

Universidad de Miguel Hernández de Elche

Máster en Biotecnología y Bioingeniería



**Reprogramación celular. Modulando las vías de
señalización determinantes del destino neuronal.**

Trabajo de fin de máster

2019-2021

Autor/a: Vira Sharko

Tutor/a: Antonio Vicente Ferrer Montiel

Cotutor/a: Clotilde Ferrándiz Huertas

Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche

RESUMEN

El presente trabajo se plantea con el objetivo de determinar la efectividad de un protocolo de diferenciación directa, basado en la modulación de la expresión génica y de vías de señalización involucradas en la neurogénesis, para la obtención de un modelo neuronal nociceptivo humano a partir de fibroblastos neonatales. Para ello, se ha empleado un diseño experimental estructurado en tres bloques: un primer bloque de producción de lentivirus para la transducción de los fibroblastos con los genes determinantes del linaje neuronal sensorial, un segundo bloque dedicado al diseño y optimización de un protocolo de diferenciación compuesto por pequeñas moléculas señalizadoras y neurotrofinas, y un tercer bloque dirigido hacia la caracterización de las células inducidas mediante análisis morfológicos, genéticos y moleculares. Los resultados derivados de este planteamiento ponen de manifiesto una serie de patrones morfológicos que evocan las estructuras adoptadas por las neuronas endógenas durante el desarrollo embrionario. Estos cambios vienen respaldados por los niveles de expresión de marcadores neuronales específicos, los cuales, además, pueden relacionarse con la exposición a determinadas moléculas del protocolo. En conclusión, este estudio permite la obtención de un modelo neuronal nociceptivo inicial, sentando las bases para la investigación de modelos sensoriales más avanzados, eléctrica y funcionalmente relevantes, para el estudio del dolor neurológico humano.

ABSTRACT

The present work is intended to determine the effectiveness of a direct differentiation protocol, based on the modulation of gene expression and signalling pathways involved in neurogenesis, in order to obtain a human nociceptive neuronal model from neonatal fibroblasts. For this purpose, an experimental design structured in three blocks has been used: the first block is focused on the production of lentivirus for the transduction of fibroblasts with sensory neuronal lineage determining genes, the second block is dedicated to the design and optimization of a differentiation protocol composed by small signalling molecules and neurotrophins, and the third block is directed towards the characterization of the induced cells through morphological, genetic and molecular analysis. The results derived from this approach reveal a series of morphological patterns that evoke the structures adopted by the endogenous neurons during the embryonic development. These changes are supported by the expression levels of specific neuronal markers, which, in addition, can be related to the exposure to certain molecules of the protocol. To sum up, this study allows the obtention of an early nociceptive model, laying the foundations for the investigation of more advanced, electrically and functionally relevant sensory models, for the study of human neurological pain.

PALABRAS CLAVE

Brn3a / Ngn2

Diferenciación directa

Dolor neuropático

Fibroblastos neonatales

Neuronas nociceptivas peptidérgicas

Pequeñas moléculas de señalización

SIGLAS Y ABREVIATURAS

Ascl1 (achaete-scute homolog 1)

TUBIII (3- β tubulina)

BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*)

cAMP (adenosín monofosfato cíclico)

db cAMP (dibutiril adenosín monofosfato cíclico)

CCN (células de la cresta neural)

CGRP (*calcitonin gene-regulated peptide*)

Ct (*cycle threshold*)

DMSO (dimetil sulfóxido)

dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfato)

DEPC (dietilpirocarbonato)

EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)

EGF (*epidermal growth factor*)

FACS (*fluorescence-activated cell sorting*)

FBS (*foetal bovine serum*)

FGF (*fibroblast growth factor*)

FITC (*fluorescein isothiocyanate*)

FSC (*forward scatter*)

GDNF (*glial-derived growth factor*)

HAdV-5 (*human adenovirus type 5*)

HDFn (*human dermal fibroblasts, neonatal*)

HEK 293 (*human embryonic kidney cells*)

HGF (*hepatocyte growth factor*)

iPSCs (*induced pluripotent stem cells*)

MAP2 (*microtubule-associated protein 2*)

MEM NEAA (*non essential aminoacids*)

MOI (*multiplicity of infection*)

NGS (*normal goat serum*)

NGF (*nerve growth factor*)

Ngn2 (neurogenina 2)

NT-3 (neurotrofina 3)

NTC (*non-template control*)

RT- qPCR (*real-time quantitative PCR*)

SHH (*sonic hedgehog*)

SP (*substance P*)

SSC (*side scatter*)

TrkA (*tropomyocin receptor kinase A*)

TRPV1 (*transient receptor potential vanilloid subfamily, member 1*)

TU (*transduction units*)

ÍNDICE

Introducción y antecedentes	1
Estado del arte en diferenciación neuronal	3
Procedimiento de diferenciación	6
Objetivos	11
Procedimiento experimental.....	13
Cultivos celulares	13
Protocolo de diferenciación.....	15
Caracterización de las células diferenciadas	17
Producción y titulación de vectores lentivirales.....	21
Resultados	26
Discusión	36
Conclusiones	43
Bibliografía.....	45
Anexos.....	47

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

En la actualidad existe un sinnúmero de enfermedades como el cáncer, la diabetes, el sida y la artritis, asociadas a un dolor agudo crónico de origen neuropático. A pesar de los grandes avances en la comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen al dolor neuropático y en la identificación de posibles dianas terapéuticas que se han producido en las últimas décadas, sigue siendo estrecho el rango de fármacos analgésicos en uso, siendo la mayoría opioides genéricos y medicamentos antiinflamatorios, que generalmente resultan ineficaces y presentan problemas de seguridad (Wilson et al., 2018).

El dolor neuropático, causado por lesiones o enfermedades que afectan al sistema somatosensorial, se transmite a través de las neuronas sensoriales nociceptivas con fibras amielínicas (C y A δ), siendo mediado por los receptores de la superfamilia de canales iónicos permeables a calcio TRP (*transient receptor potential*). Dentro de esta familia, el receptor TRPV1 (*TRP vanilloid subfamily, member 1*) es el miembro más estudiado. Se trata de un canal polimodal activado por gran variedad de estímulos físicos, como la temperatura y el pH; y químicos, incluyendo diversas moléculas endógenas y exógenas, así como compuestos vaniloides y canabinoides derivados del metabolismo lipídico (Dubin & Patapoutian, 2010). La activación del receptor TRPV1, causada por los estímulos descritos, produce la liberación de los neuropéptidos SP (*substance P*) y CGRP (*calcitonin gene-regulated peptide*), desencadenantes de la respuesta inflamatoria y responsables de la sensación de dolor. El receptor TRPV1, por lo tanto, es la principal diana de los medicamentos utilizados para el alivio del dolor neuropático, tanto antagonistas como agonistas desensibilizantes. Como consecuencia, la disponibilidad de un modelo celular que simule adecuadamente el subtipo neuronal nociceptivo que lo expresa, también conocido como TrkA (*tropomyocin receptor kinase A*), resulta de inminente necesidad para facilitar el estudio del receptor dentro del contexto celular apropiado *in vitro*.

Los métodos tradicionales para el estudio de los mecanismos implicados en dolor se han centrado principalmente en la extracción de neuronas sensoriales a partir de modelos animales. Estos modelos experimentales, sobre todo basados en roedores, aunque en líneas generales resulten útiles para recapitular información acerca de los circuitos endógenos del sistema

nervioso, suelen diferir enormemente de los mecanismos de percepción del dolor humanos. Además, son incapaces de reflejar las diferencias genéticas interindividuales que tanta influencia tienen en la respuesta a compuestos nociceptivos, razón por la cual muchos analgésicos prometedores suelen fallar en las últimas fases de los ensayos clínicos (Blanchard et al., 2015). Todo ello sin tener en cuenta los altos costes experimentales y las implicaciones éticas que limitan en gran medida el uso de los modelos animales en la actualidad.

Por otro lado, dentro de los modelos humanos, también existe la posibilidad de emplear neuronas cadavéricas. No obstante, su reducida disponibilidad y limitación para ser alteradas genéticamente las ha convertido en un modelo muy restrictivo para estudios extensivos (Blanchard et al., 2015). Frente a estos modelos celulares limitados, los modelos de neuronas diferenciadas o reprogramadas se alzan como la alternativa más viable para llevar a cabo estudios mecanicistas de alto rendimiento y el testado masivo de fármacos analgésicos.

Hasta la fecha, el procedimiento de diferenciación celular más extendido ha sido la diferenciación desde células madre pluripotentes inducidas (iPSCs; *induced pluripotent stem cells*), basado en la sobreexpresión transitoria de factores de transcripción embrionarios en células somáticas para inducir su conversión hacia células madre (Lampert et al., 2020), que posteriormente pueden ser diferenciadas en el tipo celular de interés mediante modificaciones genéticas y/o epigenéticas. Gran diversidad de subtipos neuronales han podido generarse siguiendo este procedimiento. No obstante, en comparación con los protocolos de diferenciación orientados hacia la obtención de células del sistema nervioso central, ha resultado mucho más complicado desarrollar estrategias efectivas para obtener altas producciones de precursores de neuronas sensoriales (Lampert et al., 2020). Este hecho, sumado a la ausencia de marcadores patológicos de envejecimiento en las neuronas reprogramadas (Drouin-Ouellet et al., 2017), han sido los principales factores limitantes en el uso de dicho procedimiento para la generación de neuronas nociceptivas. Como alternativa, en la última década ha ido ganando fuerza el método de diferenciación directa (Blanchard et al., 2015), que tiene como objetivo la reprogramación de células mesenquimales, típicamente fibroblastos y leucocitos mononucleares, evadiendo la etapa de desdiferenciación hacia células madre. Este método se proclama como una estrategia potencialmente más rápida y selectiva para la producción de modelos celulares concretos.

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, el diseño y optimización de un procedimiento para la obtención de poblaciones de neuronas nociceptivas funcionalmente relevantes y

genéticamente diversas sería de gran utilidad para el testado de nuevos fármacos para combatir el dolor neuropático y el estudio de los mecanismos moleculares involucrados. Considerando que las neuronas nociceptivas tienen su origen en las CCN (células de la cresta neural) provenientes del ectodermo embrionario, se ha propuesto como finalidad para este trabajo evaluar la eficacia de un protocolo de diferenciación directa para inducir la reprogramación de fibroblastos neonatales hacia neuronas nociceptivas peptidérgicas, partiendo del contexto epitelial que tienen en común.

Estado del arte en diferenciación neuronal

La proliferación y diferenciación celular son fenómenos controlados por vías de señalización que promueven la expresión de factores de transcripción determinantes del destino celular en células madre mediante modificaciones epigenéticas (Smith et al., 2016). Teniendo esto en cuenta, diversos tipos celulares pueden reprogramarse hacia linajes específicos mediante dos estrategias: la primera es la inducción de la expresión de dichos factores de transcripción, bien sea mediante modificaciones genéticas (Blanchard et al., 2015), modificaciones epigenéticas o modificaciones post-transcripcionales con microRNAs (Chen et al., 2019); y la segunda es la modulación de las vías de señalización asociadas mediante la introducción de pequeñas moléculas estimuladoras o inhibitoras (Chambers et al., 2012). Basándose en esta información muchos laboratorios han logrado derivar con éxito diversos tipos neuronales específicos, como motoneuronas, neuronas dopaminérgicas y neuronas sensoriales, partiendo tanto de iPSCs como de fibroblastos.

El método principal y, a día de hoy, más relevante para la obtención de neuronas sensoriales periféricas se basa en la diferenciación de iPSCs mediante pequeñas moléculas reguladoras de vías de señalización, descrito por Chambers et al., (2012). El principio básico de este procedimiento es la doble inhibición de la vía de SMAD mediante el bloqueo de BMP (LDN193189) y TGF- β (SB431542); seguida de una diferenciación hacia CCN mediante la activación de la vía de WNT (CHIR99021) y la inhibición de la vía de Notch/Delta. El subtipo neuronal TrkA final se selecciona mediante una triple inhibición con las pequeñas moléculas CHIR99021, SU5402 y DAPT; entre las cuales CHIR99021 juega el rol dominante y en

combinación con las demás, aumenta la eficiencia del protocolo. La diferenciación concluye con la maduración de los CCN inducidos mediante la adición de neurotrofinas (NGF, BDNF, GDNF). El desarrollo de este procedimiento permitió la obtención de neuronas nociceptivas peptidérgicas y no peptidérgicas, cuya identidad pudo confirmarse no solamente mediante la expresión de marcadores neuronales, sino también mediante la caracterización electrofisiológica y farmacológica de las neuronas inducidas (Lampert et al., 2020).

Por el momento, este ha sido el método de diferenciación más aceptado, habiéndose realizado únicamente modificaciones menores sobre el mismo por diferentes grupos de investigación. Entre estas modificaciones se encuentra el aumento de la concentración o tiempo de exposición a inhibidores de SMAD, y el aumento del tiempo de exposición a CHIR99021, que se ha correlacionado con la selectividad por el subtipo neuronal nociceptivo. También se han reportado mejoras en la pureza neuronal con la introducción de agentes antimitóticos al comienzo de la maduración y una mejor adherencia cuando la superficie de los pocillos es tratada con laminina o fibronectina (Lampert et al., 2020). Además de esto, hay cierta discrepancia acerca de cuál debería de ser el tiempo de maduración óptimo de las neuronas diferenciadas, así como diversos planteamientos acerca de factores adicionales que pueden agregarse para aumentar la selectividad del método; aunque por el momento no se termina de comprender la relevancia que tienen este tipo de cambios puntuales en la eficiencia y especificidad del protocolo (Lampert et al., 2020).

