

**José López Barneo**  
Neuroprotección y terapia celular en la enfermedad Parkinson

## José López Barneo

Neuroprotección y terapia celular en la enfermedad Parkinson

José López Barneo  
Director del Instituto de Biomedicina  
de Sevilla (IBiS)  
Hospital Universitario Virgen del  
Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla.

*Universidad de Córdoba*

---

**Ideas Fuerza**

---

- 01.- Importancia de la investigación básica
- 02.- Neuroprotección y terapia celular
- 03.- Parkinson y Alzheimer
- 04.- Destrucción de neuronas en el encéfalo
- 05.- La vía nigroestriatal dopaminérgica
- 06.- Alteraciones de la vía nigroestriatal
- 07.- La sintomatología motora
- 08.- La bradykinesia
- 09.- James Parkinson y la parálisis agitante
- 10.- El tratamiento con L-dopa
- 11.- Las nuevas estrategias de terapia celular
- 12.- Células que producen dopamina
- 13.- Células gabaérgicas
- 14.- Neuroprotección
- 15.- La vía nigroestriatal
- 16.- El GDNF
- 17.- Dos problemas fundamentales
- 18.- Sin GDNF, no hay riñones
- 19.- Dos preguntas básicas
- 20.- El papel fisiológico del GDNF
- 21.- Terapia celular neuroprotectora
- 22.- Caracterización molecular del cGDNFko
- 23.- El modelo animal
- 24.- El locus coeruleus
- 25.- Otras estructuras sin muerte neuronal
- 26.- Parkinsonismo experimental

**José López Barneo**

Neuroprotección y terapia celular en la enfermedad Parkinson

---

**Ideas Fuerza**

---

- 27.- GDNF; factor neurotrófico en adulto
- 28.- El GDNF no es compensable
- 29.- Dónde y quién produce el GDNF
- 30.- Tres localizaciones de producción GDNF
- 31.- Demostrado en el estriado
- 32.- Núcleo del tálamo y septum
- 33.- Producción de GDNF en vía nigroestriatal
- 34.- Prejuicios en neurociencia
- 35.- Separación de astrocitos puros
- 36.- Las Medium Spiny Projection Neurons
- 37.- Las células PV+ producen el GDNF
- 38.- Un sincitio sincrónico de liberación GDNF
- 39.- Primeras conclusiones
- 40.- GDNF como terapia antiparkinsoniana
- 41.- El desarrollo de nuevas tecnologías
- 42.- Incrementar los niveles locales de GDNF
- 43.- El cuerpo carotideo y los discípulos de Cajal
- 44.- La secreción de dopamina
- 45.- Cuerpo carotideo y células glómicas
- 46.- Cuerpo carotideo y células glía-like
- 47.- Dopamina y GDNF en células glómicas
- 48.- Las células glómicas TH+ producen GDNF
- 49.- Cuerpo carotideo, rico en GDNF
- 50.- Trasplante de cuerpo carotideo
- 51.- Experimentos preclínicos
- 52.- Efecto neuroprotector del cuerpo carotideo

**José López Barneo**

Neuroprotección y terapia celular en la enfermedad Parkinson

---

**Ideas Fuerza**

---

- 53.- Dos ensayos clínicos piloto
- 54.- Datos del primer ensayo clínico
- 55.- Datos del segundo ensayo clínico
- 56.- Los factores pronóstico del trasplante
- 57.- La edad del paciente y la gravedad del PD
- 58.- La cantidad de tejido trasplantado
- 59.- Una 'lenteja' que no iba a funcionar
- 60.- El ida y vuelta de lo clínico a lo básico
- 61.- Un órgano que crece de tamaño en adulto
- 62.- El cuerpo carotideo crece con la altura
- 63.- Un experimento a 5.800 m. de altura
- 64.- Población de células madre quiescente
- 65.- Ensayos de neuroesferas
- 66.- Single Deposition Experiments
- 67.- Fases de crecimiento y diferenciación
- 68.- Células glómicas
- 69.- Las nuevas células producen GDNF
- 70.- Neurogénesis en Sistema Nervioso Central
- 71.- Neurogénesis en el cerebro
- 72.- La producción in vitro de neuroesferas
- 73.- Creación de la tecnología de producción
- 74.- El estudio del cuerpo carotideo humano
- 75.- Nichos neurogénicos en cuerpo carotideo
- 76.- El reto de la producción del GDNF
- 77.- La producción de GDNF recombinante
- 78.- El grupo de trabajo y los colaboradores

## José López Barneo

Neuroprotección y terapia celular en la enfermedad Parkinson

---

### ARGUMENTO

---

El Parkinson se sitúa como la segunda enfermedad neurodegenerativa detrás del Alzheimer en cuanto a la cantidad de pacientes que la manifiesta. Entre ambas –Parkinson y Alzheimer–, se estima que en España afecta a más de un millón de personas.

Según explica José López Barneo, director del Instituto de Biomedicina de Sevilla, la enfermedad de Parkinson se produce porque un grupo de neuronas en el tronco del encéfalo se destruyen por causas desconocidas.

Se trata de una zona que se conoce con el nombre de “sustancia negra”, donde se estima que existe casi un millón de neuronas que extienden sus prolongaciones hasta otra zona del cerebro denominada “estriado”

La extensión neuronal que parte desde la sustancia negra y llega hasta el estriado marca una zona en el cerebro conocida bajo el nombre de “vía nigroestriatal”. Vía que participa en el control de los movimientos del cuerpo y donde la ciencia neurológica localiza esa masiva destrucción neuronal característica de la enfermedad del Parkinson.

En su exposición Barneo explica que cuando esta muerte neuronal afecta a más del 50% de las neuronas de la vía nigroestriatal, la concentración de dopamina en el estriado disminuye considerablemente.

Sin embargo la terapia clásica, edificada en base a la administración de dopamina, no logra frenar la progresión de la enfermedad. Una realidad que ha venido alimentando en los últimos decenios la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas para tratar el Parkinson.

En su conferencia Barneo se centra en uno de los factores que más se ha investigado en estos últimos tiempos, y en lo que él mismo, junto a su equipo de investigación, ha participado muy activamente. Se trata del factor GDNF –Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor–, un factor neurotrófico que se clonó en la década de los 80 de células gliales.

A partir de este momento la conferencia de Barneo se convierte en un relato singular y apasionante de cómo, en la realidad, se conduce una investigación científica. Describe los dos problemas fundamentales de

## José López Barneo

Neuroprotección y terapia celular en la enfermedad Parkinson

---

### ARGUMENTO

---

donde parte su investigación, analiza el papel fisiológico del GDNF, relata la búsqueda de dónde y qué produce efectivamente el GDNF, habla de los prejuicios en neurociencia, y llega hasta las primeras conclusiones.

A partir de ahí, su exposición se adentra en el camino experimental del GDNF como terapia antiparkinsoniana y el desarrollo de nuevas tecnologías. Y es ahí donde conecta con la glándula carotidea y recupera la línea de trabajo de la escuela española de Santiago Ramón y Cajal para finalmente demostrar que el cuerpo carotideo es rico en GDNF y habilitarlo como terapia de trasplante celular.

Es aquí donde comienza lo que podríamos identificar como una tercera fase en el desarrollo de la investigación de Barneo que se inicia con la realización de una serie de experimentos preclínicos y dos ensayos clínicos piloto. Se trata de una fase caracterizada por un continuo trasiego entre la investigación básica y la experimental, o clínica, no exento de problemas. “A veces –confiesa Barneo- se entiende el científico mejor con un cirujano que con un médico clínico”.

Es en esta fase donde adquiere importancia la investigación por el equipo de Barneo de una población de células madre quiescente que se localiza en el cuerpo carotideo y que adopta un papel fundamental en el crecimiento del órgano en ambientes pobres de oxígeno.

Investigación que conduce al equipo de Barneo a la realización de una serie de ensayos de neuroesferas y a la producción in vitro de las mismas. Trabajo que finalmente conduce en la necesidad de la creación de una tecnología de producción de estas neuroesferas como solución al reto marcado por la línea de investigación inicial de producción masiva de GDNF.

La conferencia de López Barneo no sólo describe el camino de la investigación básica a la hora de enfocar y aportar soluciones a un problema científico de la envergadura y trascendencia de la enfermedad de Parkinson, sino que en sí misma constituye un testimonio de gran valor histórico, captado por imatv, sobre un importante hito, concreto, de la historia de la ciencia que se desarrolla en Andalucía y en España.

**José López Barneo**

Neuroprotección y terapia celular en la enfermedad Parkinson

---

## CONFERENCIA

---

Buenas tardes. En primer lugar quiero decir, con el permiso del señor Rector, comienzo mi conferencia.

Quiero agradecer la invitación, en primer lugar, y las palabras de presentación del profesor Fernández, de Emilio, mi querido amigo Emilio, que es un placer, de verdad, venir a este acto, por varias razones.

Es muy bonito hablarles a jóvenes –a estudiantes–, y participar en un acto cuyo objetivo final, o fundamental, no es solamente la divulgación científica, sino hacer que mediante la divulgación científica se generen nuevas vocaciones; se produzca conocimiento científico. Y aseguremos que esta excelencia científica a la que la Vicedecana se refería anteriormente –que con tanto esfuerzo personal de un puñado de personas, valga la redundancia, hemos estado generando las últimas décadas, y que ha hecho de nuestro país, de Córdoba en particular, de la UCO en particular, pero yo creo que en general otros centros de excelencia superior del país–, pueda convertirse en una potencia media en investigación científica cuando era un erial hace simplemente unas pocas épocas.

Pues repito, este esfuerzo que se ha hecho tan importante por parte de toda una generación de científicos –el esfuerzo–, se transmita. La antorcha la recojan nuevas generaciones y sigamos adelante para que España en general, y la UCO en particular, continúen con esta línea de progreso en la investigación y transferencia de la investigación.

### **La importancia de la investigación básica**

Se está comentando cada vez más –y yo creo que el señor Rector ha hecho referencia a ello–, los momentos difíciles en los que estamos.

La importancia de que la investigación científica se traduzca no solamente en un incremento del conocimiento –que en mi opinión– es la base de la investigación científica; la investigación básica.

Pero lo importante es que esta investigación básica –sin forzar nada–, pero que con esa investigación básica, de forma casi espontánea, generemos situaciones para que la investigación básica se transfiera a lo que es la realidad en el mundo productivo, o lo que es la realidad, en mi caso; al mundo clínico.



## José López Barneo

Neuroprotección y terapia celular en la enfermedad Parkinson

---

### CONFERENCIA

---

Y es por esa razón, porque creo realmente en esta forma de ver la investigación; la investigación fundamental a nivel molecular –a nivel celular, lo más básica posible–, pero siempre con la idea de que el incremento de conocimiento se transfiera o se traslade lo antes posible a la realidad industrial o a la realidad clínica.

