente de oligodendrocitos en futuras terapias celulares de patologías desmielinizantes. Sin embargo, incrementar el número de células es fundamental para el éxito de cualquier terapia. En el presente estudio planteamos determinar el número máximo de pases que dichas células pueden permanecer en cultivo. Tal como se desprende de los resultados del presente trabajo, nuestra población celular no crece durante un número de pases elevados. Por el contrario, las células entran en quiescencia o senescencia entre los pases 8 y 10. El estudio morfológico indica que este proceso de arresto progresivo o de pérdida de la capacidad de división, vaya acompañado de una diferenciación estructural de la célula, con alteraciones nucleares, incremento de fibras de estrés y acúmulo de vesículas. En este sentido, las diferencias observadas entre las dos muestras pueden ser debidas tanto a

la localización específica dentro del cerebro del paciente como al manejo de las mismas.

Las células de ambas muestras presentaban expresión de marcadores descritos previamente en células madre neuronales, tanto de origen fetal como adultas, tales como Bmi, Sox-2, Nestin, Vimentina, ABCG2, CD90 y CD44 y niveles muy bajos de CD133, lo que confirmaba la presencia de poblaciones celulares progenitoras neuronales.

Los niveles de expresión de todos estos marcadores descienden a medida que aumentan los pases en cultivo. Sin embargo, en las células procedentes de la muestra 2, la caída en la expresión de los mismos fue más acentuada y tuvo lugar en pases más bajos. El progresivo descenso de expresión de marcadores de indiferenciación, junto con la pérdida de la capacidad multipotente, a lo largo de los pases en cultivo, se ha descrito previamente en células procedentes de cerebro fetal [18] y postmortem [19, 20].

Posteriormente analizamos la expresión de Musashi-1, Notch y Nogina. Durante el desarrollo temprano del sistema nervioso Musashi 1 (MSI1), junto con Ngns, promueve la salida del ciclo celular y la diferenciación neuronal, activando entre otros NeuroD y Matc3, bloqueando la gliogénesis [14][15]. Por otro lado, Notch está implicado en el mantenimiento de células madre neuronales y gliogénesis, y durante el desarrollo de mamíferos, se encuentra expresado en las zonas ventricular y subventricular, así como en neuroesferas en cultivo [16][17]. En un modelo murino con médula espinal dañada, células madre procedente de tejido fetal que sobre expresaban Nogina, fueron capaces de aumentar ligeramente la diferenciación neuronal y oligodendroglial [21]. Así pues la expresión de dichos marcadores puede influir significativamente en la determinación preferencial de progenitores neuronales hacia linajes específicos.

Nosotros observamos que MSI1 se expresa en todos los pases de la muestra 1 y en los primeros pases de la muestra 2, y lo mismo ocurre con la expresión de Notch-1, aunque con niveles de expresión significativamente más elevados. Además hay una expresión moderada de Nogina en la muestra1, prácticamente ausente en la muestra 2.

Cuando estudiamos la expresión de marcadores de diferenciación vimos la presencia de células que expresaban marcadores tempranos neuronales y oligodendrogliales. Sin embargo no pudieron detectarse marcadores específicos de astrocitos.

Ambos resultados sugieren la presencia de subclones dentro de nuestra población con diferente potencial para generar precursores neuronales y oligodendrogliales. La existencia de heterogeneidad es frecuente en poblaciones aisladas de tejido nervioso fetal y adulto [20][22].

Así pues, el análisis molecular junto con los estudios morfológicos, nos han permitido determinar la presencia de progenitores neuronales y comprobar la existencia de varias subpoblaciones celulares, dentro del cultivo primario obtenido de las diferentes muestras, con distinto potencial para dar lugar a progenitores neuronales y oligodendrogliales. Además hemos demostrado que dichas células presentan una capacidad de proliferación limitada en cultivo, con presencia de marcadores de indiferenciación durante los primeros pases en cultivo. Todo ello indica que la utilización de células progenitoras, aisladas de parénquima subcortical de muestras frescas de cerebro humano, puede ser un modelo inigualable para el estudio de los mecanismos de diferenciación desde progenitores de oligodendrocitos presentes en el cerebro humano adulto hasta oligodendrocitos maduros. Estos estudios nos ayudaran en el futuro a entender mejor el comportamiento de progenitores adultos *in vivo* e intentar modularlo en situaciones patológicas. ■