El procedimiento de Chambers et al., (2012) ha sentado las bases para la diferenciación de neuronas periféricas, sirviendo como punto de apoyo para el desarrollo de los protocolos posteriores. Entre estos destaca el procedimiento de diferenciación a neuronas nociceptivas peptidérgicas partiendo de las células foliculares de la cresta neural descrito por Wilson et al., (2018), el cual se ha tomado como referencia para establecer la metodología de este trabajo. Este protocolo, de forma similar al anterior, se basa en la introducción de pequeñas moléculas de señalización (CHIR99021, LDN193189, DAPT y SHH) que, en última instancia, inducen la activación de los factores de transcripción reguladores de la neurogénesis, estimulando así la maduración de los CCN de origen. La principal diferencia de este método respecto al de Chambers et al., (2012) reside en la introducción de nuevas moléculas (NT-3, NGF, FGF, cAMP) y factores de crecimiento desde los primeros días del protocolo. El hecho de partir de células más diferenciadas que las iPSCs permite acortar el tiempo de reprogramación e introducir factores más selectivos, como el HGF (*hepatocyte growth factor*), determinante del

destino nociceptivo TrkA peptidérgico; con el fin de obtener subtipos neuronales más específicos. Este estudio resultó en un gran éxito, puesto que permitió seleccionar neuronas nociceptivas peptidérgicas funcionales sensibles a capsaicina y que expresan TRPV1, SP y CGRP, entre otros marcadores, de manera muy efectiva y sin necesidad de purificación ni manipulación genética (Wilson et al., 2018).

Paralelamente al método de Chambers et al., (2012) comenzaron a desarrollarse estrategias de modificación genética y/o epigenética que apuntasen directamente a la sobreexpresión de los factores de transcripción involucrados en la neurogénesis, para emplearse tanto de forma aislada como en combinación con el método anterior. Entre estas estrategias, el método de diferenciación directa desde fibroblastos mediante transducción con vectores virales regulados por doxiciclina de Blanchard et al., (2015) es una de las más destacadas. Este método permitió definir por primera vez las combinaciones de factores de transcripción que determinan la diferenciación de las neuronas sensoriales periféricas, eliminando de la ecuación el factor *Ascl1*, ampliamente utilizado en la diferenciación de otros tipos neuronales hasta el momento. El *Ascl1* (achaete-scute homolog 1) es el factor de transcripción central en el comienzo de la diferenciación de los neuroblastos durante el desarrollo embrionario y tiene una estructura básica de hélice-bucle-hélice (bHLH).

Siguiendo este procedimiento, se logró obtener una población heterogénea de neuronas sensoriales eléctricamente activas y químicamente relevantes mediante la coexpresión transitoria de otros dos factores bHLH, conocidos como los genes reguladores maestros *Ngn1* (neurogenina 1) y *Ngn2* (neurogenina 2), junto con el factor determinante del destino sensorial *Brn3a*; siendo capaces de discernir dentro de esta población cada uno de los subtipos sensoriales, definidos por el tipo de receptor Trk que expresan (*TrkA*, *TrkB*, *TrkC*). Aunque incluso más relevante resultó la revelación de *Ascl1* como un factor proneural genérico, capaz de impulsar la diferenciación neuronal con la misma eficacia que *Ngn1* y *Ngn2*, pero incapaz de generar neuronas sensoriales genotípicamente maduras.

Pese al gran éxito de ambos métodos por separado, fue la sinergia entre los dos la combinación vencedora en cuanto a eficacia y selectividad por el subtipo nociceptivo peptidérgico debido precisamente a la doble regulación, genética y química, que estas estrategias ejercen sobre los programas transcripcionales de las células mesenquimales. Ello quedó patente en diversos estudios, como el de Ladewig et al., (2012), en el cual se obtuvo una pureza de neuronas del sistema nervioso central superior al 80% mediante la transducción de un cultivo primario de

fibroblastos neonatales con los genes proneurales *Ascl1* y *Ngn2*, y posterior exposición de las células a los inhibidores de las vías de señalización de SMAD y WNT: SB431542, noggin y CHIR99021. El mismo cóctel molecular aplicado sobre cultivos primarios de fibroblastos adultos permitió la obtención de una pureza neuronal de alrededor del 40%, sugiriendo la competencia de este procedimiento como posible candidato para la reprogramación celular de alto rendimiento (Ladewig et al., 2012).

En conclusión, se puede afirmar que existe gran diversidad de estrategias de diferenciación hacia neuronas nociceptivas, todas ellas centradas en la activación de los programas proneurales en las células de origen. Desde una perspectiva general, parece haber un consenso acerca del papel de *Brn3a* en la especificación de las neuronas sensoriales, y la importancia del *Ngn1* y *Ngn2*, frente al *Ascl1*, en la maduración morfológica y fenotípica de las neuronas inducidas (Chen et al., 2019). Por otra parte, aunque se haya propuesto el uso de gran variedad de pequeñas moléculas, en general, todas ellas apuntan hacia la modulación de las mismas vías de señalización esenciales: SMAD, WNT, Notch/Delta y SHH (*sonic hedgehog*). De manera que las ligeras diferencias existentes entre distintos protocolos de diferenciación se deben generalmente a factores propios de etapas avanzadas de la especificación neuronal, enfocados en simular los cambios genéticos que experimentan las CCN durante el desarrollo (Lampert et al., 2020).

Procedimiento de diferenciación

En consonancia con los antecedentes descritos, el enfoque experimental implementado en este trabajo recopila algunas de las pequeñas moléculas y factores neurotróficos empleados en el protocolo de Wilson et al., (2018) en combinación con el procedimiento de transducción con los factores proneurales *Ngn2* y *Brn3a* de Blanchard et al., (2015). Estos protocolos, a su vez, se han fundamentado en la extensa bibliografía disponible acerca de los procesos de desarrollo neural en roedores, partiendo de la base de que la mayoría de vías de señalización maestras están altamente conservadas entre diferentes especies.

El destino neuronal sensorial se determina en etapas muy tempranas del desarrollo embrionario orquestado por la acción conjunta entre los programas genéticos intrínsecos y la influencia de factores externos sobre las CCN. Durante el proceso de diferenciación, las neuronas inmaduras avanzan a través de una serie de pasos de especificación que desembocan en el establecimiento jerarquizado de los diversos subtipos sensoriales, definidos por propiedades moleculares y funcionales únicas (Lallemend & Ernfors, 2012).

Las neuronas sensoriales se clasifican mediante la expresión de los receptores de factores neurotróficos TrkA, TrkB, TrkC, Met y Ret, los cuales responden selectivamente a las neurotrofinas NGF (*nerve growth factor*), BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), NT-3 (neurotrofina 3), HGF y la familia de GDNF (*glial-derived neurotrophic factor*), respectivamente (Bibel & Barde, 2000). De manera que la expresión inicial de los receptores neurotróficos en combinación con la actividad transcripcional de la célula establecen la base para la especificación neuronal sensorial.

Dentro de las neuronas nociceptivas TrkA+, se puede asimismo distinguir varias categorías: un subtipo TrkA que se especifica tempranamente, influenciado sobre todo por la expresión de Ngn2; y dos subtipos TrkA tardíos, determinados únicamente por la expresión de Ngn1 (Figura 1). El primero se corresponde con el subtipo peptidérgico y el segundo con el no peptidérgico (Lallemend & Ernfors, 2012). El subtipo TrkA peptidérgico, objetivo de este trabajo, se especifica en estadios embrionarios avanzados como un linaje de neuronas TrkA+/CGRP+/Met+ con fibras amielínicas. La expresión de los péptidos CGRP y SP se consigue con el descenso de la expresión de Runx1, asociada con la activación del receptor Met por medio de HGF. La expresión de Met, además, se ha visto correlacionada con la emergencia y mantenimiento de los receptores del dolor TRPV1 (Lallemend & Ernfors, 2012).

La especificación de las neuronas sensoriales comienza cuando las CCN se escinden del tubo neural y migran hasta una posición posterior en el embrión, donde confluyen en los ganglios de la raíz dorsal. Durante este proceso, la vía WNT canónica dirige la activación de los factores de transcripción Ngn1 y Ngn2, dando lugar al inicio de la neurogénesis (Figura 1). Este paso viene acompañado por la expresión de Islet1 y Brn3a, los cuales inician la expresión de Runx1, clave en la especificación del linaje sensorial (Wilson et al., 2018). Continuando con la ola de diferenciación dependiente de Ngn1, en la semana 11 empiezan a surgir pequeñas neuronas

postmitóticas que expresan TrkA. Desde este momento los niveles de NGF, reguladores de la expresión de Runx1, determinan la especificación de los dos subtipos TrkA tardíos mediante gradientes de concentración variables a lo largo de las capas de la epidermis. Para terminar, en el subtipo TrkA peptidérgico se induce la expresión del receptor Met, logrando la extinción definitiva de Runx1, y concluyendo la maduración del linaje neuronal nociceptivo (Lallemend & Ernfors, 2012).

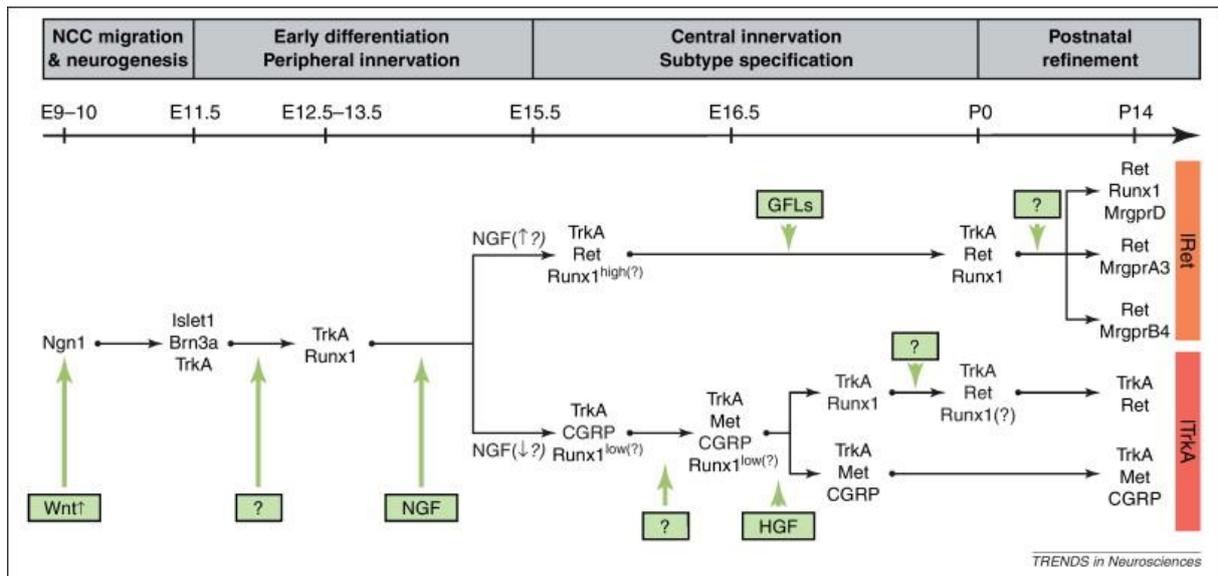


Figura 1. Modelo de desarrollo de los subtipo neuronales nociceptivos TrkA peptidérgico y no peptidérgico dependientes de Ngn1. El esquema recopila los factores de transcripción que intervienen en cada punto de la especificación neuronal, así como los receptores que se expresan, junto a sus ligandos. La columna superior hace referencia a las etapas de desarrollo en ratones, donde la E y la P representan los estadios embrionarios y postnatales, respectivamente (Lallemend & Ernfors, 2012).

Pese a que el factor de transcripción Ngn2 en condiciones endógenas conduce hacia la obtención de los subtipos sensoriales TrkB y TrkC, este se ha escogido como factor iniciador de la diferenciación de neuronas nociceptivas TrkA en este trabajo debido a su capacidad para acceder a regiones de la cromatina altamente condensadas (Smith et al., 2016). Además, en los experimentos realizados por Blanchard et al., (2015) se observó que Ngn1 y Ngn2 tienen el mismo rol proneural genérico, siendo capaces de inducir los tres subtipos sensoriales en la misma proporción indistintamente.

En línea con el proceso de especificación neuronal descrito, las pequeñas moléculas que se escogieron para el protocolo tienen la finalidad de promover o mantener las vías de señalización iniciadoras de la diferenciación (Figura 2). En este sentido, CHIR99021 es la molécula más importante, ya que actúa como agonista de la vía de señalización WNT mediante la inhibición selectiva de GSK-3 (Wilson et al., 2018). Además, se ha demostrado que la presencia de CHIR99021 es crítica para la fosforilación y activación de Ngn2 (Chen et al., 2019). Un rol similar ejerce SHH promoviendo la vía HH para la especificación sensorial (Wilson et al., 2018). Por otro lado, la inhibición de BMP y Notch/Delta mediante las moléculas antagonistas LDN-193189 y DAPT resulta esencial, puesto que se ha visto que ambas vías actúan suprimiendo la diferenciación de las neuronas sensoriales durante el desarrollo embrionario (Chambers et al., 2012).