#### **Neuroprotección y terapia celular**

Es la razón por la que he traído, dentro de las líneas de investigación que tenemos en mi grupo, esta línea que se titula “neuroprotección y terapia celular en la enfermedad de Parkinson”, que yo la voy a presentar un poco con un pequeño componente de revisión histórica. Aunque naturalmente presentaré los datos más recientes –naturalmente–, pero que es una línea de un alto poder transferencial.

Es una línea la que comenzamos a investigar con conceptos muy básicos. En principio no buscábamos ninguna aplicación pero el propio trabajo de laboratorio –la propia actividad científica–, nos ha llevado a buscar aplicaciones a los propios datos científicos que obteníamos en el laboratorio. Y en ese acercamiento –como decía antes–, entre la investigación básica y la investigación, en mi caso concreto la práctica médica o la investigación más clínica.

#### **Parkinson y Alzheimer**

Pues bien, como indica su título, el trabajo que quiero presentar tiene que ver con la enfermedad de Parkinson.

Es una enfermedad neurodegenerativa bastante frecuente. Es la segunda enfermedad neurodegenerativa en frecuencia, después de la enfermedad de Alzheimer. En España se calcula que hay alrededor de 250.000 - 300.000 enfermos de Parkinson. Y junto con el Alzheimer juntan alrededor de un millón y pico de personas.

Ambas enfermedades son crónicas. Muy invalidantes. Se asocian a los procesos de envejecimiento y por lo tanto constituyen ya un problema sanitario muy importante puesto que son la causa de dependencia de los mayores más importante.

Y por lo tanto representan, no solamente un problema médico importante, sino que también un problema social y económico, ya que son personas a las que hay que atender. Y la atención requiere recursos que a veces no están disponibles.

**José López Barneo**

Neuroprotección y terapia celular en la enfermedad Parkinson

---

**CONFERENCIA**

---

**Dstrucción de neuronas en el encéfalo**

La enfermedad de Parkinson se produce porque un grupo de neuronas, que se localiza en el sistema nervioso, se destruyen por causas desconocidas.

Se destruyen diferentes neuronales pero el grupo neuronal que más se afecta es un grupo que se localiza en esta zona del cerebro –en el tronco del encéfalo; en la zona de donde luego arranca el encéfalo–, que se llama la sustancia negra.

**La vía nigroestriatal dopaminérgica**

En el hombre existen varios centenares de miles –o casi un millón de neuronas en esta zona–, que envían sus prolongaciones, y terminan estas prolongaciones, en otra zona del cerebro que se llama los núcleos caudado y putamen. Colectivamente se le da el nombre de estriado.

Debido a este nombre –esta vía nerviosa que va desde la sustancia negra al estriado–, se llama la vía nigroestriatal.

Esta vía nigroestriatal tiene como particularidad que las terminaciones axónicas –las terminaciones nerviosas–, liberan en el estriado una molécula que es la dopamina. Es una vía dopaminérgica. Y esta dopamina que se libera en el estriado es importante para el funcionamiento de esta vía nigroestriatal.

La vía nigroestriatal en pacientes de Parkinson se ve afectada porque, como digo, por causas desconocidas, estas neuronas que se localizan en la sustancia negra, comienzan a desaparecer, comienzan a destruirse.

**Alteraciones de la vía nigroestriatal**

Hay un proceso de muerte progresiva de células nerviosas. Normalmente este proceso comienza alrededor de los 50, 60 años, según los pacientes, puede haber parkinsonismos más juveniles o menos juveniles, pero el promedio comienza alrededor de los 50 años.

Y cuando la muerte neuronal afecta a un número grande neuronas, a más del 50, 60%, entonces el número de axones –de fibras nerviosas–, que se liberan al estriado disminuyen muchísimo.

La vía nigroestriatal se comienza a afectar y por lo tanto la concentración –desde el punto de vista bioquímico–, la concentración de dopami-

## José López Barneo

Neuroprotección y terapia celular en la enfermedad Parkinson

---

### CONFERENCIA

---

na en el estriado disminuye muchísimo. Y en esas circunstancias comienza a manifestarse alteraciones de la vía nigroestriatal.

#### **La sintomatología motora**

Como esta vía participa en el control motor, participa en el control de los movimientos. Por esa razón la destrucción de ella, por la enfermedad de Parkinson, produce fundamentalmente sintomatología motora, al menos en las etapas iniciales.

En etapas más avanzadas el Parkinson también puede producir defectos cognitivos de tipo demencia, etcétera, pero en las etapas iniciales produce fundamentalmente síntomas motores.

Y sobre todo esta trilogía típica, –característica y clásica–, en la que los pacientes presentan temblor, generalmente de los miembros de la mano o de la pierna, a veces de la propia cabeza; que es un poco este dibujo que ilustra, yo creo que muy bien, la postura típica del enfermo parkinsoniano.

#### **La bradykinesia**

El temblor suele aparecer normalmente de forma asimétrica; antes en un sitio que en el otro. Eso es muy típico del Parkinson. Al final la enfermedad es simétrica, pero inicialmente muestra una gran asimetría por causas desconocidas.

Y los pacientes tienen tendencia a cogerse –a apoyarse la mano que tiembla con la otra mano–, para que el temblor se le note menos. Y además de temblor muestran, de forma paradójica, rigidez; las articulaciones se mueven con mucha dificultad. Y también muestran lentitud en los movimientos, lo que se conoce con el nombre de bradykinesia.

#### **James Parkinson y la parálisis agitante**

La enfermedad de Parkinson se describió en el siglo XIX por James Parkinson, un médico británico que le dio el nombre de Shaking Palsy que es una parálisis agitante, es un poco un nombre paradójico. El paciente está medio paralítico porque apenas puede moverse, sin embargo se está agitando permanentemente.

#### **El tratamiento con L-dopa**

La enfermedad de Parkinson, en sus etapas iniciales, tiene un tratamiento farmacológico bastante exitoso. Consiste en que esta fibra dopa-

**José López Barneo**

Neuroprotección y terapia celular en la enfermedad Parkinson

---

**CONFERENCIA**

---

minérgica –que está liberando dopamina–, como están parcialmente destruidas, para hacer que ellas produzcan todavía más dopamina de la que normalmente sintetizan, e incrementar los niveles de esta sustancia, de este transmisor en el cerebro; lo que se hace es darle un precursor de la dopamina, que es la L-dopa. Que es un derivado de aminoácido

A grandes dosis, por vía oral, se absorbe. Pasa muy bien la barrera macroencefálica, llega al interior del cerebro y en el interior del cerebro, en estos terminales, que aún no se han destruido, los convierten en dopamina. Y mediante ese tratamiento se intenta mejorar los síntomas de la enfermedad.

La farmacología, que funciona muy bien, y de hecho los que propusieron el uso de dopamina como tratamiento del Parkinson recibieron un Premio Nobel de Medicina hace siete u ocho años. Y ha sido uno de los avances farmacológicos más interesantes de los últimos 30 o 40 años. Sin embargo la L-dopa no frena la progresión de la enfermedad, sino que la enfermedad continúa.

**Las nuevas estrategias de terapia celular**

Y en estadios más avanzados la L-dopa deja de hacer efecto, porque deja de haber terminales nerviosos que conviertan L-dopa en dopamina. Deja de hacer efecto y entonces hoy en día hay una búsqueda de terapias alternativas, o nuevas estrategias terapéuticas para tratar el Parkinson.

Y ha habido varias, que no voy a entrar en detalle. Me refiero en estos tres epígrafes; a las tres, digamos, estrategias terapéuticas que se están investigando con más ahínco en la actualidad.

Y una de ellas –en la que yo me voy a centrar–, se basa –aunque por un poco introducir el concepto–, básicamente se basan todas estas terapias en administrar células, aquí en el estriado, que produzcan la dopamina que no producen los terminales.

**Células que producen dopamina**

Es decir, introducir células que produzcan el componente químico, el neurotransmisor, que deja de producirse en estos terminales. Es decir; a esto se le llama dopamine cell replacement, en inglés, es poner aquí células que produzcan dopamina.

**José López Barneo**

Neuroprotección y terapia celular en la enfermedad Parkinson

---

**CONFERENCIA**

---

**Células gabaérgicas**

Un segundo abordaje terapéutico consiste en construcciones virales que codifican los enzimas que hacen falta para hacer el siete siete de dopamina, estos constructos virales, estas traslaciones virales, que codifican estos enzimas, se inyectan en el estriado. Se inyectan células que no son dopaminérgicas, pero las convierten en dopaminérgicas. Son células que normalmente son gabaérgicas y comienzan a producir dopamina en el estriado.

**Neuroprotección**

Y el tercer abordaje se llama la neuroprotección, que es a lo que yo me voy a dedicar con más interés.

Esta neuroprotección consiste en lo que pasa en las vías nerviosas, como la vía nigroestriatal.

Existe un concepto muy antiguo, que se llama el concepto de neurotrofismo, que ya Santiago Ramón y Cajal puso de manifiesto hace 120 años. Y que es el siguiente; consiste en que en la vía nerviosa –normalmente son conexiones celulares que se mantienen toda la vida–, como bien saben el sistema nervioso no se reproduce. No hay regeneración celular, salvo en sitios muy específicos y muy concretos y muy mínimos.

Como estas conexiones se han de mantener toda la vida, en la diana a donde proyectan las vías nerviosas, se sintetizan sustancias, que suelen ser péptidos –que se llaman sustancias neurotróficas–, que se sintetizan en esta zona. Se captan por los terminales sinópticos, se transportan al soma de las neuronas y ahí inducen un patrón de expresión genética cuyo papel fundamental es mantener la vitalidad –la supervivencia–, de la vía en cuestión.

**La vía nigroestriatal**

Pues bien, con esta idea en mente, se ha pensado durante mucho tiempo en la vía nigroestriatal.

Aquí se ve un corte sagital de un cerebro de rata, donde se muestra aquí la sustancia negra. Estas son las neuronas. Aquí los axones que parten de la sustancia negra. Y aquí cómo se ramifican en el estriado, en la vía nigroestriatal, en las ratas.

Pues bien, se ha postulado la existencia en el estriado –esta es la vía nigroestriatal–, de sustancias neurotróficas, como estos puntitos aquí de

## José López Barneo

Neuroprotección y terapia celular en la enfermedad Parkinson

---

### CONFERENCIA

---

color magenta, que cuando por alguna razón la vía nigroestriatal estuviese enferma, estos agentes neurotróficos serían captados por ella, serían post-terminales sinápticos, serían transportados al soma y en el soma inducen la expresión de genes, genes antioxidantes, genes que inducen la vitalidad de las células, y por lo tanto restaurarían o revitalizarían la vía nigroestriatal.