Agradecimientos

Al departamento de neurocirugía del Hospital la Fe de Valencia. Jorge Oliver de la Cruz es becario del programa FPU del Ministerio de Sanidad. Miriam Romaguera-Ros está contratada a cargo del programa de ayudas de FUNDACIÓN MAPFRE. El proyecto ha sido financiado en parte por FUNDACIÓN MAPFRE y por la Fundación Alicia Koplowitz.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pflieger CC, Flachs EM, Koch-Henriksen N. Social consequences of multiple sclerosis: clinical and demographic predictors - a historical prospective cohort study. *Eur J Neurol* 2010.
2. Koch-Henriksen N, Sorensen PS. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol* 2010; 9:520-32.
3. Scolding NJ, Franklin RJ. Remyelination in demyelinating disease. *Baillieres Clin Neurol* 1997; 6:525-48.
4. Zhao C, Zawadzka M, Roulois AJ, Bruce CC, Franklin RJ. Promoting remyelination in multiple sclerosis by endogenous adult neural stem/precursor cells: Defining cellular targets. *J Neurol Sci* 2008; 265:12-6.
5. Goldman SA, Lang J, Roy N, Schanz SJ, Sim FS, Wang S, et al. Progenitor cell-based myelination as a model for cell-based therapy of the central nervous system. *Ernst Schering Res Found Workshop* 2006; 60:195-213.

6. Rice C, Halfpenny C, Scolding N. Cell therapy in demyelinating diseases. *NeuroRx* 2004; 1:415-23.
7. Radtke C, Spies M, Sasaki M, Vogt PM, Kocsis JD. Demyelinating diseases and potential repair strategies. *Int J Dev Neurosci* 2007; 25:149-53.
8. Windrem MS, Nunes MC, Rashbaum WK, Schwartz TH, Goodman RA, McKhann G et al. Fetal and adult human oligodendrocyte progenitor cell isolates myelinate the congenitally dysmyelinated brain. *Nat Med* 2004; 10: 93-7.
9. Greenfield JP, Ayuso-Sacido A, Schwartz TH, Pannullo H, Souweidane M, Stieg PE et al. Use of human neural tissue for the generation of progenitors. *Neurosurgery*. 2008; 62: 21-37.
10. Ayuso-Sacido A, Roy NS, Schwartz TH, Greenfield JP, Bockvar JA. Long-term expansion of adult human brain subventricular zone precursors. *Neurosurg*. 2008; 62: 223-9.
11. Rice CM, Scolding NJ. Adult stem cells for the treatment of neurological disease. *Methods Mol Biol*. 2009; 549: 17-32.
12. Roy NS, Wang S, Harrison-Restelli C, Benraiss A, Fraser RA, Gravel M et al. Identification, isolation, and promoter-defined separation of mitotic oligodendrocyte progenitor cells from the adult human subcortical white matter. *J Neurosci*. 1999; 19: 9986-95.
13. Scolding NJ, Rayner PJ, Sussman J, Shaw J, Compston DA. A proliferative adult human oligodendrocyte progenitor. *Neuroreport*. 1995; 6: 441-5.
14. Farah MH, Olson JM, Sucic HB, Hume RI, Tapscott SJ, Turner DL. Generation of neurons by transient expression of neural bHLH proteins in mammalian cells. *Development*. 2000; 127: 693-702.
15. Nieto M, Schuurmans C, Britz O, Guillemot F. Neural bHLH genes control the neuronal versus glial fate decision in cortical progenitors. *Neuron* 2001; 29: 401-13.
16. Corbin JG, Gaiano N, Juliano SL, Poluch S, Stancik E, Haydar TF. Regulation of neural progenitor cell development in the nervous system. *J Neurochem*. 2008; 106: 2272-87.
17. Irvin DK, Zurcher SD, Nguyen T, Weinmaster G, and Kornblum HI. Expression patterns of Notch1, Notch2, and Notch3 suggest multiple functional roles for the Notch-DSL signaling system during brain development. *J Comp Neurol* 2001; 436: 167-81.
18. Tamak S, Eckert K, He D, Sutton R, Doshe M, Jain G et al. Engraftment of sorted/expanded human central nervous system stem cells from fetal brain. *J Neurosci Res*. 2002; 69: 976-86.
19. Palme TD, Schwartz PH, Taupin P, Kaspar B, Stein SA, Gage FH. Cell culture. Progenitor cells from human brain after death. *Nature*. 2001; 411: 42-3.
20. Schwartz PH, Bryant PJ, Fuja TJ, Su H, O'Dowd DK, Klassen H. Isolation and characterization of neural progenitor cells from post-mortem human cortex. *J Neurosci Res*. 2003; 74: 838-51.
21. Setoguchi T, Nakashima K, Takizawa T, Yanagisawa M, Ochiai W, Okabe M et al. Treatment of spinal cord injury by transplantation of fetal neural precursor cells engineered to express BMP inhibitor. *Exp Neurol*. 2004; 189: 33-44.
22. Imura T, Kornblum HI, Sofroniew MV. The predominant neural stem cell isolated from postnatal and adult forebrain but not early embryonic forebrain expresses GFAP. *J Neurosci*. 2003; 23: 2824-32.

Conflicto de intereses

Los autores hemos recibido ayuda económica de FUNDACIÓN MAPFRE para la realización de este trabajo. No hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial o de FUNDACIÓN MAPFRE.