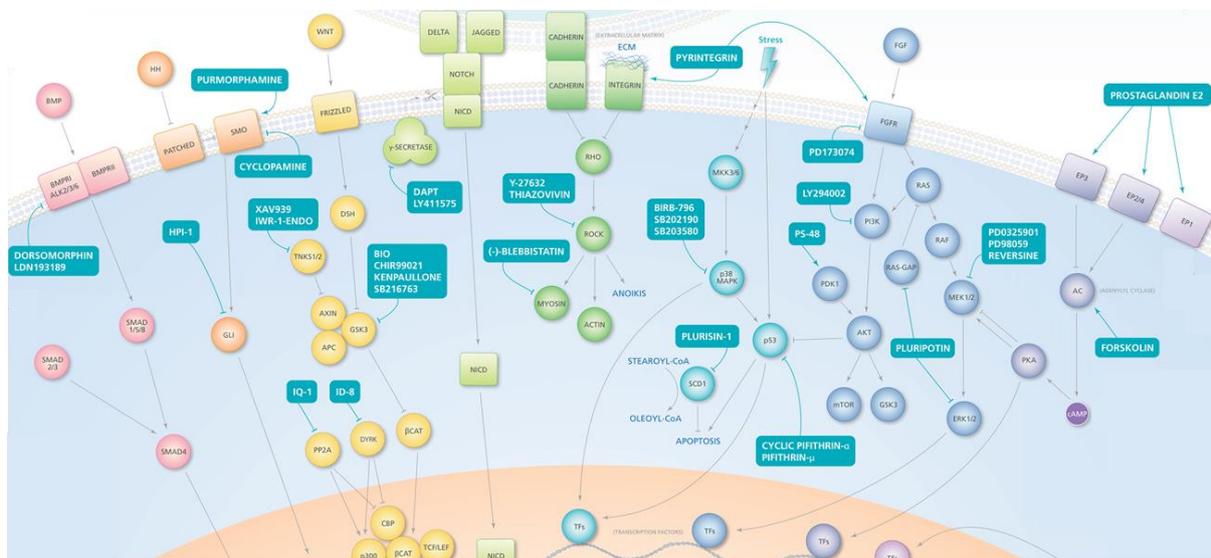


Figura 2. Esquema recopilatorio de las principales pequeñas moléculas moduladoras de vías de señalización empleadas en los protocolos de diferenciación celular. Incluye las moléculas CHIR99021 (WNT), LDN-193189 (BMP), SHH (HH) y DAPT (Notch/Delta), entre otras (StemCell, 2018).

OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es evaluar la eficacia de un protocolo de diferenciación basado en la modulación de la expresión génica y de vías de señalización involucradas en la diferenciación neuronal durante el desarrollo embrionario para inducir la conversión de fibroblastos humanos neonatales en neuronas nociceptivas peptidérgicas, concretándose en los siguientes objetivos específicos:

- Producir eficazmente altas concentraciones de vectores lentivirales empaquetados con los genes reguladores maestros Brn3a y Ngn2 para la transducción de los fibroblastos.
- Desarrollar y optimizar un protocolo de diferenciación dirigida que permita la obtención directa de neuronas nociceptivas a partir de fibroblastos humanos.
- Evaluar el estado de diferenciación neuronal mediante el análisis de la morfología celular, y la cuantificación de la transcripción y traducción de marcadores neuronales en diferentes estadios de la diferenciación.

Todo ello con la finalidad a largo plazo de obtener modelos de neuronas nociceptivas in vitro, viables para el estudio de los mecanismos moleculares del dolor neuropático en humanos a partir de la piel de pacientes con características genéticas interindividuales.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Cultivos celulares

Líneas celulares

En este trabajo se han utilizado dos líneas celulares: la línea estable 293 LTV (Cell Biolabs) para la producción y subsecuente titulación de vectores lentivirales, derivada de células HEK 293 (*human embryonic kidney cells*) transformadas con ADN de HAdV-5 (*human adenovirus type 5*); y el cultivo celular primario de fibroblastos HDFn (*human dermal fibroblasts, neonatal*; Gibco) para la reprogramación celular.

Los cultivos han sido mantenidos en flasks de 25cm² dentro de un incubador a 37°C y con un 5% CO₂ y 95% de aire humidificado, realizando cambios de medio cada 2-3 días y subcultivando las células una vez por semana. Los medios completos empleados para el mantenimiento de cada línea celular se detallan a continuación. Para la línea 293 LTV se empleó DMEM alto en glucosa y sin piruvato (Sigma-Aldrich) suplementado con 1% de P/S (*penicillin/streptomycin*; Gibco), 10% de FBS (*foetal bovine serum*, Gibco) y 0,1 mM de MEM NEAA (*non essential aminoacids*; Gibco); y para la línea de HDFn, medio Cascade 106 (Gibco) suplementado con 1% de P/S y 2% de suplemento LSGS (*low serum growth supplement*; Gibco).

Subcultivo y siembra

Los pases celulares o subcultivos se realizaron semanalmente siguiendo el criterio de que el cultivo alcance una confluencia superior al 85%. Una vez cumplido esto, las células se lavan con 5 mL de una solución salina de PBS sin Ca²⁺/Mg²⁺ (Calbiochem) y se tripsinizan con 1 mL de solución de 0,025% tripsina/ 0,01% EDTA (Gibco), incubándolas a 37°C durante 2 min, en el caso de los HDFn; y con 1 mL de 0,05% tripsina-EDTA (Gibco) a temperatura ambiente, en el caso de las 293LTV. Una vez discurrido este tiempo, la tripsina se inactiva con medio de cultivo suplementado con suero, en el caso de las 293 LTV; o un neutralizador de tripsina (Gibco), en el caso de los HDFn. Esta solución se centrifuga a 200g durante 7 min y el pellet resultante se resuspende en 5 mL de medio completo para distribuir la suspensión celular entre

los recipientes de siembra en la concentración deseada; habiendo realizado previamente un recuento celular con ayuda de un contador automático (TC20 Automated Cell Counter; BioRad). Las concentraciones de siembra en flask de 25cm² y placas de pocillos para los experimentos han sido de 10.000 cel/cm² y 12.500 cel/cm², respectivamente.

La siembra para los experimentos de PCR cuantitativa a tiempo real y de citometría de flujo se llevó a cabo en placas de 6 pocillos (9,5cm²) y 12 pocillos (3,8cm²), respectivamente, recolectando las células en los días 12, 16 y 21 del protocolo, cada vez que alguna condición del medio es modificada. En el caso de la citometría, los pocillos se han tratado con una solución de gelatina al 0,1% (Sigma-Aldrich), con el fin de evitar que las células se despeguen durante los sucesivos pasos de lavado que componen el protocolo de marcaje por inmunocitoquímica.

Criopreservación

Para la criopreservación y el mantenimiento de los cultivos celulares a largo plazo se ha seguido el protocolo de subcultivo, con la salvedad de que durante la resuspensión se emplea un medio de congelación. Este medio está compuesto por 90% de FBS y 10 % de DMSO (dimetil sulfóxido; PanReac AppliChem), utilizado para preservar alrededor de 1 millón de células por criotubo en un volumen de 1 mL. Una vez preparada la mezcla de medio con las células, los criotubos se congelan secuencialmente: primero en una cubeta de hielo durante 15 min, luego en el congelador (-20°C) durante 1h, después toda la noche en el ultracongelador (-80°C) y, finalmente, se almacenan en un tanque de nitrógeno líquido (-195,8°C) por un tiempo indefinido.

Recopilación de imágenes

Con el fin de evaluar la morfología celular a lo largo del proceso de diferenciación, se tomaron imágenes en los días clave del protocolo (8, 12, 16, 17, 21), valiéndose de un microscopio de contraste de fases (Zeiss; Primo Star) con un objetivo 10x y un microscopio óptico de campo claro (Nikon; Eclipse TE2000-U) con un objetivo 20x. El análisis y posterior edición de las imágenes se realizó mediante el programa de tratamiento FIJI-ImageJ (National Institute of Health).

Protocolo de diferenciación

La reprogramación directa de los fibroblastos se ha llevado a cabo mediante la transducción de las células con los factores de transcripción determinantes del destino sensorial, y posterior exposición a factores neurotróficos y moléculas moduladoras de vías de señalización específicas de cada etapa de la diferenciación neuronal. Para ello, se tomó como referencia el protocolo de Wilson et al., (2018), que se estructura en 3 fases, cada una caracterizada por un tipo de medio (Figura 3): incluyendo una fase inicial de pre-diferenciación (D0-D6), una fase de diferenciación intermedia (D6-D8) y una fase de diferenciación final (D8-D21). Las células en diferenciación se mantuvieron en el incubador a 37°C y con un 5% CO₂ y 95% de aire humidificado, cambiando el medio cada 2-3 días en el caso de no coincidir con una modificación de medio prevista en el protocolo.

El protocolo que se describe a continuación es el resultado del testado de diversas concentraciones y tiempos de exposición de los elementos que lo componen, llegando así al procedimiento de diferenciación óptimo en cuanto a eficacia y duración.

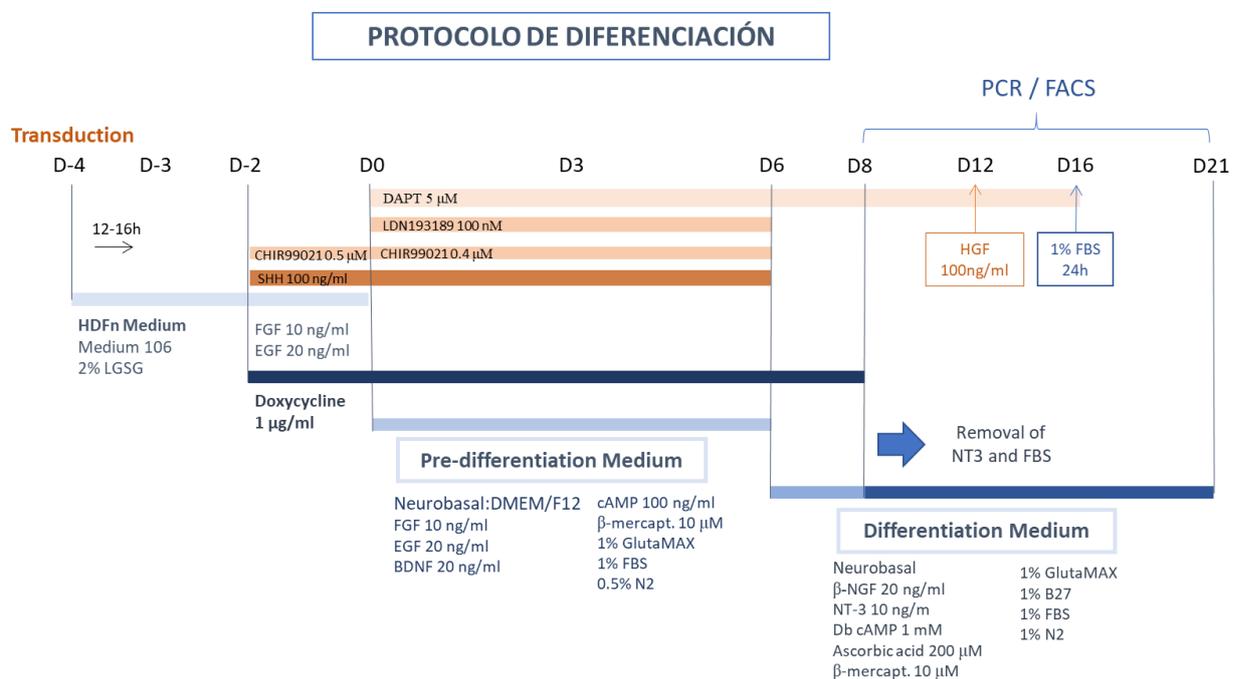


Figura 3. Esquema del protocolo de diferenciación directa empleado para la diferenciación de los HDFn en neuronas nociceptivas. Incluye en la parte inferior (azul) los tres tipos de medio empleados en la diferenciación, especificando la composición de cada uno, y en la parte superior (naranja) las concentraciones y tiempos de exposición de las pequeñas moléculas añadidas.

Transducción de HDFn con partículas lentivirales

El destino celular de los fibroblastos se ha determinado genéticamente mediante la transducción de los mismos con vectores lentivirales empaquetados con los genes proneurales Brn3a y Ngn2. La expresión de dichos genes está sujeta a una estricta regulación mediante el sistema TetOn incorporado en el plásmido, el cual estimula la transcripción del transgén solamente en presencia de una tetraciclina, la doxiciclina, en este caso.

Para aumentar la eficiencia de la transducción de los fibroblastos se añaden 8 µg/mL de polibreno (Sigma-Aldrich) a la suspensión viral diluida en medio de HDFn. El volumen de virus a distribuir por pocillo se determina siguiendo la fórmula: $V(\mu\text{l}) = \text{MOI} \times n^{\circ}\text{cel} \times 1000 \mu\text{l} / \text{TU}$; donde MOI (*multiplicity of infection*) es un parámetro que indica el ratio entre la cantidad de partículas virales por cantidad de células a infectar y TU (*transduction units*) es el título viral funcional. Las células se incuban con las partículas virales durante 12-16h (D-4) y, pasado este tiempo, el medio con virus se sustituye por medio completo de HDFn (D-3), dejándolo incubar durante al menos 24h antes de iniciar el protocolo de diferenciación. Los pocillos control sin transducir se incuban con el mismo medio, pero sin partículas virales.

Una vez iniciado el protocolo de diferenciación, durante los primeros dos días (D-2 - D0) las células se incuban con medio completo de HDFn con CHIR99021 (Sigma-Aldrich) a 0,5 µM, SHH (PeproTech) a 100 ng/mL, 20 ng/mL de rhEGF (*human recombinant epidermal growth factor*; PeproTech) y 10 ng/mL de rhFGF2 (*human recombinant fibroblast growth factor*; Promega). Desde este momento comienza a añadirse la doxiciclina (Sigma-Aldrich) a una concentración constante de 1 µg/mL, manteniéndola durante 10 días, hasta el final de la fase de diferenciación intermedia (D+8).

Medio de pre-diferenciación (D0 - D+6)

Pasados dos días, se añade el medio de pre-diferenciación, compuesto por medio DMEM/F12 (Gibco) y medio Neurobasal (Gibco) a un ratio 1:1, suplementado con un 0,5% de N-2 (100x; Gibco) y 1% de P/S. Las pequeñas moléculas y factores de crecimiento del medio anterior se mantienen, agregando además rhBDNF (*human recombinant brain-derived neurotrophic factor*; R&D Systems) a 20 ng/mL, DAPT (Sigma-Aldrich) a 5 µM y LDN193189 (PeproTech) a 100 µM, y bajando la concentración de CHIR99021 a 0,4 µM para evitar un exceso de

toxicidad por DMSO. Junto con estos reactivos, el medio se suplementa con cAMP (adenosín monofosfato cíclico; Sigma-Aldrich) a 100 ng/mL, FBS al 1% y GlutaMAX (Gibco) al 1%, así como β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) a 10 μ M como agente antioxidante.