Entonces, durante los últimos 15 o 20 años se ha investigado muchísimo sobre estos posibles factores. Si se producen en el estriado; intentar estimular su producción. Y si no se producen; administrarlos exógenamente en el estriado para que tengan un papel terapéutico.

#### **EI GDNF**

Uno de los factores que más se ha investigado en estos últimos tiempos, ha sido el GDNF. El GDNF viene del inglés, del glial cell line-derived neurotrophic factor. Es un factor neurotrófico que se clonó de células gliales, de ahí su nombre. Como luego veremos, no se produce normalmente en las células gliales pero se clonó de un tumor de glía y de ahí adquirió el nombre.

Se conoce ya hace tiempo, en el año 83, y muy pronto se demostró, por un grupo norteamericano –muy pronto se demostró–, que cuando uno tiene un cultivo de células de sustancia negra in vitro –aquí ven varias neuronas, aquí está sin GDNF–, y se le añade GDNF al medio; el GDNF no induce proliferación celular.

A veces hay un error conceptual; que la gente confunde el factor neurotrófico con factor de proliferación. El factor neurotrófico no induce proliferación por definición, lo que induce es que el número de neuronas es el mismo pero revitaliza a nivel morfológico y neuroquímico a esas neuronas.

Y como aquí podéis apreciar, en presencia del factor trófico estas neuronas emiten muchas más neuritas, se tiñen mucho más de color oscuro, con esta tinción que es una tinción para la tiroxina hidrosilasa; una enzima que es limitante en la síntesis de catecolaminas, etcétera.

Y bien, basados en estas observaciones, se pusieron experimentos en marcha en los últimos años, que consistieron en obtener GDNF recombinante –se clonó, etcétera, etcétera, obtener en bacterias GDNF recombinante–, y en pacientes de Parkinson se hicieron experimentos pre-clínicos. Previamente en modelos de animales, y posteriormente en

## José López Barneo

Neuroprotección y terapia celular en la enfermedad Parkinson

---

### CONFERENCIA

---

pacientes de Parkinson, mediante una cánula conectada a un reservorio, se administraba a través de la cánula GDNF recombinante en el estriado –esta es la vía nigroestriatal–, con la idea a la que yo me refería anteriormente. Que es que si se deposita GDNF –sea cual sea la causa que está produciendo la destrucción de estas neuronas–, favorecer o potenciar, proteger, a estas células nerviosas y facilitar que estén más tiempo sano.

Pues bien, este tipo de experimentos se realizaron en pacientes en diferentes momentos. Ha habido en los últimos ocho o diez años algunos artículos de muy buen nivel, publicados en revistas de muy alto impacto, en Natural Medicine, Annals of Neurology, etcétera.

#### **Dos problemas fundamentales**

En los experimentos iniciales en pacientes se demostró que el GDNF exógeno tenía un papel protector muy importante. Pero posteriormente, cuando se han hecho estudios a doble ciego –esto es muy importante en la neurociencia, sobre todo en pacientes, hacer estudios a doble ciego para evitar los efectos placebo–, cuando se hicieron estudios a doble ciego se han visto dos problemas fundamentales.

Uno que el efecto del GDNF exógeno no es tan importante a nivel clínico y a nivel neuroquímico. Y en segundo lugar que el GDNF recombinante, por el procedimiento por el que fue obtenido, generaba auto-anticuerpos. Anticuerpos que reaccionaron contra las células de Purkinje del cerebelo y produjeron una serie de sintomatología secundaria negativa, de tipo atáxico, etcétera, etcétera. Lo cual obligó a interrumpir este tipo de estudio clínico.

En estas circunstancias la investigación sobre el GDNF cobraba más interés porque nos parecía muy importante investigar si el GDNF –que hasta ahora se había utilizado, como digo, exógenamente; el GDNF recombinante–, en la vida real, en la fisiología normal, en la vía nigroestriatal normal, el GDNF se produce o no en el estriado. Y si el GDNF es de verdad un factor neurotrófico, fisiológico, en el cerebro de mamíferos, en el adulto.

Porque si eso fuese así entonces era muy importante seguir investigando con el GDNF para un poco diseñar una metodología que pueda ser trasladada a la clínica con un nivel de eficacia y de seguridad muy superior a lo hecho hasta el momento.



**José López Barneo**

Neuroprotección y terapia celular en la enfermedad Parkinson

---

**CONFERENCIA**

---

Para responder a esta pregunta se hicieron animales –hace ya tiempo–, knockout de GDNF. Sabéis que es una herramienta típica en la que un gen se destruye y así se ve la función del gen. Y lo negativo de este tipo de abordaje, abordaje que es relativamente antiguo, en el año 96 se publicaron tres artículos en Nature, a la vez, de tres grupos distintos, describiendo en knockout del GDNF.

**Sin GDNF, no hay riñones**

Y se mostró una observación interesante, que el GDNF hace falta para el desarrollo de los riñones –aquí se ven los dos riñones–, en ausencia de GDNF no hay riñones. Hace falta para otras funciones del cuerpo y los animales solamente viven un día después de nacer porque al otro día los riñones no pueden –digamos–, limpiar la sangre de productos tóxicos y mueren. Pero si uno se fijaba en el momento del nacimiento, en el número de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra; era igual en el ratón salvaje que en el knockout.

Por lo tanto la idea dominante en el campo era que, aunque el GDNF farmacológicamente –exógeno–, tiene un efecto trófico sobre la neurona de la sustancia negra, quizás a nivel –in vivo–, a nivel fisiológico, no tiene demasiada importancia.

**Dos preguntas básicas**

Entonces, en estas circunstancias nuestro grupo de investigación –que por otra vía distinta que luego explicaré–, había llegado a tener mucho interés en el GDNF, nos planteamos abordar estas dos preguntas básicas, fundamentales, en este proyecto que yo quiero hoy comentar.

**El papel fisiológico del GDNF**

La primera pregunta es si el GDNF tiene algún papel fisiológico en la vía nigroestriatal adulta.

Hemos visto aquí –mediante experimentos–, que en la génesis de la sustancia negra, el GDNF no tiene ningún papel. Durante la embriogénesis el GDNF no es un factor neurotrófico para la sustancia negra.

Pero en la vida adulta el GDNF cambia de papel. Eso es muy frecuente para muchas moléculas que durante la embriogénesis hacen una cosa y en la vida adulta hacen otra distinta.

## José López Barneo

Neuroprotección y terapia celular en la enfermedad Parkinson

---

### CONFERENCIA

---

Si en la vida adulta el GDNF tenía o no algún papel fisiológico en la vía nigroestriatal –y si es así–, ¿dónde y cómo se produce el GDNF?, con la idea de ver un poco qué tipo de abordaje terapéutico podríamos diseñar, de forma traslacional, para utilizar el GDNF en la clínica, de forma más exitosa que lo ha hecho hasta el momento.

#### **Terapia celular neuroprotectora**

Y como segunda pregunta, que deriva de la primera –como estoy comentando–, es si era posible o no, parar o disminuir, la progresión de la enfermedad de Parkinson con terapia celular neuroprotectora que se basase en la administración de GDNF exógeno, por otros mecanismos distintos de lo hecho hasta la fecha, o por la estimulación de la producción de GDNF endógeno.

Entonces, para resolver esta pregunta, lo que hicimos fue..., voy –esta parte tecnológica–, a comentarla muy por encima. Seguro que muchos la conocen.

Utilizamos un animal GDNF knockout. Pero no un knockout embrionario –que como acabo de decir, el animal durante la embriogénesis pierde el riñón–, sino lo que se llama un knockout condicional, en el cual el gen que codifica para el GDNF se flanquea por dos sitios, que se llaman Floxed B.

Se produce un alelo floxeado –que es una traducción al castellano incorrecta, pero no hay otra–, y estos sitios, floxed B, permiten tener un alelo normal; un gen normal. Pero que en la vida adulta se puede escindir, porque se puede activar una enzima –que es la recombinasa cre–, y esta recombinasa cre, actúa sobre estos sitios floxed B. Escinde este trozo de gen y produce un alelo escindido.

Y de esa forma generamos un knockout condicional, que el knockout nace normal pero luego en la vida adulta, a plácet experimental, se le puede quitar el gen para demostrar si en ese momento el gen hacía falta o no.

#### **Caracterización molecular del cGDNFko en animales**

No voy a entrar en más detalles. Simplemente el proceso tecnológico de generar el animal knockout –de desarrollarlo, etcétera–, pues fue un proceso transferencia de tecnología muy importante que se llevó a cabo en nuestro laboratorio.



**José López Barneo**

Neuroprotección y terapia celular en la enfermedad Parkinson

---

**CONFERENCIA**

---

Y lo que obtuvimos fue un animal –lo que obtuvimos al final–, fue un modelo animal en el que en el nacimiento los animales nacían normales, porque tenían sus dos alelos GDNF normales.

Y cuando una vez que el animal, hablo de ratones, una vez que el animal alcanzaba dos meses de edad y era adulto, entonces, mediante un derivado de estrógenos, que es el tamoxifeno; lo que hace es, –como todas las hormonas esteroideas, unirse a un receptor nuclear–, y al unirse a un receptor nuclear, ir al núcleo y una vez en el núcleo activar a la recombinasa Cre y escindir este alelo al que yo me refería anteriormente.

Por aplicación del tamoxifeno se escinde del alelo floxeado de GDNF y entonces, a partir de ese momento, el animal comienza a tener defecto genético.

Y a los tres, cinco y nueve meses mirábamos diferentes parámetros: proteínas, DNA que codificaba GDNF, cuántos GDNF hay, cuántos DNA de GDNF hay. Hacíamos histología para mirar cómo estaba la vía nigroestriatal al mes siguiente de quitar el tamoxifeno, y siete meses más tarde, y a los nueve meses. Es decir, hacíamos una caracterización neuroquímica, molecular e histológica del animal.

Y básicamente, para hacer la historia breve, –porque quiero centrarme en las observaciones experimentales más importantes–, es un poco que vean cómo en este modelo animal, cuando medimos cantidad de mensajeros que codifica GDNF en el estriado, se observa cómo de animal normal a animal floxeado, que tiene un alelo negativo y un alelo floxeado, cuando se le administra el tamoxifeno, este alelo floxeado desaparece, y se produce una disminución brusca de DNA.

No hay una disminución completa del mensajero de GDNF en este tipo de modelo experimental porque el tamoxifeno no llega a todas las células que producen GDNF. Se produce un modelo de depresión parcial, lo cual es interesante porque tiene mayor similitud con la realidad clínica, del depresión parcial de GDNF pero que de un total, llamémosle 100%, se llega a un valor de un 35 o 40%.

Igual que baja el mensajero, se produce una bajada de proteínas de GDNF en el estriado, que es donde se produce el GDNF, –esperamos que se produce normalmente–, y cuando se analizan los cerebros de

## José López Barneo

Neuroprotección y terapia celular en la enfermedad Parkinson

---

### CONFERENCIA

---

estos animales y se miran diferentes vías neuroquímicas, se observan cómo las vías colinérgicas que codifican, que aquí se estudian midiendo la actividad, el mensajero en el cerebro, de la colina acetiltransferasa, o de la vía glutamatérgica, midiendo actividad de la glutamato descarboxilasa, no se ven afectadas.

Y si se ven afectadas, la expresión de mensajero de la tiroxina hidroxilasa indicando que los sistemas dopaminérgicos o catecolaminérgicos están afectados selectivamente en este modelo animal.

#### **El modelo animal**

Y entonces en este modelo animal lo que nos centramos es ver diferentes estructuras del cerebro, y ver cómo se produce o no pérdida neuronal.

Y lo que observamos es que a los siete meses de haber quitado el GDNF, el animal GDNF menos/menos, que con dos meses se le quitó el alelo floxeado que producía GDNF en la sustancia negra, —en la neuronas mesecefálicas que producen dopamina—, que son la sustancia negra y el área segmental ventral, se produce una disminución muy importante en el número de células TH-positivas.

En algún caso extremo se ve casi una desaparición completa de las células que están en la sustancia negra que es de donde arranca la vía nigroestriatal, indicando que el GDNF en el adulto tiene un papel en el mantenimiento de la vía nigroestriatal bastante importante.

#### **El locus coeruleus**

Igualmente que desaparecen estas células, observamos alguna otra estructura, también catecolaminérgica, que también se afectan en la enfermedad de Parkinson, pero que son menos conocidos los síntomas que produce su defecto, como por ejemplo el locus coeruleus.

El locus coeruleus es un grupo de neuronas que se encuentran en el tronco del encéfalo de los mamíferos y también en el hombre, donde hay células catecolaminérgicas que es la base de catecolamina, de noradrenalina, más importante de todo el cerebro.

Pueden observar como en ausencia de GDNF hay una destrucción casi completa de locus coeruleus. El número de neuronas, que pasa de tener alrededor de 800, 900 neuronas, a tener en promedio menos de diez neuronas, en estos animales a los que siete meses antes se les quitó el GDNF.

## José López Barneo

Neuroprotección y terapia celular en la enfermedad Parkinson

---

### CONFERENCIA

---

#### **Otras estructuras sin muerte neuronal**

Pero esta muerte neuronal que estoy comentando, que es la sustancia negra en el locus coeruleus, no es inespecífica sino que en muchas otras estructuras no hay destrucción de ellas por ausencia de GDNF –como el GDNF donde creemos que no es importante para el mantenimiento trófico de las neuronas–, como por ejemplo es el hipocampo.

Aquí se ve el giro dentado, la corteza del hipocampo no se ve afectada, tampoco se afecta en la corteza cerebral. Aquí se ve un corte de corteza cerebral, con tinciones de neurona de la corteza y sus diferentes capas; tampoco se ve afectado. Incluso un centro dopaminérgico del hipotálamo –que aquí en esta universidad hay varios grupos que lo conocen muy bien–, como es el núcleo arcuate N, que en ciertos aspectos se parece mucho a la sustancia negra, sin embargo aquí pueden observar cómo el núcleo arcuate N del hipotálamo está prácticamente idéntico en animales control y en animales a los que se le quitó el GDNF.

#### **Parkinsonismo experimental**

Por tanto la escisión, el quitar GDNF en el cerebro del adulto, produce una destrucción bastante selectiva de la vía nigroestriatal y de algunos otros núcleos del tronco del encéfalo, como el locus coeruleus, que son núcleos que están también afectados en la enfermedad de Parkinson.

Esto nos llevó a pensar que realmente los animales deberían de presentar un parkinsonismo –se estaba produciendo un parkinsonismo experimental–. Y realmente eso es lo que muestra esta figura.

Esta figura lo que se hace es un estudio, que se llama en campo abierto. A los animales de experimentación se les pone libres en un cuadrado. Y con una cámara se filma, y se hace una filmación durante por ejemplo diez minutos, y se ve cómo se mueven. Y mediante la cámara se les va siguiendo su trayectoria.

Y aquí se ilustra –en este cuadradito–, se ilustra mediante estas líneas que indican lo que se movió el animal durante un tiempo que no recuerdo bien; no sé si son diez minutos o media hora.

Y se compara la movilidad de un animal que tiene 100 días de edad, con un animal de la misma edad, pero que a los dos meses –a los 60 días–, se le dio tamoxifeno y se le quitó el GDNF y se le empezó a hacer parkinsoniano. Pueden apreciar cómo la movilidad disminuye muchísimo.

**José López Barneo**

Neuroprotección y terapia celular en la enfermedad Parkinson

---

## CONFERENCIA

---

Y aquí es de nuevo la movilidad en un animal normal a los 226 días y cómo en el animal de la misma edad la movilidad es todavía menor.

Aquí se cuantifica la distancia recorrida en centímetros, en el animal normal y en los animales parkinsonianos.

Y se ve claramente cómo a partir de cierto tiempo es una enfermedad que se instaura progresivamente.

Después de haber quitado el tamoxifeno los animales comienzan a ser más y más hipoquinéticos, indicando –no voy a entrar en más detalles; hay más detalles comportamentales que de nuevo apoyan este concepto de parkinsonismo animal, generado por la delección del GDNF– pero simplemente un poco, para que vean, cómo la afectación neuroquímica y la afectación histológica, conlleva a un modelo de animal hipoquinético; de animal parkinsoniano.

### **El GDNF es un factor neurotrófico en adulto**

Por lo tanto de este tipo de experimentos, la conclusión más importante que se sacó de este tipo de experimento, es que el GDNF en el adulto es un factor neurotrófico –en el animal adulto–, que hace falta para el mantenimiento de la vía estriatal.

No hablo del GDNF exógeno, sino el GDNF producido en el interior del cerebro. Y que cuando se le quita el GDNF se destruye la vía nigroestriatal.

Esta observación es muy interesante. En primer lugar por lo que vengo diciendo desde el principio de mi presentación; porque refuerza muchísimo el concepto de que el GDNF es una molécula de elección para tratamiento del Parkinson.

### **El GDNF no es compensable**

Pero además, desde el punto de vista de la investigación básica en el sistema nervioso, es el primer ejemplo que se había descrito hasta la fecha en el cual, cuando un factor neurotrófico en el adulto se retira, se produce mortalidad neuronal selectiva.

Siempre se había pensado que los factores neurotróficos eran muy compensables, es decir, que cuando se quita de una vía cerebral un factor neurotrófico, se puede compensar con otro factor neurotrófico.



## José López Barneo

Neuroprotección y terapia celular en la enfermedad Parkinson

---

### CONFERENCIA

---

Estos experimentos demuestran que no. Y que la delección de GDNF da lugar; no es, digamos, compensable. Es absolutamente necesario para mantener la vía nigroestriatal porque no es compensable por ningún otro factor neurotrófico.

#### **Dónde y quién produce el GDNF**

Pero una pregunta que surge a la hora de pensar en que el GDNF que se produce en el estriado –que lo quitamos en el modelo animal, o lo bajamos mucho de nivel–, es fundamental para mantener la vía nigroestriatal; es muy importante saber dónde y quién produce ese GDNF.

Entonces, responder a esta pregunta –que también ha estado en el campo mucho tiempo, y nosotros la hemos respondido recientemente en una publicación en el año 2012–, tiene la dificultad de saber dónde se produce GDNF en el cerebro normal.

Porque normalmente para responder a esta pregunta se hace en tecnología de inmunocitoquímica, se utilizan anticuerpos y los anticuerpos tiñen dónde está la proteína y te dice el lugar geográfico donde está localizada, el lugar topográfico del cerebro donde está.

Pero en el caso de GDNF eso no es fácil porque el GDNF generan anticuerpos muy “guarros”, entre comillas. Produce muchos falsos positivos. Por eso hay que tener muchísimo cuidado con inmunocitoquímica. En nuestras manos la inmunocitoquímica es muy útil pero también genera una cantidad de falsos positivos grandísima.

Entonces, lo que pudimos utilizar es una herramienta distinta. Es un animal que existe en la literatura. De hecho lo hizo el grupo de Mariano Barbacid –científico que conocen muchos de los presentes–, cuando estaba en Estados Unidos, y lo publicó en el año 96. Y es un animal knockin, que es un knockout de GDNF, al que se le ha quitado el alelo –se le ha quitado el exón primero–, pero donde estaba el exón primero, bajo el promotor de GDNF, introduce el gen de la galactosidasa; el lacZ. De modo que todas las células con este gen luego se introducen en el organismo.

Este es un knockin, se quita esta secuencia pero se pone esta otra.

#### **Tres localizaciones de producción GDNF**

Estos animales, donde tienen GDNF, cuando el promotor de GDNF está activo, expresa a la enzima galactosidasa, y mediante una reacción fácil

**José López Barneo**

Neuroprotección y terapia celular en la enfermedad Parkinson

---

**CONFERENCIA**

---

–que se llama la de X-gal–, podemos determinar objetivamente, sin ninguna duda, qué neuronas, mediante una reacción histoquímica muy simple, que produce unos depósitos, –aquí se pueden ver de color azul–, que son inequívocos, se puede ver en qué parte del cerebro adulto se produce GDNF.

Con esta metodología –que insisto, hemos hecho muchas comprobaciones y es prácticamente inequívoca–, hemos visto que en el cerebro se produce GDNF en el adulto, solamente en tres sitios y nada más.

Aquí hay un cuarto sitio que por el momento lo dejo de lado porque está en el cerebro; pertenece a los plexos coroides –a lo que son los ventrículos–, y es poco importante para la presentación de hoy. Pero está en tres localizaciones.

**Demostrado en el estriado**

Por supuesto en el estriado. En el estriado hay muchos GDNFs, porque es donde proyecta la vía nigroestriatal. Y es el GDNF que en el animal knockout se pierde y produce la degeneración de la vía nigroestriatal.

Eso que llevábamos decenios diciéndolo, no se ha demostrado experimentalmente hasta que hemos podido hacer este tipo de experimentos.

**El núcleo del tálamo y el septum**

Y en segundo lugar en el tálamo, en una parte muy específica del tálamo, en un núcleo del tálamo, que es el núcleo anteroventral del tálamo y en el septum, que son sitios donde proyecta el locus coeruleus.

Por lo tanto en estas estructuras a tálamo y a septum proyecta el locus coeruleus y cuando se quita el GDNF se muere por falta de GDNF. Y el estriado proyecta la sustancia negra y cuando se quita el GDNF se muere por falta de GDNF.