Medio de diferenciación intermedio (D+6 - D+8)

En el día 10 (D+6) de protocolo las pequeñas moléculas y factores de crecimiento se retiran, exceptuando el DAPT, y el medio de prediferenciación se sustituye por el medio de diferenciación, compuesto por medio Neurobasal con un 1% de P/S y diversos suplementos: 1% de N-2, 1% de B27 (Gibco), 1% de FBS, 1% de GlutaMAX y 1 mM de db cAMP (dibutiril adenosín monofosfato cíclico; Sigma-Aldrich). Junto a estos, se agregan los factores neurotróficos rh β -NGF (ImmunoTools) a 20 ng/mL y rhNT-3 (ImmunoTools) a 10 ng/mL, además de β -mercaptoetanol y ácido ascórbico (Sigma-Aldrich) a 200 μ M.

Medio de diferenciación final (D+8 - D+21)

Tras dejar los HDFn dos días con el medio de diferenciación, este se modifica retirando el FBS y la rhNT-3 de la solución. El FBS (1%) se vuelve a añadir en el día 16 durante 24h, coincidiendo con la retirada del DAPT, y a partir del D12 se empieza a agregar rhHGF (PeproTech) a 100 ng/mL. Asimismo, en los experimentos en los que se testó el efecto de los agentes antimitóticos sobre la glía emergente, estos se añadieron los días 10 (D+6) y 12 (D+8) de protocolo. Concretamente, se utilizaron la uridina (17,5 μ g/mL; Sigma) y la 5-fluoro-2'-desoxiuridina (7,5 μ g/mL; Sigma) a tal efecto.

Caracterización de las células diferenciadas

Extracción de ARN y PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)

El análisis y cuantificación de la transcripción de marcadores neuronales en los fibroblastos en diferenciación, proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2) y β -Tubulina III (TUBIII), en este caso, se llevó a cabo mediante PCR cuantitativa a tiempo real. Para ello, se extrae el ARN de las células empleando el kit de E.Z.N.A. HP Total RNA (OmegaBioTek) y se diluye en 50 μ l de agua DEPC (dietilpirocarbonato; ThermoScientific). La concentración y pureza (proteínas y

compuestos aromáticos) de las muestras se determina usando el espectrofotómetro NanoDrop2000. Con el fin de evitar la contaminación por ADN, las muestras se digieren con un kit de digestión de ADN (Sigma-Aldrich). Siguiendo las especificaciones de la casa comercial, se añaden por cada 50 μ l de muestra los siguientes volúmenes: 1 μ l de DNAsa por μ g de ARN junto con 5,5 μ l de tampón de reacción, los cuales se dejan incubar a 37°C durante 15 min; y 5,5 μ l de solución stop EDTA, dejando incubar durante 10 min a 70°C.

Genes	FORWARD primer	REVERSE primer
MAP2	GGGCCTTTTCTTTGAAATCTAGTTT	CAAATGTGGCTCTCTGAAGAACA
TUBIII	ATGCGGGAGATCGTGACAT	CCCCTGAGCGGACACTGT
B-actina	CTGGAACGGTGAAGGTGACA	AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA

Tabla 1. Secuencias de los cebadores empleados para la amplificación del ADNc en el experimento.

En el siguiente paso del protocolo, la retrotranscripción del transcrito, se emplea un kit de síntesis de ADNc de una cadena (ThermoScientific), diluyendo las muestras con agua DEPC a razón de 1 μ g/29,5 μ l; y añadiendo 10 μ l de tampón de reacción, 5 μ l de dNTPs, 2,5 μ l de cebadores dT, 1 μ l de inhibidor de ARNasa RiboLock y 2 μ l de retrotranscriptasa MuLV en la mezcla. Los 50 μ l de volumen resultantes se mezclan con ayuda de un vórtex y se introducen en un termociclador, programado a 37°C durante 1h y 70°C durante 5 min.

Por último, la cuantificación de la expresión génica se realiza mediante un protocolo de RT q-PCR. Para ello se prepara la mezcla de reacción para cada gen, añadiendo 10 μ l de master mix SYBR Green (Applied Biosystems), 500 nM de cebador de inicio (Sigma-Aldrich), 500 nM de cebador final (Sigma-Aldrich) y 6 μ l de agua DEPC por cada muestra, obteniendo un volumen final de 18 μ l. Este volumen se dispone a lo largo de una placa de reacción de 96 pocillos ópticos, sobre los cuales se añaden en último lugar 2 μ l de ADNc. Cada gen se analiza por duplicado, tomando el gen de la β -actina como control endógeno y dos pocillos NTC (*non-template control*) por gen sin muestra como control negativo del experimento. La placa se tapa con un adhesivo óptico y se centrifuga a 931g durante 1 min para, a continuación, ser introducida en el termociclador QuantStudio3 (Applied Biosystems), donde se somete a una secuencia térmica definida para determinar el número de copias de cada muestra (Figura 4).

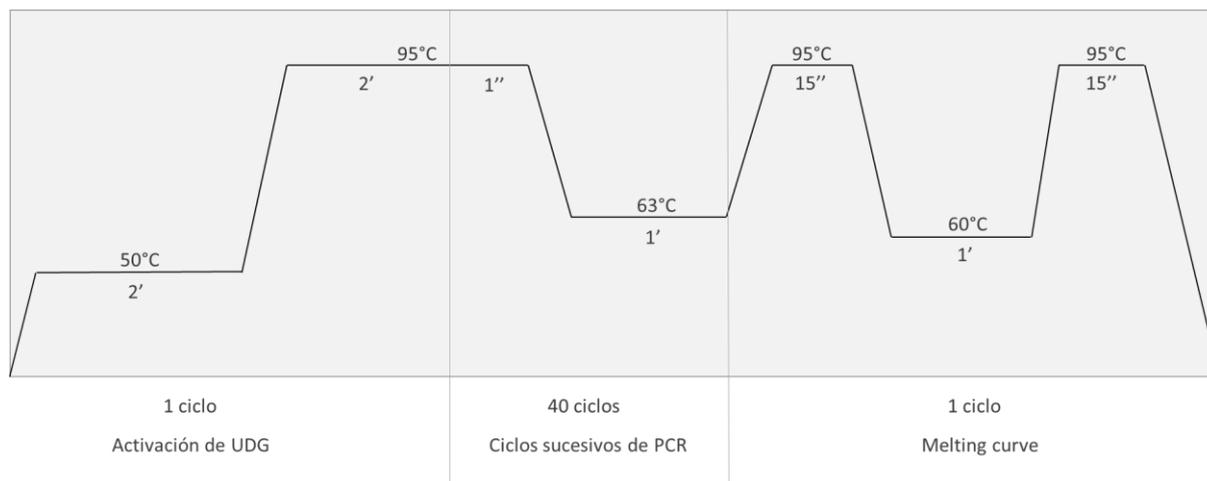


Figura 4. Representación esquemática de la secuencia térmica programada para la amplificación de los marcadores neuronales, la cual se implementó en 3 etapas: una etapa inicial de activación de UDG y de la polimerasa, una etapa intermedia de desnaturalización y amplificación del ADNc, y una etapa final de recalentamiento, necesaria para el posterior análisis de las curvas de fusión de los productos amplificados.

El análisis de la RT-qPCR se efectuó tomando el valor Ct (*cycle threshold*) promedio de cada muestra, medida indirecta del nivel de expresión del gen, y normalizando estos valores a la expresión promedio de la β -actina mediante la fórmula: $ratio_{(gen/calibrador)} = 2^{Ct_{calibrador} - Ct_{gen}}$, asumiendo que la eficiencia de la reacción es máxima. Estos cálculos fueron automatizados mediante el programa Microsoft Excel y representados con ayuda del programa Prism 8 (GraphPad).

Inmunocitoquímica y cuantificación por citometría de flujo

El análisis y cuantificación de la expresión de marcadores neuronales en los fibroblastos durante el proceso de diferenciación se llevó a cabo mediante citometría de flujo. Para ello las células fueron fijadas y marcadas siguiendo un protocolo de inmunocitoquímica aplicado en 5 pasos, intercalando lavados de D-PBS con Ca^{2+} Mg^{2+} (Sigma-Aldrich) entre cada reactivo.

Los primeros pasos de la inmunocitoquímica son la fijación de las células con paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich) durante 15 min, y la posterior permeabilización con detergente Triton-X al 0,1% (diluido en D-PBS; Sigma-Aldrich) durante 5 min. Para los pasos siguientes se prepara una mezcla bloqueante de inespecificidades compuesta de suero fetal de cabra (*normal goat serum*, NGS; Sigma-Aldrich) al 5% (diluido en D-PBS). Este se deja incubar a temperatura

ambiente durante 45 min y, pasado este tiempo, se retira omitiendo el lavado. Una vez retirado, los anticuerpos primarios, diluidos en la misma solución de NGS al 5% a las concentraciones indicadas por la casa comercial (Tabla 2), se incuban durante 1h a temperatura ambiente, se lavan, y se añaden posteriormente los anticuerpos secundarios, asimismo diluidos en NGS al 5% e incubados durante 45 min.

	ANTICUERPOS	REFERENCIA Y CASA COMERCIAL	CONCENTRACIÓN
PRIMARIOS	TUJ1 (MOUSE)	801201 Biologend	1:1000
	MAP2 (RABBIT)	17490-1-AP Proteintech	1:250
	TRKA (RABBIT)	NB100-80061 Novus Biologicals	1:100
	TRPV1 (RABBIT)	ACC-030 Alomone	1:100
SECUNDARIOS	GOAT ANTI RABBIT 488	A11034 Molecular Probes	1:500
	GOAT ANTI MOUSE 488	Sab4600388 Sigma-Aldrich	1:500

Tabla 2. Información detallada sobre la casa comercial y las concentraciones de dilución de los anticuerpos primarios y secundarios empleados en el marcaje por inmunocitoquímica indirecta.

Tras completar la incubación con los anticuerpos secundarios, estos se retiran mediante dos lavados con PBS sin Ca^{2+} Mg^{2+} / 0,05% EDTA y, posteriormente, las células se incuban con 250 μl de solución de acutasa (CLS) durante 10 min, comprobando la disgregación celular al microscopio. Una vez levantadas, las células se concentran mediante un centrifugado a 2.348g durante 5 min y el pellet celular se resuspende en 250 μl de NaCl 0,9%, trasvasando la mezcla en tubos de citometría para su análisis.

La evaluación de los niveles de expresión de las proteínas de interés en las células en diferenciación se llevó a cabo mediante citometría de flujo tipo FACS (*fluorescence-activated cell sorting*), empleando un citómetro BD FACSCanto II (BD Biosciences).

La cuantificación de los niveles de expresión proteica se realizó tomando 10.000 eventos celulares por muestra y midiendo la difracción de la luz causada por el paso de las células por un láser Argon ($\lambda_{\text{emisión}}=488\text{nm}$) a través de un filtro de 530/30nm. Para ello se emplearon los siguientes voltajes de parámetros preestablecidos para el análisis de la población neuronal en diferenciación: 100V de FSC (*forward scatter*), 300V de SSC (*side scatter*) y 300V de FITC (*fluorescein isothiocyanate*).

Finalmente, el análisis de los datos obtenidos se llevó a cabo mediante el programa FlowingSoftware (Turku Bioscience), tomando la población celular marcada, correspondiente al segundo y mayor pico de fluorescencia en una representación en histograma, y delimitándola en un diagrama de puntos para obtener los porcentajes de células que expresan cada biomarcador respecto al total.

Producción y titulación de vectores lentivirales

Para la obtención de altas concentraciones de vectores lentivirales de segunda generación, empleados para la transducción de los fibroblastos, las células 293 LTV fueron cotransfectadas con los plásmidos recombinantes de envoltura (pCMV VSV-G; Addgene #8454), empaquetamiento (pCMV delta E 8.2; Addgene #12263) y transferencia (TetO NGN2; Addgene #62223/ TetO BRN3A; Addgene #62221; Figura 5) de lentivirus. A tal fin, se sembraron en placas Petri de 100 mm de diámetro en un volumen de 10 mL y a una densidad de siembra de 10^5 células/mL, y se transfectaron al día siguiente. El procedimiento de producción y titulación seguido en este trabajo se extrajo del protocolo de Ding & Kilpatrick, (2013).

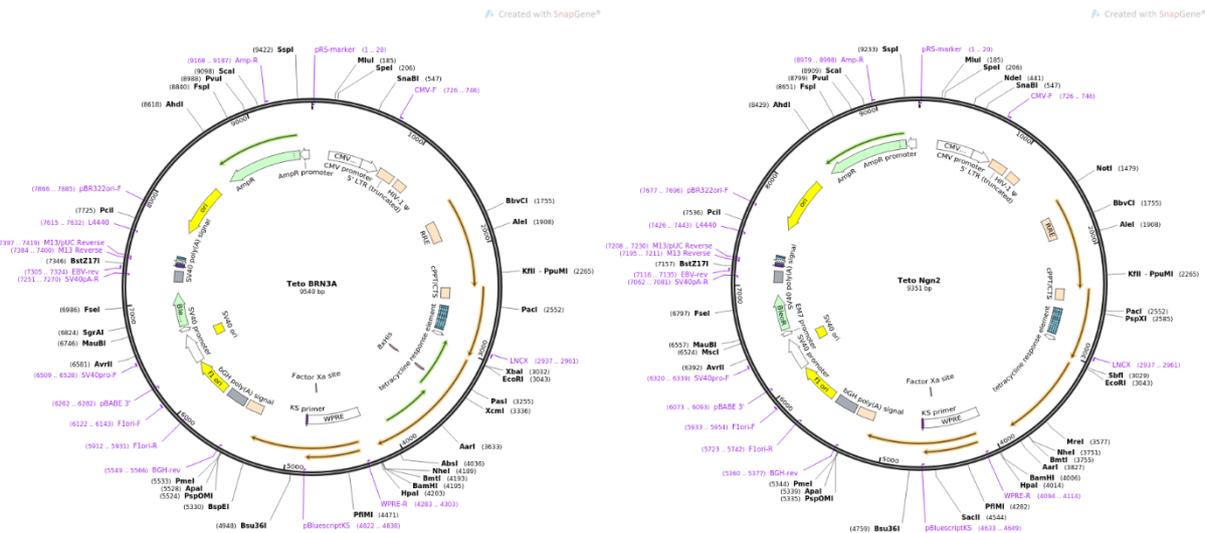


Figura 5. Esquema representativo de las secuencias integradas en los plásmidos de transferencia TetOn Brn3a (*izquierda*) y TetOn Ngn2 (*derecha*) para la transfección de las células 293 LTV. Ambos plásmidos incluyen un elemento de respuesta a tetraciclina, un gen WPRE de aumento de la eficiencia post-transcripcional y el transgén de interés, impulsado por un promotor constitutivo de origen viral (CMV), entre otras secuencias.