**Producción de GDNF en vía nigroestriatal**

Por lo tanto en el adulto el GDNF se produce en sitios muy concretos, donde ejerce una función fisiológica importante de mantenimiento de estas vías nerviosas. Y en el caso de la vía nigroestriatal el GDNF ¿quién lo produce?

Durante mucho tiempo se había pensado que en el estriado, en esta vía nigroestriatal que estábamos comentando anteriormente –que para no

## José López Barneo

Neuroprotección y terapia celular en la enfermedad Parkinson

---

### CONFERENCIA

---

perdernos me gustaría volver a presentarla y que sepan a qué me refiero—, esta vía nigroestriatal muchos pensaban que el GDNF se podía producir aquí.

Acabamos de demostrar que sí, que se produce en el estriado; pero se pensaba que lo producían células gliales. Pero como inicialmente el GDNF fue clonado de células gliales —células gliales, astrocitos, etcétera—, del estriado, producirían GDNF.

#### **Prejuicios en neurociencia**

Hemos hecho una serie de experimentos, que no voy a entrar en ellos con mucho detalle, pero sí quiero un poco hacerles ver cómo a veces los prejuicios o la idea científica se basan en ideas preconcebidas que no son real.

Cuando hemos hecho experimentos en el estriado, hemos teñido con marcadores inequívocos a neuronas, a células gliales de un tipo, —células astrocitos, que se tiñen con esta proteína, con la GFAP—, o a células de la microglía, que se tiñen con Iba1, hemos visto en más de 1.000 puntitos de estos verdes que indican producción de GDNF, que nunca coincide un puntito verde, o azulado, con un astrocito, o con una célula microglial; y siempre coinciden con neuronas.

Entonces hemos demostrado que quien produce el GDNF son neuronas del estriado. Y dentro de esas neuronas hemos hecho unos estudios de diverso tipo.

#### **Separación de astrocitos puros**

Aquí un poco se muestra un experimento en el que mediante un ratón que expresa bajo el promotor de la GFAP —de esta proteína que marca astrocito—, expresa la green fluorescent protein, hemos podido separar astrocitos puros del cerebro.

Y en una producción de astrocitos puros del cerebro, estudiamos si tienen o no GDNF. Y si ese GDNF se incrementa cuando al animal le activamos la producción de astrocitos. Se produce entonces una respuesta a un impulso químico; se produce una astrocitosis reactiva.

Y hemos visto que no; que la producción de GDNF no aumenta en animales donde después de extraer una preparación bastante pura de astrocitos se ha generado en ellos una astrocitosis reactiva, sugiriendo

**José López Barneo**

Neuroprotección y terapia celular en la enfermedad Parkinson

---

**CONFERENCIA**

---

que aunque algún GDNF se puede producir en el cerebro, la mayoría del GDNF no se produce en la glía, en los astrocitos.

**Las Medium Spiny Projection Neurons**

Y donde se produce el GDNF es en neuronas; en un grupo de neuronas que se distribuye por todo el estriado.

Y mediante experimentos –en este caso con doble tinción, lacZ, para ver dónde se produce el GDNF, y anticuerpos específicos de diferentes neuronas–, hemos visto, y ha sido también otra sorpresa muy interesante, que el 90% de las neuronas del estriado, donde proyecta la sustancia negra, expresan este marcador, que es el DARPP-32, que son neuronas que se llaman las médium spiny projection neurons.

Estas neuronas, cuando las hemos tenido hemos visto que en ningún caso co-expresa GDNF con ellas. En algunos casos que se ve GDNF muy cerca de la neurona, cuando se hace microscopía con focal, se observa claramente que el puntito está fuera de la neurona, indicando que se expresa en una neurona distinta que estaba muy cerca de ella.

Hemos visto, por hacer la historia corta, que el GDNF se produce en una población específica de interneuronas, que son interneuronas gabaérgicas, que son las interneuronas parvalbumina positivas.

Conocemos doble tinción de parvalbumina positiva que marca estas células y GDNF se ve como estos puntitos de GDNF aparecen dentro de estas neuronas y se ve que están dentro cuando se hace comprobación con focal.

**Las células PV+ producen el GDNF**

Por lo tanto la conclusión, lo que quiero decir, es que el GDNF en los animales normales, y en los animales a los que mediante una sustancia química, que es el MTP, les hemos inducido una activación de la glía –lo que se llama una gliosis reactiva–, en estos animales casi el noventa y tantos por ciento del GDNF que se produce en el estriado, se produce en las células parvalbumina positivas. Y muy pocos GDNFs se producen en otras células y ningún GDNF se produce en estas neuronas, la médium spiny neurons, que son las más abundantes del estriado.

Estas células parvalbumina positivas son muy interesantes porque son células que se comunican entre sí mediante uniones tipo nexus, –los

**José López Barneo**

Neuroprotección y terapia celular en la enfermedad Parkinson

---

**CONFERENCIA**

---

gap-junctions–, que son sinapsis eléctricas. Entonces forman lo que se llama un sincitio funcional en el estriado.

Un sincitio sincrónico de liberación de GDNF

Lo que yo aquí antes he pintado era un poco para hacerles ver este conjunto de neuronas que en el estriado producen GDNF. Son neuronas que todas sus dendritas, están conectadas entre sí mediante uniones tipo nexus, mediante sinapsis eléctrica.

Entonces son neuronas que cuando se activan, producen actividad eléctrica. Son como un sincitio; todas se activan a la vez y producen un conjunto sincrónico, que seguro tiene un valor adaptativo muy importante porque liberan a la vez GDNF en todo el estriado.

Y esta liberación a la vez, de GDNF en todo el estriado, podría tener un papel muy importante en el mantenimiento –en la nigroprotección–, de la vía nigroestriatal.

**Primeras conclusiones**

Entonces, para finalizar esta parte, ¿cuáles han sido las conclusiones de esta parte?

Pues la primera conclusión es que el GDNF sí tiene un papel fisiológico en la vía nigroestriatal adulta. El GDNF es absolutamente necesario para la supervivencia de la sustancia negra, nigroestriatales. En su ausencia mueren y el GDNF no se produce en cualquier sitio.

Se produce en el cerebro, se produce específicamente en el estriado para mantener fisiológicamente esta vía, y se produce en un ensamble –en un conjunto–, en un pull de neuronas parvalbumina positivas, que disparan de forma sincrónica.

**GDNF como terapia antiparkinsoniana**

Este tipo de observación potencia muchísimo el uso del GDNF como terapia anti parkinsoniana. Bien administrando GDNF, –pero en este caso no mediante sondas que liberen GDNF de forma permanente–, sino GDNF que se produzca de forma sincrónica.

Los grupos de investigación que aquí hay –que hay algunos eminentes neuroendocrinólogos–, sabéis lo importante que es que muchas hormonas proteicas se liberen de forma pulsátil. Porque si se liberan de forma

**José López Barneo**

Neuroprotección y terapia celular en la enfermedad Parkinson

---

## CONFERENCIA

---

continua desensibilizan los receptores y obtienen prácticamente ninguna acción. Pues algo parecido ocurre con el GDNF, creemos.

Cuando se han hecho ensayos clínicos que han costado millones de dólares, liberando GDNF mediante una cánula recombinante, además de los efectos secundarios que se han producido, no ha habido efectos clínicos. Posiblemente porque el GDNF pulsátil tenía un efecto casi incluso negativo.

Ahora mismo hay en marcha un ensayo clínico por un grupo norteamericano, intentando inyectar GDNF a través de una cánula, –GDNF exógeno, GDNF recombinante–, pero mediante pulsos de GDNF para determinar si su efecto clínico es superior.

### **El desarrollo de nuevas tecnologías**

Pero estas observaciones también han tenido otra parte de la historia muy bonita, muy interesante.

Y es que si hemos localizado dónde se produce el GDNF endógeno, podríamos intentar desarrollar tecnologías –que podrían tener una gran transferibilidad a la clínica–, que se basasen en la activación farmacológica –o mediante métodos físicos de la producción de GDNF por este conjunto de neuronas parvalbumina positivas que lo producen–, y de esa forma, mediante un método de estimulación de la producción de GDNF endógeno, mejorar la enfermedad de Parkinson.

Por lo tanto, como pueden ver, esta es una investigación muy básica, muy fundamental, como decía al principio, pero con un enfoque relacional muy importante.

La generación de animal GDNF knockout fue patentada, y ha sido licenciada por una empresa austriaca. Y en este momento este animal está en su cartera de servicios para suministrarlo a diferentes laboratorios.

Por supuesto nosotros el animal knockout de GDNF, en el mundo académico, lo damos mediante un BMTA, absolutamente de forma gratuita y sin ningún tipo de interés comercial en el mismo, naturalmente.

### **Incrementar los niveles locales de GDNF**

La segunda parte que quería –brevemente si puedo, tratar, como consecuencia de lo primero–, es ver si es posible, como decía al principio de mi

**José López Barneo**

Neuroprotección y terapia celular en la enfermedad Parkinson

---

## CONFERENCIA

---

presentación, parar o enlentecer la progresión de la enfermedad de Parkinson mediante una terapia neuroprotectora que se basase en células.

Es decir, en vez de liberar GDNF por una cánula, administrar células en el interior del estriado y células que produzcan fisiológicamente GDNF, liberen GDNF, y de esa forma incrementar los niveles locales de GDNF.

### **El cuerpo carotideo y los discípulos de Cajal**

Pues bien, este tipo de aproximación metodológica, se inició en mi grupo de experimentación –de hecho– hace ya más de diez años. Fue un hecho bastante fortuito.

Es que en mi grupo de investigación estábamos trabajando desde hace ya muchísimo tiempo en una glándula que se localiza en el cuello. Aquí en la bifurcación de la arteria carótida.

Aquí se ve la arteria carótida común; la arteria carótida interna y la externa. En el ángulo de la bifurcación carotidea, se encuentra el cuerpo carotideo, de ahí su nombre, que es una pequeña glandulita que pertenece al sistema nervioso periférico y que en España tenemos cierto cariño porque la descubrió un español, un discípulo de Cajal que se llamaba Fernando de Castro, uno de los discípulos más jóvenes de Santiago Ramón y Cajal. En los años 30 descubrió esta estructura.

Y poco después un fisiólogo austriaco, durante la Guerra Civil Española, en los años treinta y tantos, demostró que esta estructura –su función fundamental–, es la de ser un órgano sensorial; mide la tensión de oxígeno de la sangre. Y cuando hay poco oxígeno en la sangre manda una orden al cerebro para que el centro respiratorio aumente la frecuencia ventilatoria y la profundidad de la ventilación y así se compense la falta de oxígeno que hay en la sangre.