Producción y purificación de vectores lentivirales

La transfección de las células 293 LTV se llevó a cabo por el método de co-precipitación con fosfato cálcico, mediante el cual se facilita la unión del ADN condensado a la membrana celular gracias a la formación de un precipitado con cloruro cálcico en una solución salina fosfatada. Para ello, se prepara una mezcla de 172 μ l de una solución de CaCl_2 2M y los volúmenes correspondientes de cada plásmido para alcanzar 4,02 μ g de plásmido de envoltura, 16,63 μ g de plásmido de empaquetamiento y la cantidad indicada de plásmido de transferencia (dependiendo del número de pares de bases de cada gen) para alcanzar una proporción molar de 1:2:2,5 (optimizada en el laboratorio). Esta mezcla se completa con agua DEPC hasta 700 μ l y se le agregan otros 700 μ l de solución 2xHBS (50 mM HEPES, 1,5 mM Na_2HPO_4 , 280 mM NaCl, 10 mM KCl y 12 mM sacarosa) gota a gota durante el agitado con un vórtex, dejando incubar a temperatura ambiente durante 30 min. Pasado este tiempo, la mezcla de transfección se diluye en medio completo hasta un volumen de 10 mL y se agrega a las células en la placa de Petri. Las partículas virales producidas se recolectan a las 24h, 48h y 72h durante el cambio de medios, filtrándolas a través de un filtro de 0,45 μ m para su almacenamiento a -20°C .

El último paso, la concentración y purificación de los vectores lentivirales, se lleva a cabo en la ultracentrífuga (Optima Max-TL; Beckman Coulter), trasvasando los medios recogidos en

tubos de centrifuga de policarbonato, en cuyo fondo se depositan 10 mL de solución de sacarosa al 20% a posteriori. Los medios se centrifugan a una velocidad de 167.874g (rotor Beckman 4rp5Ti) durante 2h a 4°C, resuspendiendo el pellet resultante en 600 µl de solución de PBS/1% BSA (Sigma-Aldrich); y la solución obtenida se deja reposar a 4°C durante 1h, agitándola en un vórtex cada 20 min antes de almacenarla en alícuotas más pequeñas a -80°C.

Titulación de vectores lentivirales

El título de las partículas virales se estimó mediante un protocolo de amplificación por RT q-PCR, transduciendo los fibroblastos, previamente sembrados en placas de 12 pocillos, con diluciones seriadas de vectores lentivirales (1:1.000|1:10.000|1:100.000) Brn3a y Ngn2, mediante el procedimiento de transducción descrito (apartado *Transducción de los HDFn con partículas lentivirales*). 20h después de la infección el medio se reemplaza por medio fresco con DNasa I (Sigma-Aldrich) a una concentración de 10 U/mL, dejando incubar a 37°C durante 15 min. Una vez retirada la enzima, las células se dejan crecer durante 48h y, pasado este tiempo, se procede a la extracción de su ADN genómico, haciendo uso de un kit de extracción de ADN de células y tejidos (Macherey-Nagel). La concentración y pureza de la muestra se cuantifica mediante espectrofotometría previamente a su amplificación.

La placa de reacción de PCR para la obtención del título viral se estructura en dos mitades: en la primera se reparte la mezcla de reacción para la amplificación del gen WPRE, indicador de la presencia de transgén; y en la segunda, la mezcla de reacción del gen de la ribonucleasa P (ARNasa P), como referencia endógena para el cálculo de la cantidad de copias de plásmido por genoma celular. En la primera mezcla se añaden 0,1 µl de cada cebador del gen WPRE (CCGTTGTCAGGCAACGTG - *forward*/ AGCTGACAGGTGGTGGCAAT - *reverse*), 0,1 µl de sonda fluorescente (FAM-TGCTGACGCAACCCCACTGGT-TAMRA), 25 µl de polimerasa TaqMan Fast Advance Master Mix (Applied Biosystems) y 19,7 µl de agua DEPC. De forma similar, la segunda mezcla se prepara añadiendo de 2,5 µl de los cebadores y sonda proporcionados en un kit de detección de ARNasa P (Applied Biosystems), 25 µl de polimerasa TaqMan y 17,5 µl de agua DEPC. En ambos casos obteniendo un volumen final de 45 µl, que se completa con 5 µl de ADN de cada dilución por duplicado. Se dejan dos pocillos control sin transfectar y dos pocillos NTC.

Asimismo, en los pocillos de la primera mezcla se agregan las diluciones seriadas de plásmido para componer la curva de calibración del gen WPRE y, en la segunda, las diluciones seriadas del ADN_g extraído para componer la curva de calibración del gen de la ARNasa P. Estas diluciones se preparan antes de comenzar el experimento, agregando tRNA (Thermo Fisher) a una concentración de 4 µg/mL por cada muestra, y diluyendo con agua DEPC. La amplificación se lleva a cabo mediante un procedimiento de RT q-PCR, comprendido por una fase inicial de activación de UNG (50°C 2 min), una fase intermedia de activación de la polimerasa (95°C 10 min) y 35 ciclos de amplificación (95°C 15s/ 60°C 1 min).

Los valores Ct obtenidos con este procedimiento permiten extrapolar el número de copias de plásmido de cada pocillo a partir de las curvas de calibración. Estos datos se normalizan frente al número de copias de la ARNasa P, obteniendo el número de copias de provirus por cada genoma celular, equivalente al parámetro C en la siguiente fórmula: $TU/mL = (C \times N \times D \times 1000) / V$; donde N es el número de células en el momento de la transducción, D es la dilución del vector y V es el volumen de vector diluido añadido en cada pocillo.

RESULTADOS

La reprogramación celular de fibroblastos neonatales hacia neuronas nociceptivas mediante un protocolo de diferenciación optimizado basado en la modulación de la expresión génica y de las vías de señalización involucradas en el desarrollo neuronal ha conducido a la obtención de una serie de resultados de carácter cualitativo, mediante el seguimiento de los cambios morfológicos sufridos por las células a lo largo del protocolo de diferenciación; y de carácter cuantitativo, mediante la evaluación de la expresión y presencia de marcadores neuronales nociceptivos a través de las técnicas RT-qPCR y FACS. Dichos resultados se pueden estructurar en los puntos que se comentan a continuación:

El procedimiento de cotransfección de las células 293 LTV es adecuado para la producción de altas titulaciones lentivirales para la transducción de HDFn

El uso de un sistema de empaquetamiento viral de segunda generación en combinación con una cotrasfección en fosfato cálcico de las células 293 LTV con los plásmidos de envoltura, empaquetamiento y transferencia (Brn3a y Ngn2) ha permitido la obtención de un título viral suficiente para efectuar varios protocolos de transducción de HDFn (Figura 6), partiendo de una concentración de siembra de $4,75 \times 10^5$ cel/mL a MOI 10.

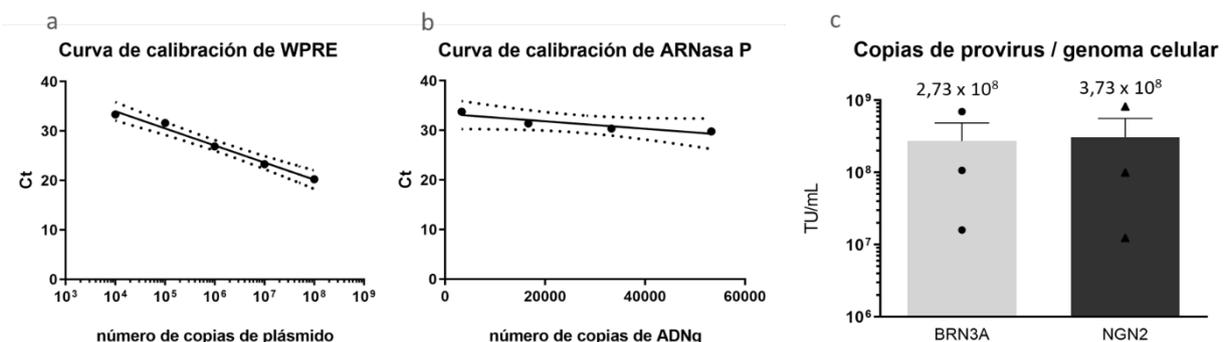


Figura 6. Gráficas de titulación: **a)** curva logarítmica de calibración del gen WPRE, indicador de la presencia de los plásmidos de transferencia; **b)** curva logarítmica de calibración del gen de la ARNasa P, marcador endógeno referencia del número de copias de genoma celular; **c)** diagrama de barras con los valores de titulación (TU/mL) de lentivirus empaquetados con los plásmidos de transferencia BRN3A y NGN2. En las gráficas logarítmicas se representa el número de copias (eje X) frente al Ct (eje Y). El Ct se obtiene a partir de la intersección entre la curva de amplificación y la línea de umbral.

La coexpresión transitoria de Brn3a con Ngn2 y exposición a pequeñas moléculas de señalización induce cambios morfológicos en los HDFn en diferenciación

Uno de los aspectos principales de la diferenciación directa es la transición desde la morfología fusiforme de los fibroblastos hacia la morfología redondeada, inicialmente bipolar y finalmente pseudounipolar, de las neuronas nociceptivas (Wilson et al., 2018). Estos cambios morfológicos ocurridos durante la diferenciación in vitro fueron monitorizados mediante imágenes de contraste de fases e imágenes de campo claro.

Durante las primeras etapas de expansión celular y prediferenciación, las células exhibían una morfología alargada, característica de células mesenquimales, la cual previsiblemente no experimentó ningún cambio tras los primeros días de exposición a pequeñas moléculas. No fue hasta el día 10 (D+6) de protocolo, al inicio de la etapa de diferenciación, que las células comenzaron a redondearse en la zona central (Figura 7b); proceso que culminó el día 12 (D+8) con la formación de unas estructuras esféricas notoriamente tridimensionales (Figura 7c/8c) y emisoras de prolongaciones bipolares (Figura 8f) que asemejan la morfología de las neuronas sensoriales inmaduras. Desde este momento, además, se puede observar una notable disminución del tamaño celular y comienzan a definirse en algunas zonas distribuciones neuronales complejas (Figura 7d) que evocan la organización en rosetas adoptada por las células madre neurales durante el desarrollo embrionario del tubo neural (Lampert et al., 2020).

A partir del día 18 (D+14), no obstante, se produce una considerable reducción de la densidad celular, evidenciada por la gran cantidad de restos celulares observable, y la morfología redondeada de las células restantes comienza a desvanecerse (Figura 7e), dejando un aspecto alargado e irregular en la mayoría (Figura 8c), y una morfología ramificada, característica de las células gliales, en un menor porcentaje de las células (Figura 8d); hasta el punto de que en los últimos días de protocolo (D+21) esta es la morfología predominante, incluso en los pocillos tratados con agentes antimitóticos.

Pese a que empleando el protocolo optimizado únicamente se han logrado alcanzar cambios morfológicos transitorios en los fibroblastos en diferenciación, este ha sido el más favorable entre los testados en cuanto a eficiencia y tiempo de diferenciación. En particular, una de las condiciones probadas fue la reducción del tiempo de exposición a LDN de 6 a 3 días, la cual brindó resultados morfológicos similares, pero con un porcentaje de diferenciación ligeramente más bajo según se observa en la imagen Figura 7g. No obstante, el cambio más notorio se

produjo con la condición en la que se añadió db cAMP en el día 16 (D+12) en lugar del día 10 (D+6) del protocolo optimizado, puesto que la combinación de ambas condiciones no desencadenó ningún cambio morfológico hasta que no se añadió del mononucleótido (Figura

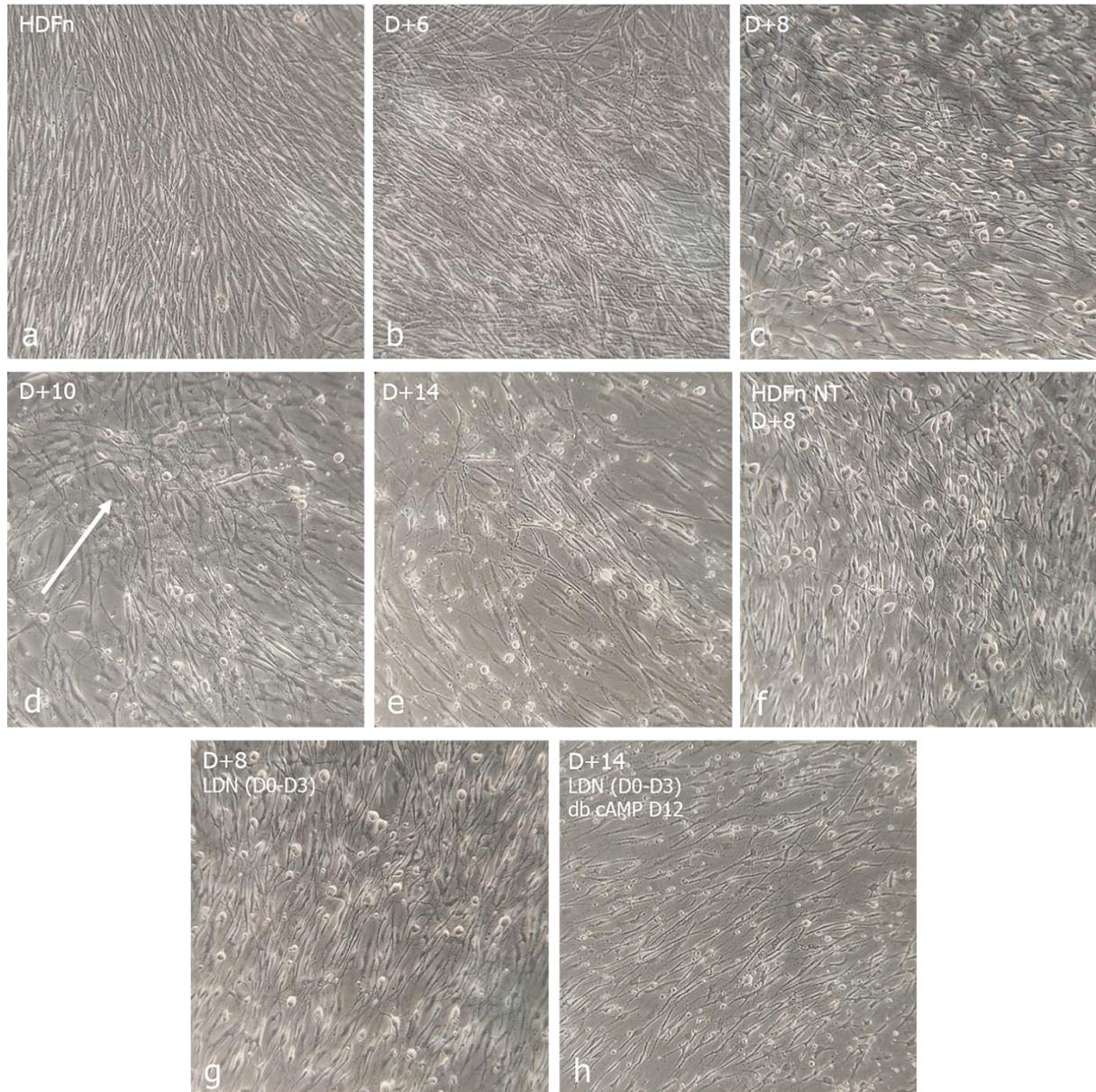


Figura 7. Fotografías tomadas con un microscopio de contraste de fases (Zeiss; Primo Star) de las células en diferenciación en diferentes puntos del protocolo: **a)** control de HDFn con medio completo de fibroblastos; **b)** primeros cambios morfológicos observables en D+6 de protocolo; **c)** morfología esférica bipolar característica de neuronas inmaduras en D+8 de protocolo; **d)** distribución en roseta en D+10, similar a la adoptada por las células madre neurales durante el desarrollo embrionario; **e)** muerte celular y alteraciones en la morfología observables a partir del D+14 del protocolo; **f)** comparativa entre la morfología de los HDFn sin transducir expuestos a los medios del protocolo optimizado y los HDFn transducidos en D+8; **g)** morfología de las células expuestas a LDN durante 3 días (D0-D3), en lugar de los 6 del protocolo optimizado; **h)** morfología de las células expuestas a db cAMP a partir del D+12 de protocolo, en lugar del D+6 del protocolo optimizado.

7h), momento en el cual comenzó a formarse un fenotipo incompleto, similar a los obtenidos tras la pérdida de la morfología con el protocolo optimizado (Figura 7d).

Para finalizar, es importante destacar la enorme similitud entre los pocillos de HDFn transducidos (Figura 7c/8b) y no transducidos, pero expuestos a los mismos medios, que se puede observar en las imágenes del día 12 (D+8) y día 14 (D+10) de protocolo (Figura 7f/8e). El control de HDFn no transducidos exhibe una morfología idéntica a los anteriormente comentados, aunque se presupone que con un porcentaje de eficiencia menor. En contraposición, estos HDFn no conservan ningún parecido con el control de HDFn expuesto al medio completo de fibroblastos (Figura 7).

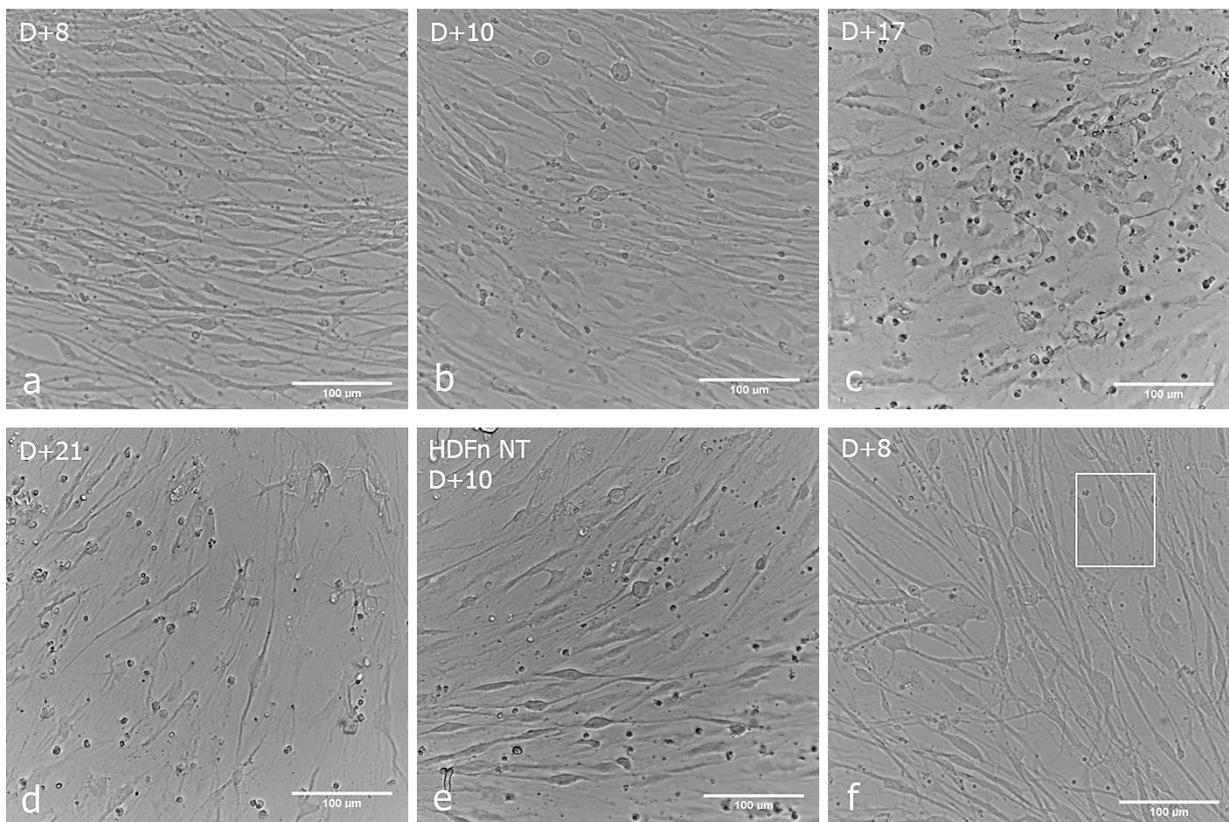


Figura 8. Fotografías tomadas con el microscopio óptico de campo claro (Nikon; Eclipse TE2000-U) de las células en diferenciación en diferentes puntos del protocolo: **a)** cambios morfológicos adoptados por las células en D+8 de protocolo; **b)** evolución morfológica de las células en diferenciación a D+10; **c)** alteraciones morfológicas y muerte celular observable en el D+17 de protocolo; **d)** predominancia de la morfología ramificada de las células gliales en D+21; **e)** comparativa entre la morfología de los HDFn sin transducir expuestos a los medios del protocolo optimizado y los HDFn transducidos en D+10; **f)** ejemplo de ramificación de axones en una célula en diferenciación el D+8 de protocolo.

Los HDFn inducidos presentan cambios genéticos específicos de neuronas maduras e inmaduras

Las neuronas sensoriales periféricas se caracterizan por la expresión de cierto número de marcadores moleculares relativamente específicos, incluyendo neurofilamentos, neurotransmisores y neuropéptidos. Entre estos marcadores, la TUBIII, componente estructural de la red de microtúbulos neuronal, y el MAP2, proteína asociada a la red, son los más extendidos para la caracterización de las neuronas inducidas. En particular, la expresión de la TUBIII se correlaciona con las fases iniciales de diferenciación neuronal, lo cual puede ser una posible justificación de por qué los niveles de expresión de TUBIII están un orden de magnitud por debajo de los niveles de expresión de MAP2 en los resultados obtenidos (Figura 9), aunque no se refleje así en el control de cerebro humano adulto (Ambion).

En líneas generales, el marcador MAP2 muestra una progresión con sentido (Figura 9), ya que sus niveles de expresión van en aumento conforme avanza el protocolo. Sin embargo, el análisis de los niveles de expresión del marcador TUBIII refleja una evolución mucho más inestable. En el día 16 (D+12) de protocolo se observa cierta expresión del marcador por parte de una población de neuronas inmaduras ($0.0000488954 \pm 0.00000651963$), aunque esta es muy inferior a la expresión de MAP2 en ese mismo día ($0.000013892 \pm 0.0000065196$), lo cual parece indicar que, al menos, a partir del día 16 (D+12) la población de neuronas maduras predomina frente a la población de neuronas inmaduras aunque, hasta donde sabemos, esta población, o al menos parte de ella, podría estar expresando ambos marcadores simultáneamente.

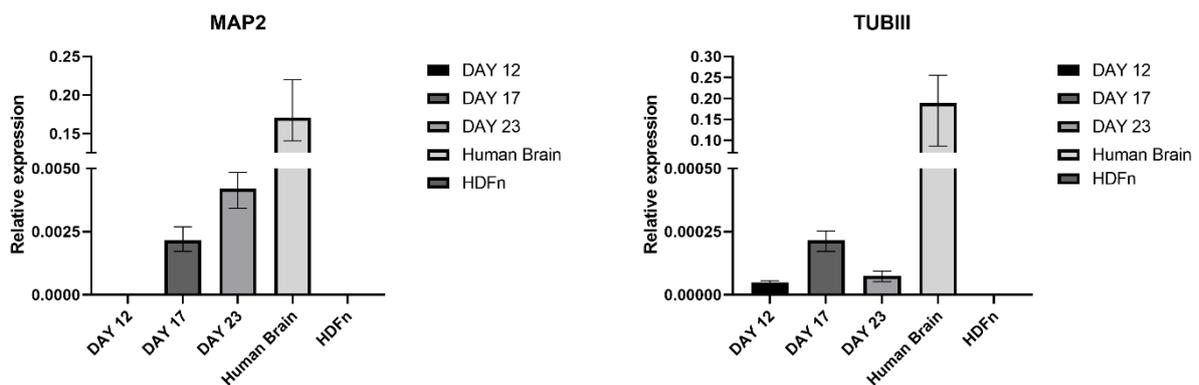


Figura 9. Diagrama de barras representativo de los valores de expresión relativa de los marcadores neuronales MAP2 y TUBIII en las neuronas en diferenciación tras 16 (D+12), 21 (D+17) y 27 (D+23) días de protocolo. Comparación de la expresión con controles de cerebro humano (Human Brain) y HDFn.

Asimismo, cabe destacar la repentina subida de la expresión de TUBIII ($0.000215824 \pm 0.0000365101$) en el día 21 (D+17) de protocolo (Figura 9), la cual se podría relacionar con determinados cambios en las pequeñas moléculas y factores del medio, que se comentarán en el siguiente apartado. Por último, con los resultados del día 23 nos reiteramos en la predominancia de neuronas maduras que expresan MAP2 ($0.00420218 \pm 0.00064191$) al final del protocolo, frente a la presencia de neuronas inmaduras, marcada por la expresión de TUBIII ($0.0000757563 \pm 0.000017242$).

Pese a que, de manera general, los patrones de expresión génica de los marcadores descritos en los fibroblastos en diferenciación (Figura 9) guardan sentido, cabe señalar que son muy inferiores a los niveles de expresión de los mismos en el control de cerebro humano adulto. Concretamente, hasta 100 veces inferiores en el caso de MAP2 y 1000 veces inferiores para la TUBIII. Se desconoce si estas diferencias se deben a bajos niveles de expresión de los marcadores en la población inducida en general o a altos niveles de expresión en una pequeña proporción de la población inducida, que se diluyen entre niveles de expresión bajos o nulos en el resto de la población, debido a las propias limitaciones de la técnica.

Los HDFn inducidos exhiben marcadores moleculares específicos de neuronas nociceptivas peptidérgicas

Tras corroborar la expresión de los neurofilamentos MAP2 y TUBIII mediante RT- qPCR, se realizaron una serie de experimentos paralelos para determinar asimismo su presencia en las neuronas en diferenciación. Además de marcadores para los neurofilamentos genéricos mencionados, las células se tiñeron con los marcadores específicos de neuronas nociceptivas TrkA y TRPV1, los cuales adicionalmente ofrecen información acerca de la funcionalidad de las neuronas inducidas.