Estos experimentos que hizo este grupo belga, le llevó a la obtención del Premio Nobel en los años 40. y de aquella época, casi toda la comunidad científica, estaba de acuerdo que Fernando de Castro se merecía, como mínimo, haber compartido el Premio Nobel con estas personas, como ha habido dos discípulos de Cajal que han estado a punto de tener el Premio Nobel.

Uno este señor De Castro, y otro don Pío del Río Ortega, que fue un eminente histólogo que descubrió la microglía y además fue el primero

**José López Barneo**

Neuroprotección y terapia celular en la enfermedad Parkinson

---

**CONFERENCIA**

---

que realmente demostró que los oligodendrocitos son fundamentales para el funcionamiento del cerebro.

Este señor emigró a Latinoamérica, después de la Guerra Civil, etcétera. Fue otra persona que tuvo un nivel de Premio Nobel de forma indudable.

Un poco digo esto para mostrar como cuando hay un Premio Nobel bueno surge una escuela donde salen otros Premios Nobeles. Por lo tanto, el primer objetivo fundamental es conseguir que en nuestras universidades españolas tengamos pronto algunos Premiso Nobeles.

Pues bien, un poco por seguir con la historia, el cuerpo carotideo en mi grupo de investigación comenzó a trabajar sobre él para entender las bases fisiológicas y biofísicas mediante las cuales el oxígeno lo estimula.

**La secreción de dopamina**

Entonces, investigando con mi grupo de trabajo durante los últimos 10, 15 años, o 20 años ya casi, hemos llevado una línea de investigación sobre la sensibilidad al oxígeno, a la que antes se refería el profesor Fernández, relacionada con el análisis biofísico de las células del cuerpo carotideo.

Entonces descubrimos dos aspectos fundamentales. En primer lugar que las células del cuerpo carotideo –aquí se ve un cuerpo carotideo teñido, cuando se saca del animal y se ponen las células en cultivo–, si uno aplica diferentes metodologías, que no voy a entrar en ellas, y estimula con hipoxia el cuerpo carotideo, cuando pone la célula en un medio con poco oxígeno, mi grupo de investigación fue de los primeros en mostrar hace años que se produce una respuesta biofísica que al final de todo conlleva a la secreción de un transmisor, que precisamente es la dopamina.

Cada uno de estos palitos que aquí ven representan la secreción de estas células del cuerpo carotideo, de paquetes, de vesículas secretoras que están llenas de dopamina. Y esta dopamina es un transmisor de los que activan las fibras nerviosas que llevan la orden al cerebro para producir una hiperventilación.

**Estructura del cuerpo carotideo; las células glómicas**

Entonces, demostramos que el cuerpo carotideo lo forman acúmulos de células. Un acúmulo lo forman las células tipo I –o células glómicas, en

**José López Barneo**

Neuroprotección y terapia celular en la enfermedad Parkinson

---

**CONFERENCIA**

---

castellano–, entonces le llamamos neuron-like, porque se parecen mucho a neuronas. Tienen vesículas secretoras de dopamina y de otros transmisores, son muy tiroxínicos y GFAP positiva, que es el enzima limitante para producir la dopamina, como dije también anteriormente.

Y estas células de tipo neuronal pertenecen al sistema nervioso periférico y son las células quimiosensoras las que liberan dopamina y transmisores que activan las fibras sensoriales aferentes.

Estructura del cuerpo carotideo; las células glía-like

Y un segundo tipo, célula tipo II, que es de tipo sustentacular, se le llama glía-like, porque se tiñe con este marcador que es la proteína ácida fibrilar de la glía, la GFAP. Y esta célula se piensa que tiene un papel de sostén nutritivo y metabólico de las células tipo I.

**Dopamina y GDNF en células glómicas**

Pues bien, además de que estas células son muy ricas en dopamina, en mi grupo de investigación demostramos –hace ya bastantes años; se publicó en el año 2005–, que las células tipo I, además de tener mucha dopamina, producen mucho GDNF.

**Las células glómicas TH+ producen GDNF**

Y con este modelo animal al que yo me refería anteriormente, en el que hay un knockin donde se quita el exón I de GDNF y se introduce el enzima galactosidasa, pudimos demostrar que en el cuerpo carotideo, igual que luego hemos visto en cerebro, las células que producen GDNF, estas células con este marcador, son las células TH positivas, y no las GFAP positivas.

Es decir, que las células tipo II, gliales, estas células no producen GDNF, las que producen GDNF son estas células glómicas.

Es decir, tenemos unas células que son altamente dopaminérgicas. Que liberan dopamina en respuesta a la hipoxia, a la falta de oxígeno en el medioambiente, y además son células muy ricas en GDNF.

**El cuerpo carotideo es muy rico en GDNF**

Cuando medimos GDNF proteína –mediante un método de lixa de muy alta sensibilidad–, pudimos ver cómo en el cuerpo carotideo, cuando se mide en picogramos por miligramo de proteína; ¿cuánta GDNF hay en esta estructura? Y si se compara con otra estructura del sistema nervio-

**José López Barneo**

Neuroprotección y terapia celular en la enfermedad Parkinson

---

**CONFERENCIA**

---

so periférico, se observa cómo el cuerpo carotideo es un órgano muy rico en GDNF.

**Hipótesis de trasplante de cuerpo carotideo**

Entonces si tiene mucho GDNF y dopamina, pensamos que podía ser un magnífico órgano para utilizar trasplantes en enfermos de Parkinson.

Pero como hemos visto anteriormente, en la parte anterior de mi charla, en los enfermos de Parkinson, no solamente hay falta de dopamina en el estriado, sino que acabamos de ver que el GDNF hace falta para el mantenimiento de la vía nigroestriatal.

Pensamos que con este órgano no solamente suministrábamos alguna dopamina, que mal no viene, en el estriado, sino que además estas células liberarían GDNF, actuarían como micro bombas que liberarían GDNF y ayudarían a mantener la vía nigroestriatal.

**Experimentos preclínicos**

Pues bien, para corroborar esta hipótesis hemos hecho toda una serie, muy larga, de experimentos preclínicos –en modelos animales tanto de rata como de ratón, incluso de mono–, mostrando el efecto protector del cuerpo carotideo; del trasplante del cuerpo carotideo de la vía nigroestriatal.

Pero traigo este modelo, que a mí me gusta particularmente –que está todavía sin publicar–, hecho precisamente en ratón hace un año, año y medio. En el cual, en este modelo, lo que hacemos es estudiar un animal de experimentación; un ratón.

Aquí se ve un ratón normal; esta es la sustancia negra, este es el estriado, esta sería la vía nigroestriatal, que es una vía homolateral. Cada sustancia negra proyecta los axones a su estriado correspondiente.

Estos animales, si se les trata de forma crónica con un tóxico; el MPTP. Se produce un modelo animal de parkinsonismo muy parecido a lo que se observa en el hombre. Y pasado un tiempo si se están tres meses inyectando MPTP, se observa una destrucción de esta parte de aquí –fina–, de la sustancia negra, que se llama la pars compacta. Se respeta bastante la VTA, –esta otra zona–, y esto es muy típico, muy característico de lo que ocurre en el parkinsonismo humano y como hay mortalidad de estas neuronas, desaparece la tinción en el estriado, desaparece la vía nigroestriatal.

**José López Barneo**

Neuroprotección y terapia celular en la enfermedad Parkinson

---

**CONFERENCIA**

---

**El efecto neuroprotector del cuerpo carotideo**

Este modelo animal es muy bueno porque se puede hacer lo siguiente. Se puede en este animal utilizarlo para –en el mismo animal, que tiene un parkinsonismo bilateral–, en una parte de cerebro hacer una operación en la que se inyecta solamente salino y en la otra parte del cerebro del mismo animal, bajo la cirugía, se inyecta cuerpo carotideo. Entonces, el mismo animal sirve de control propio y te permite una robustez muy grande a la hora de analizar el efecto protector.

En estos animales de experimentación, por hacer la historia corta –este es un artículo que está todavía en fase de ser evaluado en una revista y se publicará, espero, en breve–, se muestra como en la parte del cerebro donde se trasplanta salino, la destrucción de neuronas es muy superior a la parte del cerebro donde se inyecta el graft, el trasplante del cuerpo carotideo. Indicando que el cuerpo carotideo –como ya habíamos demostrado anteriormente, pero en modelos menos robustos–, el cuerpo carotideo tiene un efecto protector, y muy importante, sobre esta célula.

Pues bien, este modelo experimental, digamos, demuestra una vez más el papel neuroprotector del cuerpo carotideo trasplantado en el estriado, casi seguro por la liberación de GDNF o de algunos otros factores neurotróficos que contribuyen con el GDNF a mantener la vía nigroestriatal.

**Dos ensayos clínicos piloto**

Basándonos en estas observaciones preclínicas, pusimos en marcha en el año 2003, y posteriormente en el año 2007, dos ensayos clínicos piloto, cada uno de ellos con seis pacientes, a los que les hicimos un auto-trasplante del cuerpo carotideo.

El cuerpo carotideo es bilateral, se sabía, porque está muy bien documentado en la literatura, que se puede extraer un cuerpo carotideo de un paciente. Y en el mismo acto quirúrgico se le extrae el cuerpo carotideo, se trocea el cuerpo carotideo, y estos trozos de cuerpo carotideo se inyectan por una cánula que se localiza en el interior del cerebro mediante esterotaxia.

Una vez que se inyectan estos trocitos de cuerpo carotideo –aquí se dejan varios miles de células liberando GDNF, presumiblemente–, posteriormente se retira la cánula y se dejan estas mini bombas de GDNF actuando en el paciente.

**José López Barneo**

Neuroprotección y terapia celular en la enfermedad Parkinson

---

**CONFERENCIA**

---

Se iniciaron, como digo, dos ensayos clínicos, uno en 2003 y otro en 2007. Ambos fueron publicados en dos artículos científicos distintos. Y aquí se ve un poco –en esta figura y en la siguiente–, el mensaje más importante que aprendimos con este tipo de investigación.

**Datos del primer ensayo clínico**

Aquí se ilustra, en el primer ensayo clínico, hay seis pacientes.

Se ven aquí en ordenadas el estado clínico de los pacientes antes del trasplante, llamándole a cada paciente comparado consigo mismo cien por ciento. Y vemos cómo cambia el estado clínico durante el tiempo después del trasplante.

Aquí hacia abajo es mejoría clínica y hacia arriba empeoramiento clínico, y se observa cómo de los seis pacientes trasplantados, cinco mostraron algún nivel de mejoría, uno no mostró ninguna mejoría y posteriormente se observó una progresión de la enfermedad más o menos siguiendo la progresión que se espera de un paciente de Parkinson normal.

Estos pacientes que observaron mejoría, todos ellos, casi alcanzaron un pico a los seis, doce meses, y posteriormente han ido volviendo al nivel prequirúrgico.