Según se puede comprobar en los diagramas de puntos (Figura 10), el subtipo neuronal nociceptivo, reflejado por la expresión de TRPV1 (15,06%) se alcanzó a partir del día 16 (D+12) y se mantuvo hasta el final del protocolo, aunque en un porcentaje más bajo (10,33%) el día 25 (D+21); datos que apoyan las alteraciones en la morfología observadas en las imágenes del final del protocolo (Figura 8d). Estos valores, no obstante, contrastan con los porcentajes

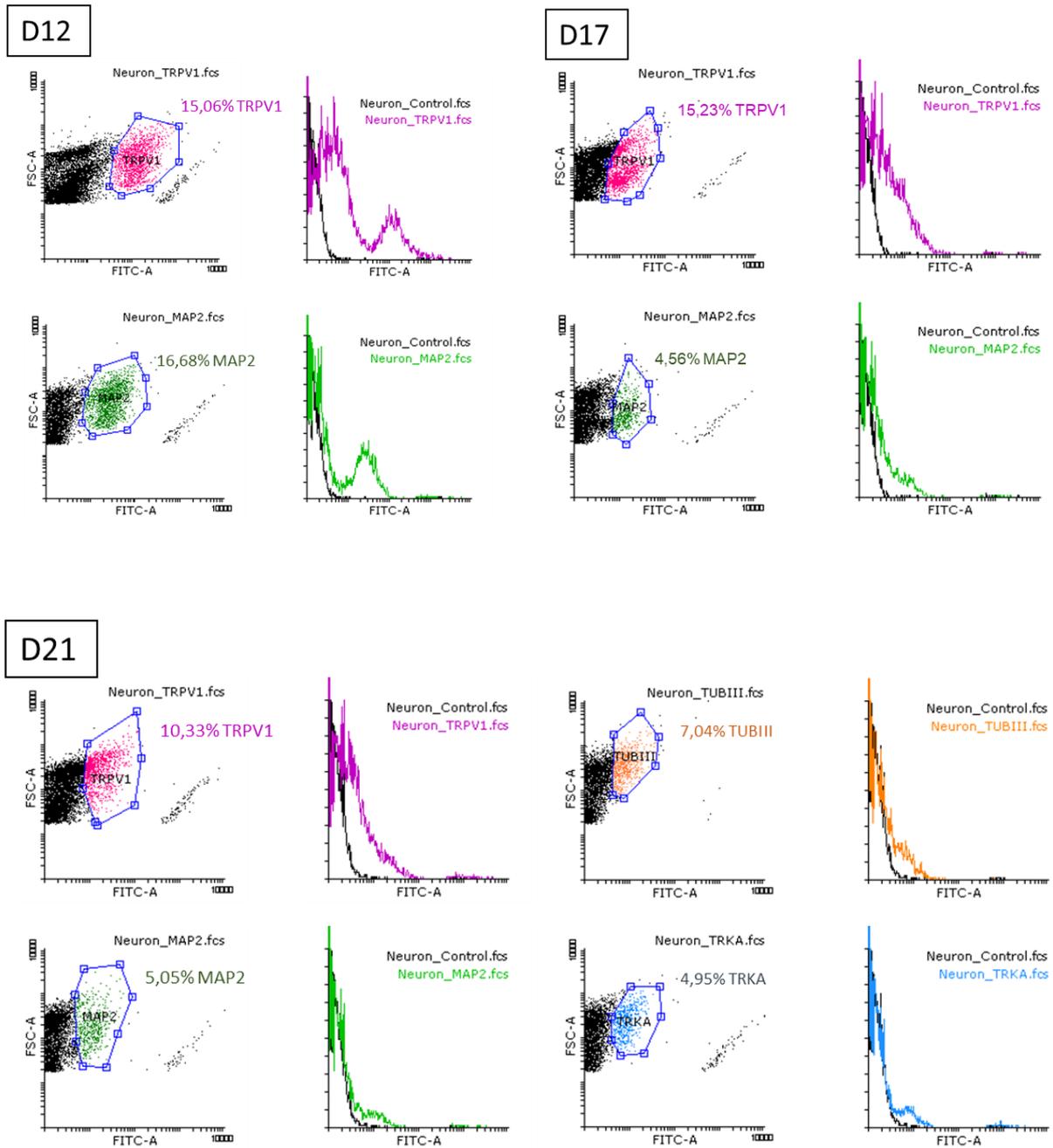


Figura 10. Diagrama de puntos e histograma asociados a la expresión de los marcadores neuronales MAP2, TUBIII, TRKA y TRPV1 en las neuronas en diferenciación, tomadas los días D+12, D+17 y D+21 de protocolo. Los porcentajes de células que expresan cada marcador se obtuvieron a partir de poblaciones seleccionadas manualmente, tomando la población de puntos distinta al control, y comprobando su correspondencia con el segundo pico del histograma. En los diagramas se representan los 10.000 eventos celulares analizados respecto al tamaño celular en el eje Y (FSC-A) y la intensidad de fluorescencia en el eje X (FITC-A). Cada punto del diagrama corresponde con un evento celular analizado.

de expresión de marcadores más genéricos en el mismo día, ya que, por lo general, la población de neuronas que expresan TRPV1 debería de estar englobada dentro de la población de neuronas nociceptivas, la cual presenta un porcentaje menor de expresión (TrkA 4,95%), y dentro de las poblaciones neuronales que expresan MAP2 (5,05%) y TUBIII (7,04%).

Tal y como se puede observar en la Tabla 3, donde aparecen reflejados los porcentajes de expresión de cada marcador dentro de la población que expresa MAP2, por lo general, existe una coincidencia muy alta entre las células que expresan MAP2 y las células que expresan los demás marcadores, lo cual parece indicar que MAP2 es un marcador adecuado para la caracterización neuronal, ya que las células que lo manifiestan expresan también otros marcadores más específicos con una alta probabilidad. La única excepción de este caso se da en el día 16 (D+12), donde parece haberse producido un desplazamiento de la población que expresa TRPV1 sobre la que expresa MAP2, puesto que solo se observa un 3,33% de coincidencia entre las dos poblaciones celulares (Tabla 3) a pesar de los altos porcentajes de expresión que ambas mantienen (Figura 10).

En cuanto a la expresión individual del marcador MAP2, se pierde la progresión observada en la PCR (Figura 9), ya que, de hecho, los niveles parecen ir en disminución conforme avanza el protocolo; con la máxima expresión en el día 16 (D+12; 16,68%) y niveles cercanos al 5% a partir del día 21 (D+17; Figura 10). De nuevo estos datos se ajustan al declive celular observado en las imágenes (Figura 8c).

	% TOTAL	MAP2	TRPV1	TUBIII	TRKA
D12	100	16,68	3,33		
D17	100	4,56	4,56		
D21	100	5,05	3,37	4,09	5,05

Tabla 3. Relación entre los porcentajes de fibroblastos en diferenciación que expresan los marcadores neuronales TRPV1, TUBII Y TRKA en los días D+12, D+17 y D+21 de protocolo, dentro de la población celular que expresa el marcador neuronal genérico MAP2.

Por otro lado, en los resultados de citometría obtenidos a partir de los HDFn sin transducir se observa que, en consonancia con las menores proporciones de células redondeadas visibles en las imágenes (Figura 8c), también son ligeramente más bajos los porcentajes de expresión de TRPV1 (13,53%/ 9,83%) y MAP2 (11,63%/ 6,35%) en los días 16 (D+12) y 25 (D+21), respectivamente. En este último de manera mucho más notable, teniendo en cuenta además que la expresión de TUBIII y TrkA ni siquiera fue detectada (Anexo Figura 11).

DISCUSIÓN

El modelado en la biología personalizada del dolor y la patología sensorial ha constituido uno de los principales desafíos en farmacoterapia de las últimas décadas (Lampert et al., 2020). Ello se debe a que cada vez se está tomando mayor conciencia acerca de la influencia del factor genético en la manifestación del dolor y la respuesta farmacológica asociada. Los resultados de este trabajo, obtenidos en fibroblastos neonatales, sugieren una posible traslación a fibroblastos adultos, que pueda desembocar en la obtención de un modelo neuronal nociceptivo funcional a partir de muestras humanas provenientes de diversos antecedentes genéticos.

Una cuestión clave que surge ante estos hallazgos es el grado de similitud entre los modelos neuronales nociceptivos y sus homólogos endógenos. Las neuronas inducidas se especifican en un entorno marcadamente diferente al del tubo neural durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, son capaces de manifestar múltiples características de las neuronas sensoriales endógenas, las cuales se mantienen incluso después de retirar los factores proneurales. En este apartado se analizan en profundidad algunas de estas características, contrastándolas con los resultados obtenidos a partir de la caracterización de las neuronas inducidas.

Teniendo en cuenta que las neuronas son células cuya función se basa en la transmisión de señales y comunicación intercelular a través de las prolongaciones nerviosas que emergen del soma neuronal, la morfología asociada a su función juega un papel fundamental en la caracterización de las células inducidas. En este trabajo se ha llevado a cabo un seguimiento exhaustivo de la morfología de los fibroblastos en diferenciación tomando imágenes cada dos días mediante un microscopio de contraste de fases, capaz de captar la tridimensionalidad de las células redondeadas; y un microscopio de campo claro, que ofrece información acerca del tamaño celular, así como una mayor resolución de imagen.

El protocolo optimizado comenzó a inducir cambios morfológicos en los fibroblastos a partir del día 10 (D+6), tras aplicar el medio de diferenciación. Este medio se caracteriza por integrar una alta concentración de db cAMP (1mM), sustituyendo al cAMP (100ng/ml) del medio de prediferenciación anterior. El db cAMP es un derivado del cAMP fácilmente permeable a través de la membrana celular, capaz de estimular la vía de PKA dependiente de cAMP con alta

eficiencia mediante el bloqueo de las fosfodiesterasas. Su uso está ampliamente extendido como modulador de vías de señalización e impulsor de la diferenciación neuronal.

Los cambios morfológicos producidos a partir del día 10 (D+6) del protocolo optimizado se asocian a una subida de los niveles de cAMP intracelular debido a que un patrón similar se observa en el protocolo donde se testó el efecto de una adición de db cAMP tardía sobre la morfología celular. Hasta el momento de la adición del mononucleótido en el día 16 (D+12) los fibroblastos apenas variaron su morfología, incluso teniendo en cuenta el largo periodo de exposición a los demás factores del medio (14 días). Sin embargo, una vez introducido el db cAMP (1mM), casi de inmediato comenzaron a ser visibles las primeras estructuras nerviosas (Figura 7h); las cuales, sin embargo, difieren mucho de las obtenidas con el protocolo optimizado, siendo estas mucho menos marcadas y presentes en una menor proporción de las células. Finalmente, partir del día 18 (D+14), la analogía entre ambos protocolos se recupera, cuando se produce la pérdida de la morfología neuronal (Figura 7e).

Este efecto del db cAMP es consistente con los resultados reportados por Smith et al., (2016), los cuales demostraron que las moléculas potenciadoras del cAMP foskolina y dorsomorfina actúan favoreciendo la accesibilidad y/o afinidad del factor de transcripción Ngn2 por las zonas de unión al ADN proneurales, llegando incluso a cuadruplicar los eventos de unión y el tiempo de ocupación sobre los lugares de unión habituales y sitios de unión nuevos. Analisis posteriores corroboraron que el mismo efecto se produce al aplicar cAMP y db cAMP directamente (Smith et al., 2016). Por otra parte, cabe destacar asimismo el papel que ejerce el cAMP en algunas de las respuestas rápidas que se producen como consecuencia de la activación de los receptores Trk por parte de las neurotrofinas (Bibel & Barde, 2000); papel que termina de remarcar el nivel de importancia de esta molécula en los diversos estadios de especificación neuronal sensorial.

Junto al medio de diferenciación (D+6), además, se añaden los factores neurotróficos NT-3 y β -NGF, que actúan como ligandos activadores de los receptores TrkA de las neuronas nociceptivas y TrkC de las neuronas propioceptivas, respectivamente. De esta manera se asegura la supervivencia de los subtipos neuronales que los expresan. El β -NGF, además, juega un papel fundamental en la elongación y mantenimiento de los axones periféricos (Bibel & Barde, 2000); es por ello que, poco después de la adición de este factor comienza a observarse un estrechamiento del citoplasma a cada extremo del pseudosoma, simulando la morfología de

las prolongaciones nerviosas. El BDNF, por su parte, se incluye prematuramente en el medio de pre-diferenciación debido a que antagoniza la función del NT-3 durante la arborización dendrítica (Bibel & Barde, 2000).

Continuando con el análisis de la morfología, cabe destacar que las neuronas sensoriales endógenas presentan una única neurita con una bifurcación distal, morfología que tiende a perderse cuando son cultivadas *in vitro* (Blanchard et al., 2015). Este dato respalda la morfología neuronal observable en las imágenes del día 12 (D+8; Figura 7c), donde se aprecia que la gran mayoría de fibroblastos en diferenciación exhiben la morfología bipolar característica de las neuronas sensoriales en desarrollo o cultivadas *in vitro*, y un porcentaje mínimo presenta la morfología pseudounipolar clásica de las neuronas sensoriales maduras.

Además del número de prolongaciones nerviosas, las neuronas sensoriales endógenas se definen en gran parte por su tamaño, siendo distinto para cada uno de los subtipos Trk. Las neuronas TrkA positivas son las de menor tamaño, las TrkB intermedias y las TrkC las más grandes. En las imágenes del día 14 (D+10; Figura 8b) es posible distinguir somas redondeados de diversos tamaños, sugiriendo la presencia de diversos subtipos Trk en el cultivo; hecho que concuerda con los resultados obtenidos por Blanchard et al., (2015), en los cuales se observó que los factores Ngn1 y Ngn2 inducen cada subtipo Trk en la misma proporción.

Las características morfológicas detalladas alcanzan su máxima expresión en el día 12 (D+8) del protocolo optimizado y van evolucionando hasta el día 18 (D+14), cuando comienzan a decaer y las células entran en apoptosis. Una sucesión de eventos similar se produce en el protocolo de Wilson et al., (2018), en el cual, tras dos semanas de diferenciación, las células con morfología redondeada empiezan a desprenderse del sustrato, perdiéndose progresivamente durante la renovación de medios. Las células restantes disminuyen su tamaño y se aplanan ligeramente, siendo capaces sobrevivir manteniendo esta morfología durante varias semanas. Por el contrario, con el protocolo optimizado, este es el punto de la diferenciación en el que se produce la pérdida definitiva de la morfología, momento que coincide con la adición de HFG. En condiciones fisiológicas, la activación del receptor Met por parte de HGF termina de extinguir los niveles de Runx1, comprometiendo el subtipo TrkA hacia el destino peptidérgico (Lallemend & Ernfors, 2012). En este trabajo, no obstante, los resultados de citometría sugieren

un posible fallo en la activación del receptor Met, que podría estar conduciendo hacia la obtención de neuronas TrkA no peptidérgicas, las cuales, en contraste con las peptidérgicas, reducen los niveles de expresión de TrkA postnatalmente, manteniendo la expresión de Runx1 y TRPV1 (Wilson et al., 2018; Figura 10).