En el tercer año después del trasplante todavía había dos pacientes –de estos cinco–, había dos que habían vuelto al nivel prequirúrgico y tres de ellos todavía mostraban un nivel de mejoría del 15 al 48%.

Particularmente uno de estos pacientes, el que tenía una mejoría del 48%, es un paciente que después de siete años todavía no ha vuelto al nivel que tenía prequirúrgico antes del trasplante. Volvió a conducir, en fin, se encuentra en un estado motor bastante bueno.

Pues bien, este estudio clínico nos pareció muy interesante, aunque realmente es de una potencia de mejora clínica inferior a lo que habíamos observado en los animales de experimentación.

Eso por desgracia suele ocurrir con la transferencia de conocimiento básico a la clínica; lo que se llama lost in traslation. Cuando uno tiene algo y lo traslada a la clínica, por desgracia no es todo lo eficaz que uno desearía, y que se esperaba. Pero sí nos pareció realmente que había un efecto biológico en el trasplante bastante claro.

**José López Barneo**

Neuroprotección y terapia celular en la enfermedad Parkinson

---

**CONFERENCIA**

---

**Datos del segundo ensayo clínico**

Quiero un poco, por no cansar al auditorio, hacer la historia un poco más corta.

En un segundo estudio clínico que hicimos a los pacientes se les hizo un PET –se les hizo el PET en Inglaterra, antes y después del trasplante–, para demostrar objetivamente el incremento de dopamina en el cerebro de aquellos pacientes que mostraban mejoría clínica.

Los resultados fueron muy parecidos a lo visto en este primer ensayo. Y mostraban una cierta correlación entre el nivel de dopamina en el cerebro y la mejoría clínica; indicando que parecía un efecto biológico, robusto, producido por el trasplante. Este segundo estudio clínico se publicó en 2007.

**Los factores pronóstico del trasplante**

Pero en 2007, 2008, dejamos de hacer trasplantes en humanos porque nos parecía, como os digo, que había habido cierta pérdida en la traslación del conocimiento básico a la clínica.

Y que la mejoría clínica, sobre todo la variabilidad de la respuesta clínica, nos obligaba a investigar con detalle cuáles eran los factores pronóstico que determinaban el que después de un trasplante unos pacientes mejoren mucho y otros pacientes no mejoren nada; ¿qué factores nos permitían predecir el efecto del trasplante?

Y de esos factores vimos dos factores importantes y un tercero muy importante; el más importante.

**La edad del paciente y la gravedad del PD**

Los factores importantes son la edad del paciente. Vimos que en pacientes más jóvenes –con menos edad–, mejoran más. Aquí mejoría es hacia abajo, como siempre.

Y el segundo factor pronóstico era la gravedad de la enfermedad.

De los doce enfermos –seis y seis, de los dos estudios, unidos los dos–, de los doce enfermos, cuando uno hace un ensayo clínico en algo que está experimental, te obliga la Comisión Ética del hospital, a coger pacientes en estadios muy avanzados de la enfermedad, porque si no, no es éticamente correcto.

## José López Barneo

Neuroprotección y terapia celular en la enfermedad Parkinson

---

### CONFERENCIA

---

Nosotros pudimos, por diferentes razones, utilizar solamente tres pacientes en estados intermedios del parkinsonismo y nueve con un parkinsonismo avanzado.

Y observamos de nuevo que aquellos pacientes menos afectados son los que más progresaban; mejor efecto tenía sobre ellos el trasplante. Por lo tanto, jóvenes y poco afectados hay un efecto mayor de trasplante, lo cual es lógico si el efecto es neurotrófico.

Si el efecto mayor del trasplante es de tipo neurotrófico –porque libera factores neurotróficos–, es lógico que aquellos pacientes más jóvenes, que tienen todavía una vía nigroestriatal menos enferma; esa vía nigroestriatal, por el estímulo trófico, se va a permitir estimular mejor. Y por lo tanto va a haber una recuperación funcional mejor.

#### **La cantidad de tejido trasplantado**

Pero además de estos dos factores, el factor más importante, con diferencia, era la cantidad de tejido trasplantado.

Ya desde el principio los cirujanos, que son muy prácticos, y de una paradójica con la que los científicos nos entendemos mejor; a veces se entiende el científico mejor con un cirujano que con un médico clínico.

Los cirujanos son muy prácticos, van a lo positivo, etcétera, etcétera. Y desde el primer momento decían; esto no va a funcionar, esto es demasiado pequeño.

#### **Una ‘lenteja’ que no iba a funcionar**

El cuerpo carotideo en el hombre es como una lenteja. Y cuando una lenteja la troceas en el laboratorio y la metes por una cánula, ya decían los cirujanos que aquello se iba a perder en el cerebro; no iba a funcionar, etcétera, etcétera.

#### **El ida y vuelta de lo clínico a lo básico**

Entonces, realmente es así, creemos que es muy poco tejido. Entonces, con la idea de conseguir más tejido iniciamos en nuestro grupo de experimentación una investigación básica. De nuevo quería un poco hacerles ver esta idea: “de la clínica ir a lo básico y de lo básico ir a lo clínico”.

Una investigación básica que voy a explicar en los próximos cinco u ocho minutos –para terminar–, que nos ha llevado a replantear toda esta

**José López Barneo**

Neuroprotección y terapia celular en la enfermedad Parkinson

---

**CONFERENCIA**

---

investigación tan relacional, que estaba comentando en esta segunda parte de mi seminario.

**Un órgano que crece de tamaño en adulto**

La investigación se fundamenta en que el cuerpo carotideo, que es un órgano que pertenece al sistema nervioso periférico, tiene una particularidad muy interesante, no vista en ningún otro órgano del sistema nervioso, y es que crece de tamaño en el adulto.

**El cuerpo carotideo crece con la altura**

Cuando una persona que vive –Córdoba está ya a 300 o 400 metros sobre el nivel del mar, pero Sevilla, que está a 8 metros sobre el nivel del mar–, si un sevillano va a La Paz, que está a 3.800 metros sobre el nivel del mar, en Bolivia, el cuerpo carotideo crece de tamaño. Eso está muy bien documentado; crece de tamaño.

Como su función biológica fundamental es regular el oxígeno que entra dentro del cuerpo, en ausencia de una hipoxemia crónica, como la que se produce a grandes alturas, el cuerpo carotideo reacciona creciendo para activar con mayor potencia, con mayor fuerza, al centro respiratorio.

**Un experimento a 5.800 m. de altura**

Pues bien, aquí se observa en un animal de experimentación un cuerpo carotideo normal. Y dos semanas después de que este animal estuviese en una atmósfera de alrededor del 10% de oxígeno –que es equivalente a una altitud de 5.500 metros, 5.800 metros–, se observa un crecimiento del parénquima del cuerpo carotideo.

Esto que se conocía desde hace tiempo, en nuestro grupo lo hemos investigado con detalle. Hemos estudiado cómo se hace esto; cómo es el pulso temporal, qué células crecen, qué células no crecen, etcétera, etcétera´.

**Población de células madre quiescente**

Y, para hacer la historia corta, nos encontramos con que el crecimiento del cuerpo carotideo se debe a que existe una población de células madre adultas que se encuentran en el órgano; que están quiescentes y que no tienen ninguna función, aparentemente, en los sujetos normales.

Y que cuando las personas se van a grandes alturas, o tienen una enfermedad pulmonar obstructiva crónica que le interrumpe el intercambio de

**José López Barneo**

Neuroprotección y terapia celular en la enfermedad Parkinson

---

**CONFERENCIA**

---

oxígeno –un fumador crónico, por ejemplo, le interrumpe el cambio de oxígeno del aire con la sangre–, se produce una hipertrofia compensadora del cuerpo carotideo para permitirle vivir. Para permitirle hiperventilar con mayor frecuencia y estar introduciendo más oxígeno permanentemente.

**Ensayos de neuroesferas**

En esta hipertrofia investigamos las células madre. Las identificamos mediante un ensayo que consiste en que se coge cuerpo carotideo –se pone in vitro–, y al ponerse in vitro en los tejidos donde hay células madre producen unos crecimientos clonales, unos clones, en el cual son como colonias y en el cual todas esas células derivan de la célula progenitora, o célula stem, o célula madre, de donde proceden.

Entonces, en el caso del cuerpo carotideo, cuando hacemos ensayos de neuroesferas –que se llaman–, aparecen estas colonias medio esféricas. Al principio son esféricas, como aquí se ve, pero luego cambian de forma. Y estas colonias esféricas, se observan.

**Single Deposition Experiments**

Aquí se ve un experimento que es muy inequívoco, porque lo que se hace es lo que le llaman Single Deposition Experiments, en el que cogemos células del cuerpo carotideo y las plantamos una a una en diferentes pocillos.

Entonces, donde no hay células madre se acaba muriendo la célula pasados varios días.

Donde hay una célula madre esa célula madre crece y si se hace una foto en días seguidos; se sigue el crecimiento de esa colonia.

Aquí se puede ver cómo de esta célula madre a los cinco días se generó una colonia de 30 o 40 células y posteriormente una colonia más grande.

**Fases de crecimiento y diferenciación**

Cuando se tiñen estas colonias –estas neuroesferas–, se observa que una primera fase de crecimiento, en la que las nuevas células formadas se tiñen muchas de ellas con un marcador que es la lectina, que es un marcador característico de progenitores neurales.

**José López Barneo**

Neuroprotección y terapia celular en la enfermedad Parkinson

---

**CONFERENCIA**

---

Y pasado el tiempo comienza a aparecer aquí como un brote; como un retoño, como un brote de crecimiento, como si fuese un vegetal, donde aparece un bark, como le llaman en inglés; un rebrote.

Son células diferenciadas que comienzan a parecerse muchísimo a las células del cuerpo carotideo que se tiñen con tiroxina hidroxilasa y son células dopaminérgicas.

**Células glómicas**

Es decir, que in vitro se produce una fase de proliferación de crecimiento y luego de diferenciación hacia células glómicas, hacia células TH+.

Realmente, si se deja pasar bastante tiempo, estas neuroesferas, tienen un core, una parte central, que es de progenitores neurales, y un bleb –que le llaman en inglés, y que puede ser más o menos grande según se le deje más o menos tiempo–, donde aparecen células tiroxina hidroxilasa positiva, que son células glómicas.

Tanto es así que cuando se estudian estas células neoformadas –estas células glómicas neoformadas, que digo que son células glómicas, las células tipo I del cuerpo carotideo, las células quimiorreceptoras–, cuando se estudian in vitro las células neoformadas, se observa que tienen canales iónicos de potasio y de calcio, igual que tienen las células glómicas in situ.

Y en respuesta a hipoxia, e incluso a hipoglucemia, liberan catecolamina. Es decir, se comportan a nivel fisiológico igual que las células del cuerpo carotideo in situ. Es decir, que las células neoformadas in vitro son idénticas que las células que hay en el cuerpo carotideo.

**Las nuevas células producen GDNF**

Y finalmente cuando se estudia –simplificando lo que aquí se muestra–, cuando se estudian células neoformadas, es decir; una célula que es TH-positiva, y BRDU-positiva, es decir, que está recién hecha, recién dividida de otra célula progenitora. Y se utiliza este modelo de animales en el que se expresa –por X-gal se puede ver la actividad del promotor de GDNF–, se observa que estas células son también X-gal positivas.

Es decir, que las células neoformadas en las neuroesferas, in vitro, a partir de células madre, expresan no solamente dopamina, responden a hipoxia, sino también son GDNF positiva, producen GDNF.

**José López Barneo**

Neuroprotección y terapia celular en la enfermedad Parkinson

---

## CONFERENCIA

---

Entonces, todo este tipo de observación experimental nos llevó a pensar que el cuerpo carotideo –desde el punto de vista de investigación básica–, no es solamente un órgano neurogénico, que es capaz de producir nuevas neuronas.

Porque lo que hemos demostrado que son las células madre del cuerpo carotideo –voy a entrar brevemente a enseñarles una figura que presenté antes–, en el cuerpo carotideo las células madre han resultado ser las células tipo II, las células gliales, que parecían simplemente células sustentaculares que no hacían nada más que estar ahí.

Se ha demostrado que son unas células tipo II. Y curiosamente estas tipo II, en respuesta a hipoxia, se convierten en unas células intermedias, que es nestina positiva, y ellas se diferencian a esas células glómicas productoras de dopamina y de GDNF.

### **Neurogénesis en Sistema Nervioso Central**

Este modelo de crecimiento del cuerpo carotideo es muy interesante porque se parece muchísimo en sus principios fundamentales a los modelos de crecimiento que en los últimos tiempos se han descrito; los modelos de neurogénesis, que se han descrito en el sistema nervioso central.

En los últimos años se ha demostrado que en el cerebro adulto de los mamíferos, incluido el hombre, existen dos zonas, –una de ellas la zona subventricular–, que producen nuevas neuronas in vivo. Se producen neurogénesis toda la vida. Y hoy en día, como es obvio, se investiga muchísimo, porque naturalmente tener un cerebro humano capaz de producir nuevas neuronas es fundamental para ver si esas neuronas nos pueden ayudar a vencer enfermedades traumáticas, degenerativas, hipóxicas, etcétera, etcétera.

### **Neurogénesis en el cerebro**

El modelo de neurogénesis en el cerebro, que aquí está representado, consiste en que una célula madre neural, que es GFAP positiva, es una célula glial –se diferencia de una célula que se llama amplificadora transitoria, que aquí no está puesto, pero que es nestina positiva–, y de aquí surge el neuroblasto, la neurona que luego madura.

En este modelo hemos demostrado que el cuerpo carotideo es idéntico. En el cuerpo carotideo, a partir de las células –no presento los experimentos que lo demuestran para no hacer la historia más larga.



## José López Barneo

Neuroprotección y terapia celular en la enfermedad Parkinson

---

### CONFERENCIA

---

Pero las células sustentaculares, que son GFAP positivas, son las células madre, que en respuesta a hipoxia comienzan a proliferar, y producen esta primera fase de células de proliferación durante unos pocos días, células nestina positivas.

Y eventualmente estas células se convierten in vitro, en vivo, a células glómicas TH-positivas.

#### **La producción in vitro de neuroesferas**

Esta observación de valor fundamental, de valor científico básico, sin embargo tiene un valor traslacional muy grande.

Porque naturalmente nos permite vencer, o intentar reabordar de nuevo, la transferencia tecnológica que habíamos iniciado años antes, intentando vencer lo que ya te comentaba, que el mayor obstáculo para que el cuerpo carotideo pudiese tener un efecto terapéutico mayor en pacientes de Parkinson, era el tamaño del tejido.

Lo que se cae por su peso obvio, después de la observación experimental, es que lo que deberíamos hacer es extraer un cuerpo carotideo y no trasplantarlo en el momento sino dejarlo in vitro, y hacerlo expandirse.

Y una vez expandido el tejido in vitro, obtener muchas neuroesferas de un cuerpo carotideo. Cada una de ellas lo más grande posible para incrementar el mayor número de células.

Y estas neuroesferas implantarlas dentro del cerebro para que afecten –neuroesferas que producen dopamina y GDNF, como antes he mostrado–, pues produzcan el efecto terapéutico al que ya me refería anteriormente.

#### **Creación de la tecnología de producción**

Pues bien, finalmente, concluyo en breve, lo que estamos haciendo en nuestro laboratorio es intentar esta tecnología, que se ha protegido con una patente. Y se ha licenciado por una empresa del grupo Genetric, que se ha creado ad hoc para el desarrollo de esta tecnología.

Lo que estamos intentando en pacientes –aquí se ve una bifurcación carotidea de un paciente–, en el contexto de los trasplantes de órganos, igual que se extrae hígado o se extrae el corazón, extraer la bifurcación carotidea.

**José López Barneo**

Neuroprotección y terapia celular en la enfermedad Parkinson

---

**CONFERENCIA**

---

Esta es la grasa que recubre en una persona normal a la bifurcación carotidea. Una vez limpiada la grasa se queda el cuerpo carotideo libre y se extrae el cuerpo carotideo.

**El estudio del cuerpo carotideo humano**

Y lo que estamos investigando es –por cierto, estaba muy poco investigado el cuerpo carotideo humano–, y entonces estamos investigando con detalle el cuerpo carotideo humano.

Aparece igual que el cuerpo carotideo de animales –como era de esperar–, formando clusters o glomélulos; grupos de células que son TH+, o dopamina de carboxilasa positiva, que es otro enzima que utilizamos para identificar las células que producen catecolaminas, que producen dopamina.

Estas son diferentes observaciones. Es muy interesante ver cómo en donantes humanos, desde 10 años hasta 61 años, la proporción de células TH+ varía.

Pero no varía mucho, lo que indica que el cuerpo carotideo mantiene su integridad estructural durante la edad avanzada. Lo cual nos permite obtener cuerpos carotideos de donantes mayores o hacer autotrasplantes, como habíamos comentado anteriormente.

**Nichos neurogénicos en cuerpo carotideo**

En el cuerpo carotideo hemos podido identificar que existen –en el cuerpo carotideo humano, estos son cortes histológicos del cuerpo carotideo in situ–. existen estas células TH+, aquí en rojo, y la nestina positiva, que hemos comentado anteriormente.

Es decir, existe nichos neurogénicos en el cuerpo carotideo humano; se produce neurogénesis en el cuerpo carotideo del hombre; y se pueden hacer neuroesferas que se comportan cualitativamente de forma muy parecida a neuroesferas de DAP.

Por desgracia el proceso de crecimiento de las neuroesferas de DAP lo tenemos muy bien optimizado. Sin embargo el crecimiento de estas zonas de diferenciación donde están las células TH+ y GDNF positiva en el caso del material humano, me está costando mucho trabajo realmente ponerlo a punto.

## José López Barneo

Neuroprotección y terapia celular en la enfermedad Parkinson

---

### CONFERENCIA

---

Pero en fin, estamos en ello, investigando para poner a punto esta tecnología para poder hacer trasplantes de neuroesfera en pacientes.

Y finalmente, un poco para mostrarles también que el grupo carotideo, tanto de pacientes de edad avanzada, de 66 años, como de donantes más jóvenes, expresa GDNF. Lo que indica que además de ser dopamínrgico, produce mucho GDNF, lo cual avala su uso en trasplantes.

#### **El reto de la producción del GDNF**

Por lo tanto, para concluir; ya antes me refería a que el neurotrofismo tiene un papel importante a nivel fisiológico en preservar la vía nigroestriatal en animal adulto.

Por lo tanto el manejar la producción de GDNF, bien sea GDNF exógeno o GDNF endógeno, de forma correcta, es un campo de desarrollo tecnológico interesantísimo, que se debe desarrollar en el futuro, y de hecho además de nosotros hay empresas tecnológicas que ya están en marcha.

#### **La producción de GDNF recombinante**

Antes me he referido a una que está haciendo inyección de GDNF; la que tiene la patente del GDNF recombinante, está haciendo inyección de GDNF recombinante en brotes, no de forma mantenida.

#### **La activación de células propias**

Y por último, lo que antes decía, que una forma de administrar GDNF dentro del cuerpo, puede ser activando las propias células que lo producen o trasplantando GDNF exógeno, pero no GDNF recombinante, sino GDNF producido por células, que es la patente que nosotros tenemos en este momento licenciada.

Y por lo tanto esto debería ser una tecnología, que si conseguimos no es fácil, pero si conseguimos llevarla a buen término podría ser un abordaje terapéutico muy interesante en la enfermedad de Parkinson.

#### **El grupo de trabajo y los colaboradores**

Y para terminar, pues este trabajo –que resume un poco la tarea experimental de mi grupo durante los últimos 10, 12 años–, ha tenido la colaboración de diferentes personas.



**José López Barneo**

Neuroprotección y terapia celular en la enfermedad Parkinson

---

**CONFERENCIA**

---

Aquí un poco están las personas más importantes del grupo. Voy a citar simplemente a Juan José Toledo Aral, que ha sido muy importante en todos los temas de trasplante de cuerpo carotideo.

A Ricardo Pardal y a Patricia Ortega, que han sido fundamentales en el trabajo de identificación y caracterización de las células madre del cuerpo carotideo.

Y Alberto Pascual y María Hidalgo Figueroa que han sido los primeros autores de la publicación donde describimos el animal knockout condicional para GDNF.

Y luego hemos tenido una financiación muy generosa de diferentes instituciones públicas y privadas, últimamente particularmente de la Fundación Botín, que financia nuestros grupos de investigación.

Y colaboradores externos también muy importantes. Entre ellos los doctores Mínguez-Castellanos y Arjona, del Hospital Virgen de las Nieves, con los que hicimos los trasplantes de cuerpos carotideos en pacientes. Los dos estudios piloto que se han hecho se hicieron con ellos, y por diversas razones en su hospital había unas características tecnológicas que aconsejaban hacerlo allí en vez del hospital donde yo trabajo.

Y por último, en uno de los dos ensayos clínicos, en el segundo, a los pacientes se les hizo un PET antes y después de la cirugía para determinar la cantidad de dopamina que había en el cerebro, antes y después del trasplante, mediante la tecnología, una tomografía por emisión de positrones, llamado PET, y esto lo hicimos en el hospital Hammersmith de Londres, colaborando con los doctores David Brooks y Gary Hotton.

Muchas gracias por la atención.