Continuando con el protocolo optimizado, la muerte celular generalizada en el día 18 (D+14) podría estar relacionada con un aumento de la afinidad de las neurotrofinas por el receptor proapoptótico p75. Durante el desarrollo embrionario, las neurotrofinas endógenas ejercen un estricto control sobre el número neuronal mediante la activación selectiva de los receptores de supervivencia Trk frente a los receptores de muerte celular p75. Ambos receptores se coexpresan en la mayoría de las poblaciones neuronales. Como norma general, las neurotrofinas se unen a p75 con una afinidad menor que a sus respectivos receptores Trk; sin embargo, determinadas circunstancias pueden promover la formación de complejos de unión de alta afinidad que inclinen la balanza hacia la unión con p75 (Bibel & Barde, 2000). Además de inducir la apoptosis, p75 juega un papel fundamental durante la diferenciación neuronal, controlando procesos fundamentales como la mielinización, la elongación axónica y la plasticidad sináptica. Por este motivo, la expresión de p75 tiende a incrementar en las células postmitóticas y/o migratorias, hecho que sugiere que los fibroblastos en diferenciación podrían estar sobreactivando p75 y constituir una posible explicación para la repentina muerte y pérdida neuronal producida en el día 18 (D+14).

Por otra parte, el desprendimiento y muerte neuronal de la segunda mitad vienen de la mano de la aparición de células gliales, cuya presencia es cada vez más marcada conforme avanza el protocolo. Teniendo en cuenta que las células gliales siguen un proceso de diferenciación paralelo al neuronal, ya que constituyen el soporte físico y metabólico de las neuronas inmaduras, es natural suponer que el protocolo optimizado haya dado lugar a un lecho de células gliales maduras de manera residual en torno a las neuronas nociceptivas en desarrollo. Esta tendencia puede haber sido potenciada por la adición temporal de FBS en el día 20 (+16) de protocolo, cuyo objetivo era retornar el tamaño y la forma esférica de las células inducidas (Wilson et al., 2018). El suero fetal constituye una fuente de factores de crecimiento, hormonas, lípidos y minerales fundamental para la diferenciación. No obstante, su presencia también se ha visto correlacionada, por un lado, con mayores tasas de proliferación celular, fenómeno que implica la continuidad del ciclo celular y se opone a la diferenciación; y, por el otro, con la diferenciación preferente de las células gliales frente a las células nerviosas (Liu et al., 2018).

Además, la abundancia de células gliales al final del protocolo no necesariamente se contradice con los resultados de expresión de marcadores neuronales obtenidos a partir de la RT q-PCR, puesto que, tanto MAP2 como TUBIII, pueden marcar fibras gliales inespecíficamente (Dráberová et al., 2008), hecho que justificaría la tendencia creciente que sigue la expresión de MAP2 (Figura 9).

Con respecto al control de fibroblastos sin transducir, las observaciones realizadas concuerdan con la bibliografía. Tal y como se expuso anteriormente, la sobreexpresión de los factores de transcripción proneurales tiene un gran peso en la diferenciación; no obstante, no es imprescindible, ya que las pequeñas moléculas, especialmente el cAMP y el db cAMP, actúan sobre las mismas vías de señalización que los factores proneurales, aunque con una eficiencia más baja. El estudio de Smith et al., (2016), concretamente, demostró que, aunque las pequeñas moléculas individualmente pueden promover la activación de promotores y ocupación de los sitios de inicio de la transcripción proneurales; los factores de transcripción determinantes del linaje, especialmente el Ngn2, tienen un rol predominante en la regulación transcripcional mediante elementos distales.

Este efecto se ve incrementado por el hecho de que los fibroblastos, en general, expresan endógenamente algunos de los factores de transcripción necesarios para la reprogramación, de modo que tienen mayor facilidad para diferenciarse en otros tipos celulares (Lampert et al., 2020). Pero, más concretamente, los fibroblastos neonatales mantienen una mayor expresión de los genes involucrados en cicatrización y respuesta al estrés (Mertens et al., 2015), que flexibilizan su capacidad de ingresar en la transición epitelio mesenquimal (Tang et al., 2013), uno de los fenómenos fundamentales durante la diferenciación desde células somáticas.

De la mano con lo expuesto anteriormente y a modo de conclusión, es importante recordar que el éxito de la reprogramación celular depende, en gran medida, de los antecedentes genéticos y epigenéticos de las células de origen, así como la capacidad de los factores de reprogramación de modificar la memoria somática de las mismas (Lampert et al., 2020); punto que puede constituir una posible justificación para la baja eficiencia de reprogramación obtenida a partir de los fibroblastos neonatales. Por otro lado, teniendo en cuenta que el procedimiento de Wilson et al., (2018) empleado parte de CCN, de modo que no puede ser

considerado un protocolo de diferenciación directa como tal, no es de extrañar que haya derivado en una diferenciación incompleta al ser aplicado sobre células somáticas.

Si bien es cierto que el estudio llevado a cabo establece los pasos iniciales hacia la obtención de un modelo neuronal nociceptivo, es mucho más extenso el camino que queda por recorrer hasta alcanzar el objetivo final. En este sentido, algunos de los objetivos que se plantean a largo plazo en la línea de este trabajo son: completar la diferenciación hasta neuronas nociceptivas peptidérgicas con una eficiencia superior al 80%, determinar la funcionalidad de las neuronas inducidas mediante ensayos de imagen de Ca^{2+} , resembrar las neuronas inducidas en cocultivo con células gliales y lograr el mantenimiento del cultivo a largo plazo.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo han llevado a descubrir que la combinación factores de transcripción neurales con pequeñas moléculas de señalización constituye un enfoque válido para la conversión de fibroblastos humanos neonatales en neuronas inducidas, capaces de emular aspectos clave de la morfología de las neuronas sensoriales y expresar marcadores moleculares nociceptivos. Siendo así, se pueden recapitular las conclusiones derivadas de este estudio en los puntos que se exponen a continuación:

- El protocolo de diferenciación optimizado impulsa cambios a nivel genético y molecular en los fibroblastos neonatales.
- El cAMP juega un papel determinante durante la diferenciación neuronal.
- Los fibroblastos neonatales pueden ser reprogramados empleando únicamente la modulación química de las vías de señalización, aunque con mayor eficiencia cuando se combina con la sobreexpresión de factores de transcripción proneurales.

Para finalizar, se puede concluir que los resultados descritos ponen de manifiesto que el modelo neuronal generado recaba correctamente las propiedades iniciales de las neuronas nociceptivas peptidérgicas, sentando las bases para la obtención de modelos más complejos, eléctricamente activos y funcionalmente relevantes, que puedan resultar de utilidad para el estudio de los mecanismos del dolor neurológico y el testado de fármacos.

BIBLIOGRAFÍA

- Bibel, M., & Barde, Y. A. (2000). Neurotrophins: Key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes and Development*, 14(23), 2919–2937.
<https://doi.org/10.1101/gad.841400>
- Blanchard, J. W., Eade, K. T., Sardo, V. Lo, Williams, D., Sanna, P. P., Baldwin, K. K. (2015). Selective conversion of fibroblasts into peripheral sensory neurons. *Nature Neuroscience*, 18(1), 25–35. <https://doi.org/10.1038/nn.3887>
- Chambers, S. M., Qi, Y., Mica, Y., Lee, G., Zhang, X. J., Niu, L., Bilslund, J., Cao, L., Stevens, E., Whiting, P., Shi, S. H., & Studer, L. (2012). Combined small-molecule inhibition accelerates developmental timing and converts human pluripotent stem cells into nociceptors. *Nature Biotechnology*, 30(7), 715–720. <https://doi.org/10.1038/nbt.2249>
- Chen, S., Zhang, J., Zhang, D., & Jiao, J. (2019). Acquisition of functional neurons by direct conversion: Switching the developmental clock directly. *Journal of Genetics and Genomics* (Vol. 46, Issue 10, pp. 459–465). Institute of Genetics and Developmental Biology.
<https://doi.org/10.1016/j.jgg.2019.10.003>
- Ding, B. & D.L. Kilpatrick. (2013). Lentiviral Vector Production, Titration, and Transduction of Primary Neurons. In Zhou, E. & Mei, L. *Neural Development. Methods and Protocols*, Chapter 12, 119-131. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-444-9>
- Dráberová, E., Del Valle, L., Gordon, J., Marková, V., Šmejkalová, B., Bertrand, L., De Chadarévian, J. P., Agamanolis, D. P., Legido, A., Khalili, K., Dráber, P., & Katsetos, C. D. (2008). Class III β -tubulin is constitutively coexpressed with glial fibrillary acidic protein and nestin in midgestational human fetal astrocytes: Implications for phenotypic identity. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 67(4), 341–354.
<https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31816a686d>
- Drouin-Ouellet, J., Lau, S., Brattås, P. L., Rylander Ottosson, D., Pircs, K., Grassi, D. A., Collins, L. M., Vuono, R., Andersson Sjöland, A., Westergren-Thorsson, G., Graff, C., Minthon, L., Toresson, H., Barker, R. A., Jakobsson, J., & Parmar, M. (2017). REST suppression mediates neural conversion of adult human fibroblasts via microRNA-dependent and -independent pathways. *EMBO Molecular Medicine*, 9(8), 1117–1131.
<https://doi.org/10.15252/emmm.201607471>

- Dubin, A. E., & Patapoutian, A. (2010). Nociceptors: The sensors of the pain pathway. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 120, Issue 11, pp. 3760–3772). American Society for Clinical Investigation. <https://doi.org/10.1172/JCI42843>
- Ladewig, J., Mertens, J., Kesavan, J., Doerr, J., Poppe, D., Glaue, F., Herms, S., Wernet, P., Kögler, G., Müller, F. J., Koch, P., & Brüstle, O. (2012). Small molecules enable highly efficient neuronal conversion of human fibroblasts. *Nature Methods*, *9*(6), 575–578. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1972>
- Lallemend, F., & Ernfors, P. (2012). Molecular interactions underlying the specification of sensory neurons. *Trends in Neurosciences*, *35*(6), 373–381. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.03.006>
- Lampert, A., Bennett, D. L., McDermott, L. A., Neureiter, A., Eberhardt, E., Winner, B., & Zenke, M. (2020). Human sensory neurons derived from pluripotent stem cells for disease modelling and personalized medicine. In *Neurobiology of Pain* (Vol. 8). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ynpai.2020.100055>
- Liu, Q., Lü, L., Sun, H., Zhang, J., Ma, W., & Zhang, T. (2018). Effect of serum on the differentiation of neural stem cells. *Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery*, *32*(2), 223–227. <https://doi.org/10.7507/1002-1892.201710113>
- Mertens, J., Paquola, A. C. M., Ku, M., Hatch, E., Böhnke, L., Ladjevardi, S., McGrath, S., Campbell, B., Lee, H., Herdy, J. R., Gonçalves, J. T., Toda, T., Kim, Y., Winkler, J., Yao, J., Hetzer, M. W., & Gage, F. H. (2015). Directly Reprogrammed Human Neurons Retain Aging-Associated Transcriptomic Signatures and Reveal Age-Related Nucleocytoplasmic Defects. *Cell Stem Cell*, *17*(6), 705–718. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.09.001>
- Smith, D. K., Yang, J., Liu, M. L., & Zhang, C. L. (2016). Small Molecules Modulate Chromatin Accessibility to Promote NEUROG2-Mediated Fibroblast-to-Neuron Reprogramming. *Stem Cell Reports*, *7*(5), 955–969. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.09.013>
- Tang, Q.-M., Chen, J. L., Shen, W. L., Yin, Z., Liu, H. H., Fang, Z., Heng, B. C., Ouyang, H. W., & Chen, X. (2014). Fetal and adult fibroblasts display intrinsic differences in tendon tissue engineering and regeneration. *Scientific reports*, *4*, 5551. <https://doi.org/10.1038/srep05515>
- Wilson, R., Ahmmed, A. A., Poll, A., Sakaue, M., Laude, A., & Sieber-Blum, M. (2018). Human peptidergic nociceptive sensory neurons generated from human epidermal neural crest stem cells (hEPI-NCSC). *PLoS ONE*, *13*(6), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199996>

ANEXOS

D12

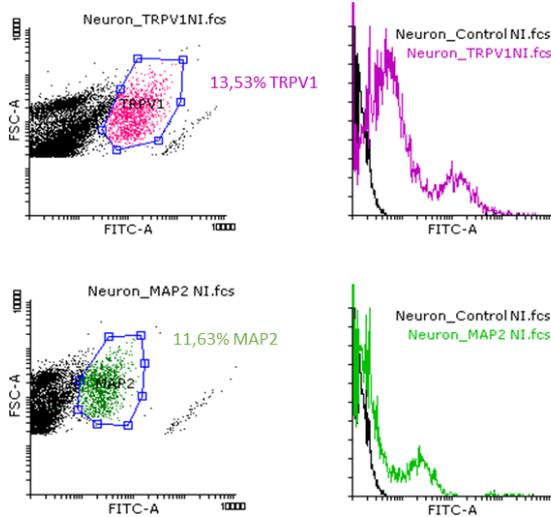


Figura 11. Diagrama de puntos e histograma asociados a la expresión de los marcadores neuronales MAP2, TUBIII, TRKA y TRPV1 en los HDFn sin transducir, tomadas los días D+12 y D+21 de protocolo. Los porcentajes de células que expresan cada marcador se han obtenido a partir de poblaciones seleccionadas manualmente, tomando la población de puntos distinta al control, y comprobando su correspondencia con el segundo pico del histograma.

D21

